

03062
2ej 1



Universidad Nacional Autónoma de México

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA. - ESTUDIO
EXPERIMENTAL Y HUMANO**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica**

p r e s e n t a

NORA PATRICIA BARQUIN ALVAREZ

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizo bajo la direccion del Dr. Ruy Perez
Tamayo en el Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias SSA y en la Facultad de Medicina UNAM

INDICE

Introducción	1-15
Objetivos	16
Material y métodos	17-37
Resultados	38-59
Discusión	60-70
Bibliografía	71-82

INTRODUCCION

La alveolitis alérgica extrínseca (AAE), también llamada neumonitis por hipersensibilidad, es una enfermedad pulmonar bilateral y difusa provocada por una reacción inmunológica en contra de partículas orgánicas inhaladas, lo que se traduce en una inflamación con predominio de células mononucleares que afecta a bronquiolos, alveolos y tejido intersticial (1,2). El tipo de partículas orgánicas capaces de producir la enfermedad es muy variado e incluye productos animales, vegetales, hongos, bacterias termofílicas y agentes químicos de bajo peso molecular (Tabla I). No obstante, a pesar de que hay múltiples agentes etiológicos, la similitud en las alteraciones morfológicas y en la presentación clínica sugieren la participación de mecanismos patogénicos comunes.

Para establecer el diagnóstico de esta enfermedad no existe una característica clínica o de laboratorio patognomónica que lo permita, y éste se basa generalmente en la suma de diferentes hallazgos (3). En términos generales, las bases para el diagnóstico son las siguientes:

a) Antecedentes de exposición a partículas orgánicas y relación causa-efecto.

2

Enfermedad	Fuente de exposición	Antígeno inhalado
Pulmón de granjero	Heno enmohecido	<u>Mycopolyspora faeni</u>
Bagasosis	caña de azúcar	<u>Thermoactinomyces vulgaris</u>
Pulmón de los cuidadores de aves	palomas, pericos	proteínas aviarias
Pulmón de los trabajadores de hongos	abono enmohecido	<u>Thermoactinomyces vulgaris</u>
Pulmón de los sujetos expuestos a clima artificial	sistemas de aire contaminados	<u>Thermoactinomyces candidus</u>
Pulmón de los trabajadores de la malta	malta mohosa	<u>Aspergillus clavatus</u>
Sequelosis	polvo de madera	<u>Pullularia pullulans</u>
Pulmón de los trabajadores del queso	queso enmohecido	<u>Penicillium caseii</u> <u>Penicillium roqueforti</u>
Pulmón de los descortezadores del arce	corteza del arce	<u>Cryptosporium corticaleis</u>
Pulmón de los inhaladores de pituitaria	pituitaria de cerdo	proteínas heterólogas
Enfermedad por gorgojo de trigo	trigo infectado	<u>Sitophilus granarius</u>
Pulmón de los trabajadores de resina epóxica	resina epóxica	anhídrido tállico
Pulmón de los refinadoras de porcelana	pintura catalítica	Di-isocianato de tolueno
Pulmón de los trabajadores de plástico	anhídrido trimetílico	anhídrido trimetílico

Tabla I.- Principales agentes etiológicos y fuentes de exposición causantes de la alveolitis alérgica extrínseca.

- b) Disnea de esfuerzo progresiva.
- c) Estertores crepitantes y subcrepitantes diseminados en ambos campos pulmonares.
- d) Alteración funcional respiratoria de tipo restrictivo, pura o predominante.
- e) Hipoxemia de reposo, o normoxemia con hipoxemia en el ejercicio.
- f) Imágenes radiológicas micronodulares, nodulares o reticulonodulares, bilaterales, sin adenopatía hilar o enfermedad pulmonar localizada.
- g) Anticuerpos circulantes contra el antígeno responsable.
- h) Mejoría parcial al suprimir la exposición al antígeno aún en ausencia de tratamiento.
- i) Alteraciones morfológicas caracterizadas por inflamación intersticial y alveolar de predominio mononuclear, con linfocitos, células plasmáticas y macrófagos infiltrando los tabiques alveolares (4), además de que se pueden observar en los espacios alveolares macrófagos de citoplasma espumoso. Es conveniente destacar que aunque se ha considerado la presencia de granulomas como uno de los rasgos típicos y relativamente constantes en este padecimiento, estudios recientes realizados en pacientes con AAE inducida por inhalación de antígenos aviarios (Aga) demuestran que por lo menos para éste

antígeno, este hallazgo es infrecuente (5). Probablemente los granulomas se produzcan fundamentalmente cuando el antígeno es particulado, p.e., hongos y bacterias termofílicas. En las formas crónicas de AAE se observa fibrosis intersticial y en las etapas más avanzadas puede haber una destrucción extensa del parénquima, siendo el cuadro morfológico indistinguible de otros tipos de fibrosis pulmonar intersticial difusa.

j) Exclusión por datos clínicos, de laboratorio o histológicos, de otra enfermedad pulmonar intersticial difusa que pudiera presentar características similares.

Por lo que respecta al cuadro clínico la AAE, puede tener tres formas de presentación, que dependen del grado y tipo de exposición, así como de características individuales que no han sido bien definidas (4).

La forma aguda se caracteriza por comenzar 4 a 8 horas después de la exposición al antígeno. Los síntomas principales incluyen: disnea intensa, fiebre, escalofríos, tos seca y cefalea. Esta sintomatología disminuye gradualmente en las siguientes 24 horas, aunque puede persistir cierto grado de disnea por varias semanas.

La forma subaguda se presenta generalmente después de una exposición relativamente menos intensa, pero continua,

como suele suceder en la AAE inducida por antígeno aviario (cuando el paciente convive con unas cuantas palomas). En este caso la sintomatología es más atenuada y se caracteriza por la aparición de disnea de esfuerzo progresiva que puede evolucionar hasta hacerse de reposo, tos con expectoración mucosa, anorexia y pérdida de peso.

El cuadro crónico representa la forma más avanzada de AAE y se caracteriza por la presencia de fibrosis intersticial con daño pulmonar irreversible, insuficiencia respiratoria crónica y, en etapas más tardías, signos de descompensación del ventrículo derecho como por ejemplo edema de extremidades inferiores y hepatomegalia. Existe importante compromiso del estado general con anorexia, astenia, adinamia y baja de peso y en general en estos casos el pronóstico es malo.

Las pruebas funcionales respiratorias muestran una disminución de la capacidad pulmonar total, la capacidad vital y la distensibilidad pulmonar, junto con un aumento en la presión de retracción elástica. En las pruebas de intercambio gaseoso existe hipoxemia, con un incremento en el gradiente alveolo-capilar de oxígeno e hipo o normocapnea.

Con respecto a la concentración sérica de inmunoglobulinas, habitualmente se encuentra elevación de los niveles de todas las clases, con excepción de la IgE. En más de la mitad de los casos se puede detectar la presencia de factor reumatoide a títulos moderados o altos, principalmente en la fase aguda y subaguda del padecimiento (6). También es frecuente el hallazgo de complejos inmunes (7). Un rasgo característico de la AAE es la presencia de anticuerpos séricos precipitantes en contra del antígeno específico, (8), los cuales se han detectado usando diferentes técnicas de laboratorio, como doble inmunodifusión, inmunoelectroforésis o ELISA; con esta última técnica es posible encontrar anticuerpos específicos en 100% de los pacientes; sin embargo, este hallazgo debe ser interpretado con cuidado, ya que aproximadamente el 50% de sujetos sanos expuestos al antígeno también presentan anticuerpos precipitantes. Una prueba inmunológica que discrimina con mayor precisión entre enfermos y contactos sanos es la evaluación de la respuesta inmune celular en contra del antígeno (9,10), medida en linfocitos periféricos o en linfocitos obtenidos de lavados bronquioalveolares. En general, la producción de linfocinas, o la proliferación de linfocitos valorada a través de la incorporación de timidina tritiada, son

habitualmente positivos en los pacientes y en mucho menor porcentaje en los expuestos asintomáticos .

En los análisis de lavados bronquioalveolares se ha encontrado aumento en los niveles de IgG, IgA e IgM, presencia de anticuerpos específicos contra el antígeno agresor y cantidades variables de complejos inmunes (11,12). Existe también aumento en el número de linfocitos, que puede llegar a constituir hasta el 50% de las células recuperadas, (en condiciones normales son menos del 15%). Estas células se han estudiado por medio de anticuerpos monoclonales y se han encontrado aumento de las células supresoras-citotóxicas (OKT8+), con inversión de la relación T ayudadora / T supresora. Lo mismo se ha observado en tejido pulmonar (13,14). Todas estas anomalías inmunológicas han permitido postular que la patogenia de la AAE se debe a hiperreactividad inmunológica, mediada principalmente por linfocitos T.

Finalmente, con respecto al tratamiento de esta enfermedad, es fundamental evitar la exposición al antígeno; el uso de corticoides durante un período de seis a doce meses produce buenos resultados en las formas agudas y subagudas; en las formas crónicas o en las que además existe fibrosis intersticial, pueden agregarse medicamentos que modifiquen

el metabolismo de la colágena, como es la D-penicilamina o la colchicina, aunque la utilidad de estos fármacos no se conoce aún con precisión.

El pronóstico de la AAE es variable; hasta hace unos años se la consideraba como un padecimiento reversible en el 100% de los casos y con la utilización de corticoides y evitar la exposición al antígeno el enfermo curaba. Sin embargo, actualmente se sabe que algunos de estos pacientes evolucionan de manera irreversible a la fibrosis intersticial difusa (15).

Modelos animales

Las interrogantes acerca de la patogenia de esta enfermedad son múltiples, y en un esfuerzo por contestarlas se han diseñado numerosos modelos animales, en los que se ha pretendido reproducir la enfermedad con características similares a lo que ocurre en el humano.

En 1971 Miyamoto (16) desarrolló un modelo agudo de la AAE en cobayos inyectando por vía intramuscular una sola dosis de bacilo tuberculoso muerto por calor ocho semanas después los animales fueron nebulizados con PPD. El estudio morfológico secuencial de los pulmones mostró inicialmente aumento de los polimorfonucleares, 24-48 hs después las

células dominantes fueron mononucleares; se observó también considerable engrosamiento de los tabiques interalveolares. Posteriormente Unanue (17), inyectó por vía intravenosa a cobayos con esferas de poliacrilamida recubiertas con antígenos y observó la producción de granulomas pulmonares y que la hiperreactividad se transfería pasivamente a cobayos normales mediante células T y no con anticuerpos de animales inmunizados.

En 1974 Hensley desarrolló un modelo agudo de AAE en monos a los que hizo inhalar suero de paloma, y encontraron que los anticuerpos circulantes (precipitantes) causaban alveolitis hemorrágica a las seis horas de haber sido retados con antígeno (18). Salvaggio (19) usó conejos inmunizados por vía intratraqueal a los cuales expuso posteriormente a la inhalación de aerosoles que contenían independientemente dos antígenos, uno soluble, la albúmina sérica bovina, y otro particulado, la Mycrospora faeni. La sensibilización con albúmina intratraqueal dió como resultado la producción de anticuerpos e hipersensibilidad cutánea tardía, pero los animales no presentaron lesiones pulmonares. En cambio, con Mycrospora faeni desarrollaron lesiones graduales con infiltrados de células mononucleares en alveolos e intersticio, las cuales correlacionaban con la producción de anticuerpos e

hipersensibilidad tardía. Según el autor la diferencia de reactividad se debe a que en un caso el antígeno es soluble y en otro particulado.

En 1976 Santives (20) desarrolló un modelo agudo en cobayos inmunizados con ovoalbúmina y adyuvante completo de Freund, donde se detectaron lesiones de neumonía, hemorragias y choque anafiláctico, obviamente este modelo no se parece a la AAE humana.

Otro modelo agudo fué el desarrollado por Jaubert (21) en conejos inmunizados con adyuvante completo de Freund o Bordetella pertussis y como antígeno la peroxidasa del rábano. La lesión producida por el reto posterior con aerosoles de peroxidasa de rábano se caracterizó por infiltración difusa de los bronquiolos respiratorios y de las paredes alveolares con números aproximadamente iguales de células mononucleares y polimorfonucleares. El desarrollo de la lesión se correlacionó con la reactividad cutánea tardía (12-46 hs), pero no con la respuesta inmune humoral ya que no hubo anticuerpos precipitantes y los estudios de transferencia pasiva de suero fueron negativos.

Barboriack y cols. (22), usaron ratas Sprague-Dawley y como antígeno suero de paloma; los animales se inmunizaron y se nebulizaron durante 23,35 y 49 días, y al final del

experimento se encontraron lesiones de moderadas a graves y caracterizadas por inflamación histiocítica, granulomas y células gigantes multinucleadas.

En 1979 (23) Willoughby desarrolló un modelo agudo y crónico de AAE en conejos a los que inmunizó e hizo inhalar albúmina y concanavalina A. Con una sola inhalación se produjo neumonitis intersticial grave y vasculitis granulomatosa; en la forma crónica (4-8 semanas) se produjeron lesiones necróticas agudas y áreas de fibrosis intersticial. Además se encontraron depósitos de complejos inmunes en pulmón. El autor concluye que la estimulación de los linfocitos T parece ser un evento crítico en la iniciación del daño mediado por células y que también favorece la formación de complejos inmunes; no obstante, el daño puede deberse a toxicidad por la concanavalina A, y las lesiones producidas no se parecen a la enfermedad humana.

Richerson en 1982 (24) desarrolló un modelo de AAE en conejos inmunizados y nebulizados con ovoalbúmina y muramil-dipeptido; en el experimento crónico (4-14 semanas de inhalación), los animales desarrollaron neumonitis granulomatosa crónica, caracterizada por engrosamiento de las paredes alveolares, formación de granulomas e

infiltrados de linfocitos y macrófagos, además se produjeron anticuerpos locales y sistémicos específicos, de tipo IgG e IgA.

Es conveniente destacar que el muramil-dipeptido no tiene actividad ni antigénica ni mitogénica, sino que se supone que es un adyuvante de los mecanismos efectores de la inflamación, los cuales generalmente se suprimen cuando se inhala un antígeno; esto implica deficiencia en la desensibilización, en la supresión o en otras defensas contra los agentes extraños. Por otro lado el muramil-dipeptido no produce las lesiones que se han descrito en otros casos como por ejemplo cuando se utiliza adyuvante completo de Freund.

Calvanico et. al. (25) desarrollaron un modelo de AAE en conejos inmunizados con extracto de heces de paloma y adyuvante completo de Freund; posteriormente los animales inhalaban el mismo antígeno por tiempos variables. La concentración de IgG e IgA en lavados bronquialveolares, aumentó al máximo 2-3 semanas después del tratamiento con el aerosol coincidiendo con el momento en que la inflamación era más intensa. En 1985 (26) este mismo grupo desarrolló un modelo en conejos inmunizados y retados con antígenos proteicos y demostraron que los

animales tienen inflamación pulmonar de duración breve, a la que sigue un periodo de ausencia de respuesta, que dura aproximadamente 30 semanas, es inespecífico y se caracteriza por la incapacidad del conejo de exhibir una nueva reacción inflamatoria al mismo antígeno usado para inducir la primera respuesta ó a un antígeno diferente. Según los autores este estudio revela que después de un reto con un antígeno inhalado, los conejos desarrollan primero supresión no-específica de la inflamación y posteriormente específica.

De la gran variedad de modelos de AAE que se han desarrollado y que en su mayoría son agudos, no se ha podido encontrar uno con características morfológicas similares a las que ocurren en el humano. Este hecho ha influido en la presencia en la literatura de hallazgos controversiales y por otro lado, en que hasta la fecha no se haya podido esclarecer cual ó cuales son los mecanismos patogénicos responsables de la enfermedad. Sin embargo, las observaciones que se han hecho en humanos y en los modelos experimentales (a pesar de sus limitaciones) sugieren una participación muy importante del sistema inmune. Como ya se mencionó, esto se basa en el hallazgo en humanos de anticuerpos contra el antígeno agresor en sangre periférica y en lavados bronquialveolares (8), de

complejos inmunes en ambos fluidos (7,11), de factor reumatoide en aproximadamente 50% de los pacientes (6), el reconocimiento del antígeno por linfocitos T (9,10) y el incremento de linfocitos en lavados bronquialveolares, junto con la inversión de sus subpoblaciones (13,14).

En los modelos experimentales se ha podido producir daño pulmonar en animales normales por medio de la transferencia pasiva de células linfoides de animales previamente inmunizados y retados con el antígeno (17,18,27), se han encontrado complejos inmunes tisulares y participación de la respuesta inmune celular (28,29).

Una de las observaciones más importantes con respecto a este padecimiento, es la existencia de individuos que estando en contacto íntimo con el antígeno no desarrollan la enfermedad. Esto sugeriría que aquellos que se enferman podrían tener mayor susceptibilidad individual (30,31,32) que se traduciría en un desequilibrio en el tono de la respuesta inmune frente a ciertos antígenos, provocando una reacción exagerada frente a éstos. Recientemente se ha postulado que alteraciones en la actividad supresora están involucradas en enfermedades donde hay una respuesta inmune alterada, como es el lupus sistémico generalizado (33), la

lepra (34), la artritis reumatoide (35), la sarcoidosis (36), etc.

En vista de que la AAE parece tener un componente inmunopatológico importante, decidimos estudiar dos sistemas inmunológicos supresores humanos en pacientes con AAE, con objeto de explorar si desempeñaban algún papel en la patogénesis de esta enfermedad: 1) la supresión inespecífica que se induce al incubar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con concanavalina A (Con A), según el método de Frajman (33), en cultivos celulares autólogos; 2) el sistema supresor mediado por prostaglandinas, determinado según la técnica de Haim (37), donde los cultivos de CMSP se estimulan con fitohemaglutinina (FHA), y simultáneamente se desarrollan cultivos con PHA más indometacina, como bloqueador de la síntesis de prostaglandinas.

Por otro lado, dado de que en nuestra opinión no existe un modelo de AAE que sea satisfactorio, fundamentalmente en relación al desarrollo de la lesiones morfológicas, se decidió diseñar algunos modelos, que en el caso de resultar compatibles con la enfermedad humana, permitieran explorar de manera dinámica estas actividades supresoras.

HIPOTESIS

La inhalación crónica de Aqa en individuos susceptibles de contraer AAE produce alteraciones en la actividad inmuno-supresora que se traducen en las reacciones de hipersensibilidad humoral y celular características de la enfermedad

OBJETIVOS

1.- Estudiar la actividad inmuno-supresora en pacientes con AAE producida por la inhalación de Aqa, para relacionar una posible respuesta anormal con la etiopatogenia de la enfermedad.

2.- Desarrollar un modelo experimental de AAE con alteraciones morfológicas semejantes a la enfermedad humana, para poder evaluar de manera secuencial:

- a) la inmunidad humoral local y sistémica.
- b) la inmunidad celular sistémica frente al Aqa.
- c) la actividad supresora mediada por linfocitos T y macrófagos.

MATERIAL Y METODOS

Estudios en humanos

Se evaluaron 14 pacientes con AAE inducida por Aga (13 mujeres y 1 hombre). Con edades entre 18 y 60 años ($\bar{x}=33.8 \pm 9.6$). En todos los casos el diagnóstico se basó en los siguientes datos:

- a) Antecedente de exposición a Aga con relación causa-efecto.
- b) Presencia de anticuerpos circulantes contra Aga, demostrada por ELISA.
- c) Cuadro clínico, radiológico y funcional respiratorio, compatible con la enfermedad.
- d) Hallazgos histológicos clásicamente aceptados para el diagnóstico definitivo, entre los que destacan la inflamación intersticial de tipo mononuclear, con formación de acúmulos linfoides (granulomas pobremente formados) y la presencia de macrófagos de citoplasma espumoso en los espacios alveolares (4).

Ninguno de los pacientes estaba recibiendo tratamiento con corticosteroides o drogas inmunosupresoras en el momento de su estudio.

Como grupo control se estudiaron 12 sujetos, 5 de sexo femenino y 7 de sexo masculino, cuyas edades oscilaron entre 15 y 63 años (30 ± 12.8 años), considerados como contactos sanos (radiografía normal de Tórax y la ausencia de síntomas respiratorios). Todos ellos tenían antecedentes de convivencia con aves. Además se analizaron 8 individuos normales, 7 mujeres y 1 hombre de 19 a 37 años de edad (29 ± 6.6 años) sin antecedentes de convivencia con aves.

Activación de linfocitos con Concanavalina A.

Las células mononucleares periféricas totales (CMPT) se purificaron por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, se lavaron con solución salina fisiológica amortiguada con fosfato (BSF), y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma), complementado con 5% de suero fetal de ternera (Sigma), 100 ug/ml de estreptomina y 100 UI/ml de penicilina (Lakeside) (39).

Las células se cultivaron en tubos de plástico de 12x75 mm (Falcon). Para esto se incubaron 48 hs. a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 , con 12 ug/ml de Con A por cada 1×10^6 células. Posteriormente se lavaron con BSF dos veces y se trataron con mitomicina C (25ug/ml) (Sigma) durante 30 minutos; se lavaron en tres ocasiones con BSF y se resuspendieron en medio RPMI-1640, ajustándose a

1×10^6 células/ml; a éstas células estimuladas con Con A se les consideró como células supresoras (40).

Estudio de la actividad supresora

Las células autólogas frescas (células blanco) se obtuvieron de sangre periférica como se mencionó arriba, y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (2×10^6 células/ml). Se cultivaron en cajas de cultivo de 96 pozos, con fondo plano (Linbro). En concentraciones de 5×10^4 células supresoras y 2×10^5 células blanco, se añadió lectina de Phytolecca americana (PWM) (Gibco), en una dilución final de 1:100. Como control se usaron células mononucleares frescas a las que también se les agregó el mitógeno. Los cultivos se realizaron en una mezcla gaseosa de 95% aire y 5% de CO₂, a 37 °C durante 3 días. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregaron 0.5 uCi de 3H-timidina (New England Nuclear, Boston Ma.) (6.7 Ci /mM) a cada pozo. Las células se cosecharon por medio de una cosechadora automática (Brandel MH-12) y se contaron en líquido de centelleo a base de tolueno (4g/l PPD y 40 mg/l PPDOP) en un contador de centelleo Beckman LS-100 (33).

El porcentaje de supresión fue determinado con la siguiente fórmula:

Los resultados fueron analizados usando la prueba t de Student, considerando como significativos los datos con una $p < 0.05$.

MODELUS EXPERIMENTALES

1.- Obtención de antígeno aviario

Se obtuvo de sangre de pollo del rastro de Ferrería en el Distrito Federal. El suero se separó por centrifugación a 3000 rpm x min. durante 20 minutos y la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (41).

El suero de las palomas se obtuvo por medio de punción cardiaca de palomas compradas en el mercado de Sonora D.F.

Obtención de suero de los animales experimentales y controles

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso) y sangrados por punción cardiaca antes de ser sacrificados. El suero se separó por centrifugación y se congeló a -20°C .

Obtención de lavados bronquialveolares (LBA)

Después de sangrar a los animales por punción cardiaca y previa disección de los músculos del cuello, se les hizo

una incisión en la traquea y a través de una sonda se lavaron ambos pulmones con 20 ml de BSS. El líquido obtenido se centrifugó a 1500 rpm para eliminar el moco y las células y el sobrenadante se congeló a -20°C .

Estudio Morfológico

Inmediatamente después del LBA, los pulmones se fijaron por medio de una sonda traqueal, con formaldehído al 10% amortiguado con fosfatos. Posteriormente se extrajeron en bloque y se procesaron con las técnicas convencionales para microscopía de luz; las secciones de 4 a 5 micras de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina y tricrómica de Gomori.

Estudios inmunológicos

1) Determinación de anticuerpos contra AgA por inmunoelectroforesis (IEF)

La IEF se realizó de acuerdo al método descrito por Duchterlony (1968) (42)., usando agarosa al 1% en amortiguador de barbituratos pH 8.6, con azida de sodio al 0.02%. Se agregaron 20 μl de suero de paloma o pollo en cada pozo y se sometieron a un voltaje de 25 ma. para cada portaobjetos durante 1.5 hs. Después se añadieron 200 μl de los sueros y de los LBA de los animales experimentales y

controles en los canales y se dejaron difundir 48 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. La agarosa se lavó con solución salina, se secó y se tiñó con amido negro al 0.1% en ácido acético al 10% durante 10 minutos y posteriormente se destañó en ácido acético al 10% y glicerol al 1%.

2) Incorporación de timidina tritiada en linfocitos de bazo.

La captación de timidina marcada con ^3H por linfocitos se determinó en presencia de Aga, Con A, PWM y FHA. El ensayo se efectuó de acuerdo con el método de Waithe y Hirschhorn (43), modificado para microcultivo. Los linfocitos de bazo previamente lavados con BSB se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 complementado y se incubaron en cajas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 5×10^5 células en cada pozo. El Aga se agregó en una dosis de 150 μg por cultivo (dosis óptima); la Con A a una concentración de 1 μg por cultivo, el PWM a una dilución final de 1:100 y la FHA a 25 μg por pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía una mezcla de 95% de aire y 5% de CO_2 . Dieciséis horas antes de terminar los cultivos se agregaron 0.5 μCi de ^3H -timidina. En el caso de los

cultivos con FHA y Con A, las células se cosecharon a las 72 hs. Los cultivos con PWM se cosecharon a las 96 hs y los que contenían Aga al sexto día. Los cultivos se procesaron en la misma forma que para el ensayo de supresión ya descrito.

Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IE) , donde:

$$IE = \frac{\text{CPM células estimuladas}}{\text{CPM de células no estimuladas.}}$$

Estudios de supresión en células de bazo

El estudio de la supresión en las células de bazo de los animales experimentales se hizo de la misma forma como se mencionó con las células de pacientes, con la diferencia de que las células frescas que se usan en el ensayo provienen de un animal sano.

Estudios del metabolismo de colágena

Cuantificación de colágena

Se tomaron porciones de aproximadamente 50 mg de tejido, las cuales se secaron con papel filtro estéril y se llevaron a peso constante, deshidratándolas a 100 °C en una estufa Thelco. El tejido se hidrolizó con HCl 6N en una ampollita

sellada al vacío y se incubó durante 24 hs a 100 °C. Posteriormente el hidrolizado se filtró al vacío, se evaporó el ácido clorhídrico y se neutralizó. Finalmente, las muestras se resuspendieron en agua destilada, de donde se tomaron alícuotas para la determinación de hidroxiprolina por el método de Rojkind y González (44).

Los resultados se expresaron como mg de colágeno/g de tejido seco.

Biosíntesis de colágeno

Las muestras de pulmón fueron divididas en dos porciones con un peso aproximado de 100 a 200 mg de peso. Estas alícuotas se incubaron en 3 ml de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, que contenía 10% de suero fetal de ternera, 0.018 mg de ácido ascórbico, 0.064 mg de sulfato ferroso, 300 U de penicilina, 300 µg de estreptomicina. Los cultivos se equilibraron con 95% de O₂-5% CO₂ y se incubaron a 37 °C en un agitador con baño de agua. Después de 1 hora el medio fue reemplazado con 3 ml de medio fresco que además de los reactivos mencionados contenía 30 µCi de (2,3-³H)-prolina, (32.2 Ci/mol, New England Nuclear, Boston Mass) y el tejido se incubó 4 horas más.

Al final del período de incubación las muestras de tejido se homogenizaron con un homogenizador de tejido Polytron (Brinkman Instruments, Inc, Westbury N.Y.) en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y lavadas 3 veces con TCA al 5%. El material precipitado con TCA se hidrolizó por 24 horas con HCl 6N a una temperatura de 100°C y posteriormente se filtró al vacío y se procedió a la evaporación del ácido clorhídrico y neutralización de las muestras. La hidroxiprolina y la prolina radioactiva por el método de Rojkind y González (44).

Los resultados obtenidos se expresaran como porciento de síntesis de proteínas no colagénicas, multiplicado por el factor de corrección de 5.04 (45) dado el contenido más bajo de prolina en estas últimas.

Calculos para biosíntesis de colágena

2cpm de OH-PRO

% de síntesis= _____ x100

2cpm de OH-PRO (5.04 x cpm PRO)

MODELOS EXPERIMENTALES

Modelo experimental I

Diez ratas Wistar macho de 8 semanas de edad se inmunizaron por vía subcutánea con adyuvante completo de Freund (ACF) (Sigma) y 10 mg de plasma de paloma (PP); a los siete días se les inyectó por la misma vía adyuvante incompleto de Freund (AIF) y 10 mg de PP; a los 15 días se sometieron a la inhalación diaria de 20 ml de PP (30 mg/ml), por medio de un micronebulizador ultrasónico (Bennet US-1), dentro de una jaula de acrílico diseñada especialmente (Fig 1), durante seis semanas. Los controles consistieron en un grupo de seis ratas sin inmunizar ni nebulizar; posteriormente se sacrificaron y se hicieron los siguientes estudios:

- a) Histopatológico (cortes de pulmón teñidos con hematoxilina y eosina y tricrómica de Gomori).
- b) Incorporación de ³H-timidina en linfocitos de bazo estimulados con Con A.

Modelo Experimental II

Nueve ratas Wistar machos de 8 semanas de edad y 10 ratones Balb c machos de 8 semanas de edad se inmunizaron por vía subcutánea con 10 mg de suero de pollo (SPo), mezclado con ACF, a los siete días se reimunizaron con 10 mg de SPo y AIF; después de dos semanas se sometieron a una



Figura 1. Cámara de nebulización para la exposición crónica a antígeno aviario. En el cuadrante inferior izquierdo se observa el micronebulizador Bennet US-1 utilizado en todos los experimentos.

nebulización diaria con 50 ml de SPO (30 mg/ml) durante 10 semanas. Se incluyó un grupo control, el cual consistió en cinco ratas y ratones inmunizados con ACF más BSF y AIF más BSF, con objeto de ver si las lesiones morfológicas no eran producidas por la sola presencia del ACF, además de cinco ratas y ratones sin inmunizar ni nebulizar.

Al final del experimento los animales fueron sacrificados y los pulmones se fijaron para estudios de microscopía de luz. Además se obtuvieron muestras tisulares para cuantificación y biosíntesis de colágeno, con el fin de evaluar si en el modelo se podían encontrar diferencias entre los animales sanos y enfermos como un indicador precoz del desarrollo de fibrosis pulmonar. Se tomaron muestras del suero para la determinación de anticuerpos por medio de inmunoelectroforesis.

Modelo Experimental III

Se diseñó un tercer modelo experimental de AAE, con objeto de determinar si los animales se podían sensibilizar solamente por contacto con el antígeno por vía aérea (como ocurre en los humanos). En este modelo 10 ratas Wistar machos de 8 semanas de edad se sometieron a nebulización sin haber sido previamente inmunizadas por vía sistémica. Antes de someterse a la nebulización los animales se

sangraron con objeto de ver si no habia anticuerpos que precipitaran con el antigeno en forma inespecifica.

Modelo Experimental IV

En vista de que los resultados obtenidos en los tres experimentos anteriores no fueron satisfactorios se diseñó un cuarto modelo, en el que se decidió aumentar el tiempo de nebulización a cuatro meses, con la hipótesis de que al incrementar el tiempo de inhalación habria lesiones mayores. Se inmunizaron 8 ratas Wistar machos de 8 semanas de edad, en la misma forma que ya se mencionó en el modelo II y se sometieron a nebulización diaria de 50 ml de SPo (30 mg/ml) durante 16 semanas. Posteriormente se sacrificaron y se obtuvieron muestras de suero y lavados bronquiales para evaluar posibles diferencias entre las ratas experimentales con y sin patologia pulmonar en relación a la presencia de anticuerpos locales, ya que en ambos casos existen anticuerpos presentes en el suero, como suele suceder en la enfermedad humana. Con las células de bazo se hicieron estudios de supresión inducida por Con A, para comparar con los resultados que se habian obtenido en humanos, y para determinar si habia diferencias en el porcentaje de supresión en las ratas sometidas a nebulización en relación a los grados de lesión pulmonar.

Sin embargo, en los co-cultivos de las células de bazo a diferencia de lo encontrado en linfocitos humanos la respuesta mitogénica de las ratas a la lectina de fitolaca fué muy pobre, por lo que se decidió utilizar otro mitógeno (FHA).

Modelo Experimental V

Dado que al aumentar el tiempo de nebulización de 10 a 16 semanas no hubo incremento importante en las lesiones morfológicas, y basados en una publicación que usaba conejos, en donde después de un pico inflamatorio la lesión involuciona aún en presencia del antígeno (25), se decidió realizar un nuevo experimento en donde los animales se nebulizaran 10 semanas. Se inmunizó con SPo un grupo de 10 ratas Wistar machos en la forma descrita anteriormente y se nebulizaron diariamente con 50 ml de suero de pollo. Se sacrificaron y se hicieron los siguientes estudios:

a) morfológico, b) incorporación de 3H-timidina en células de bazo estimuladas con FHA, c) incorporación de 3H-timidina en células de bazo estimuladas con Aga, d) supresión inducida por Con A, e) supresión de células mononucleares mediada por prostaglandinas.

Sin embargo, hasta este momento ninguno de los modelos obtenidos había sido satisfactorio en términos

morfológicos y de reproducibilidad, además de que el problema de la infección crónica que presentaban las ratas por Mycoplasma pulmonis se había hecho más agudo; por esto, se decidió iniciar una nueva colonia de ratas Wistar, para lo cual se utilizó un pie de cría proporcionado por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología; estas ratas procedían de Estados Unidos, siendo una cepa abierta y pura. Se criaron en óptimas condiciones de temperatura e higiene y se trataron con tilosina para controlar la infección por M. pulmonis.

Con este grupo de ratas se realizaron todos experimentos los siguientes.

Modelo Experimental VI

En todos los modelos anteriores se habían utilizado ratas macho para que las variaciones hormonales del ciclo estral no interfirieran con los experimentos; sin embargo, en la experiencia clínica del INER (15) se ha visto que la mayor parte de los pacientes con AAE inducida por Aga son mujeres, por lo que se pensó que al usar animales hembras se podrían obtener mejores resultados. Con base en estas consideraciones se diseñó el siguiente modelo: nueve ratas Wistar hembras de 8 semanas de edad se inmunizaron con SPo y

ACF, a la siguiente semana se inmunizaron con SPo y AIF, y a los 15 días se nebulizaron diariamente con SPo durante 10 semanas. Se sacrificaron y se hicieron estudios morfológicos. No se apreciaron diferencias significativas con la utilización de ratas hembra.

Hasta el momento los principales defectos que presentaban los modelos descritos eran que solo un bajo porcentaje de ratas con lesiones difusas y sólo en algunos modelos. En la mayoría de los animales las lesiones inflamatorias eran focales y gran parte del parénquima pulmonar se encontraba respetado.

Modelo Experimental VII

Con objeto de incrementar el número de animales con lesiones difusas se decidió intentar un modelo al que se añadiera una substancia con efecto potenciador; para esto se utilizó el paraquat, que como se ha demostrado previamente, sumado a la inhalación de oxígeno a concentraciones elevadas produce un grave y extenso daño pulmonar (46).

Se diseñó un experimento en donde se utilizaron 13 ratas Wistar provenientes de la nueva colonia y 6 ratas Sprague-Dawley. Se inmunizaron con 10 mg de suero de paloma (SPa) más ACF; a la semana siguiente con 10 mg de SPa más

AIF; a los quince días se dividieron en dos grupos; el primero correspondió a siete ratas Wistar y cuatro ratas Sprague-Dawley que se nebulizaron diariamente con 25 ml de suero de paloma y se inyectaron tres veces por semana con 2mg/ kg de peso con paraquat intraperitoneal. El segundo grupo de seis ratas Wistar y dos Sprague-Dawley se inyectó en la misma forma con paraquat, pero en lugar de antígeno para nebulizar se utilizó solución salina. Ambos grupos se nebulizaron e inyectaron durante cuatro semanas. El estudio morfológico de los pulmones en este modelo mostró lesiones en ambos grupos, las que eran diferentes a la AAE y por experiencia previa en nuestro laboratorio fueron atribuidas al paraquat.

Modelo Experimental VIII

Basados en que existen diferencias genéticas en la respuesta inmune a los estímulos antigénicos (47,48), dependiendo de la cepa de animales utilizada, se decidió buscar alguna cepa de rata más susceptible a adquirir la enfermedad y con esta hipótesis se montó el siguiente modelo con un grupo de ratas Fisher singénicas donadas por el bioterio del IMSS.

Se inmunizaron por vía intradérmica 18 ratas Fisher macho de 8 semanas de edad, con 10 mg de SPa más ACFy; a los

siete días se inmunizaron con 10 mg de SPA más AIF. Una semana después se dividieron en tres grupos:

- a) seis ratas fueron inyectadas con 100 000 bacterias de BCG en 300 ul de SSF por vía intratraqueal.
- b) seis ratas recibieron 100 ug de suero de paloma y 300 000 bacterias de BCG en 300 ul de SSF por vía intratraqueal.
- c) seis ratas fueron inyectadas con 100 ug de suero de paloma en 300 ul de SSF por vía intratraqueal.

Los grupos a y b se nebulizaron durante 4 semanas con 25 ml de suero de paloma. del grupo c solo se nebulizaron tres ratas.

Nuevamente las lesiones no fueron las esperadas, por lo que decidimos cambiar de especie animal.

Modelo Experimental IX

Este nuevo modelo se diseñó en conejos; se utilizaron diez conejas Nueva Zelanda de 2Kg de peso, que fueron inmunizadas por vía intradérmica con 30 mg de SPA más ACF y a la siguiente semana recibieron 30 mg de SPA más AIF; quince días más tarde se nebulizaron con 25 ml de suero de paloma diariamente de lunes a viernes durante 5 semanas. Los controles fueron conejas inmunizadas con SPA más ACF, pero

nebulizadas con SSF y un grupo de cinco conejas inmunizadas con SPa sin adyuvante y nebulizadas con SPa.

Modelo Experimental X

En vista de que en el modelo anterior el ACF por si solo produjo en los conejos imagenes morfológicas de neumonitis, decidimos buscar otro adyuvante. Se utilizó gel de hidróxido de aluminio (Pepsamar) mezclado con 2 ml de SPa 15 mg/ml volumen a volumen. Se inyectaron 9 conejas por via intradérmica; a la siguiente semana se repitió la misma dosis, y siete días después se nebulizaron con SPa. Los controles consistieron en cinco conejas inmunizadas de la misma forma con hidróxido de aluminio y SPa, pero nebulizadas con SSF. El cambio de adyuvante, demostró que las lesiones granulomatosas del modelo IX eran debidas al ACF.

Modelo Experimental XI

Finalmente decidimos ensayar con otra especie animal que es muy utilizada en modelos experimentales de asma, debido a la facilidad con que presenta hiperreactividad de las vías aereas. Se inmunizaron diez cobayos , cinco machos y cinco hembras de 250 gr de peso, por via intratraqueal con 100 ug de ovalbumina (OA) , 15 días después de la

sensibilización se sometieron a nebulización de 5 días a la semana con 25 ml de OA (2mg/ml) durante 4 semanas.

RESULTADOS

Modelo experimental I

En este modelo los animales normales no mostraron lesión (Fig. 2) . Los animales agredidos con Aga mostraron diferentes grados de lesión pulmonar que se caracterizaron por un aumento del tejido linfoide asociado a bronquios, inflamación intersticial de predominio mononuclear y (en algunos animales) presencia de macrófagos de citoplasma espumoso en los espacios alveolares. Ocasionalmente se observó inflamación perivascular de las mismas características descritas, además de focos irregulares de eosinófilos y células gigantes multinucleadas (Fig 3 y 4).

Incorporación de ³H-timidina en linfocitos de bazo.

Cuatro de las seis ratas normales presentaron frente al Aga un índice de estimulación (IE) ligeramente superior a 1 (Tabla II) siendo el promedio de las seis de 1.73 ± 0.65 . Por otro lado, solamente dos de las siete ratas experimentales mostraron un IE mayor que los controles. En cambio, las cinco restantes presentaron este IE similar a las ratas normales, con un promedio de 2.14 ± 1.4

Frente a la Con A (Tabla II), el IE de la ratas normales fue en promedio de 8.5 ± 3 . En contraste, los linfocitos

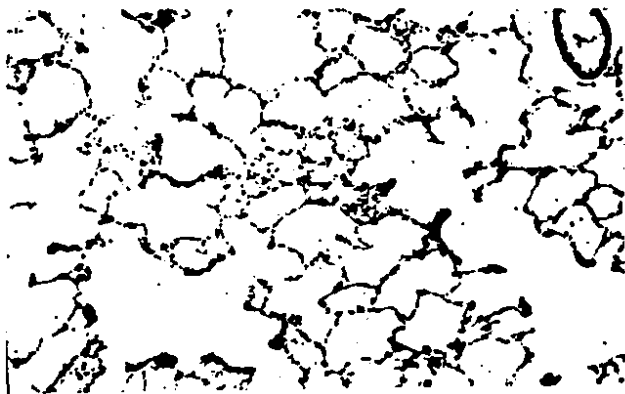


Figura 2. Micrografia de un corte de pulmón de rata normal, se pueden observar los tabiques alveolares delgados y normales y los espacios alveolares limpios (H.E. 80X)

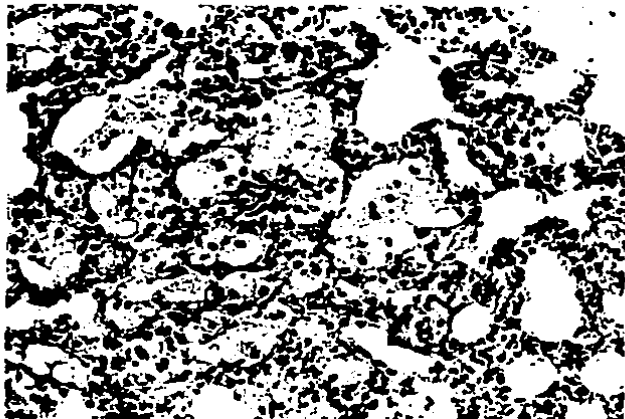


Figura 3. Fotomicrografía de un pulmón de rata sacrificada seis semanas después de la exposición a suero de palomas. Se puede observar un engrosamiento de los tabiques alveolares a expensas de un infiltrado inflamatorio de predominio mononuclear. En varios espacios alveolares se aprecian macrófagos de citoplasma vacuolado (H.E. 80x).

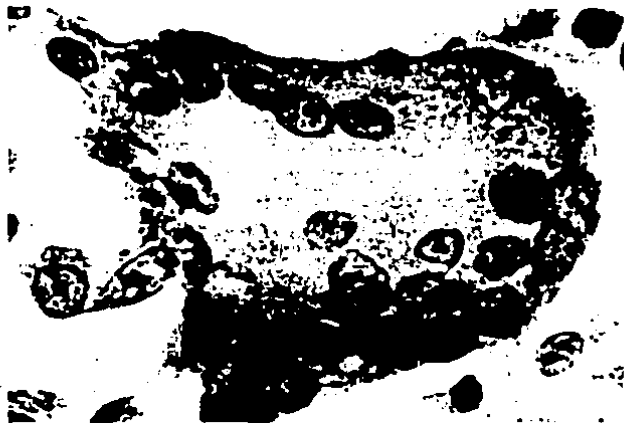


Figura 4. Célula gigante multinucleada ubicada en el intersticio pulmonar de una rata expuesta durante seis semanas a la inhalación de suero de palomas (H.E. 450x).

Grupo Experimental

Rata No	Antígeno Aviario	Concanavalina A
1*	3.8	5.1*
2*	4.5	11.7 *
3	2	4.7
4	1.4	2.3
5	1	2.1
6	1	4.1
7*	1.3	8 *
Promedio	2.14 ± 1.4	5.4 ± 3

Grupo Control

8	2.0	9.5
9	1.0	4.0
10	2.2	12.5
11	2.5	10.4
12	0.9	8.6
13	1.8	6.4
Promedio	1.73 ± 0.65	8.5 ± 3

Tabla II. Índice de estimulación de linfocitos de bazo frente a la Concanavalina A y el Antígeno aviario. Modelo I
 Índice de estimulación = $\frac{\text{cpm células estimuladas}}{\text{cpm células no estimuladas}}$

* Ratas con mayor grado de lesión.

de las ratas con alveolitis tuvieron un IE promedio de 5.4 ± 3 , aunque esta diferencia no fué estadísticamente significativa. ($p > 0.2$). Sin embargo, se observó que las tres ratas que tenían un IE mayor frente a Con A presentaban lesiones morfológicas más graves.

Por otra parte las lesiones histológicas de este primer modelo fueron heterogéneas. El 30% de los animales agredidos desarrolló alteraciones morfológicas considerables y el resto mostró grados menores de dano pulmonar. En este sentido era deseable que el modelo se optimizara con respecto al número de animales que presentaban lesiones difusas. Inicialmente se consideró que aumentando la cantidad de antígeno y el tiempo de exposición obtendríamos mejores resultados. Para facilitar el incremento de estas variables se decidió cambiar el antígeno a suero de pollo, debido a que era más sencillo de conseguir y con un costo menor y por otro lado se han descrito en la literatura casos de AAE por contacto con estas aves. Además se ha comprobado en nuestro laboratorio que los antisueros dirigidos contra suero de ambas aves cruzan inmunológicamente. El segundo modelo se diseñó introduciendo las siguientes variables:

- a) Se incrementó la cantidad de suero con que se nebulizaba a los animales de 20 a 50 ml cada día.

b) Se prolongó el tiempo total de inhalación de 6 a 10 semanas.

c) Además de ratas, se utilizaron ratones Balb /c.

El estudio morfológico en este segundo modelo reveló que de acuerdo a las lesiones observadas, los animales se podían clasificar en tres grupos: a) No lesionados. b) Con lesión mínima perivascular, caracterizada por infiltrado de células mononucleares con aspecto de plasmáticas en la vecindad de vasos pequeños y que en corte transversal, tenían aspecto de manguitos, aunque ocasionalmente estaba limitado a un solo lado del vaso afectado. Las alteraciones eran más frecuentes en los vasos subpleurales y en los extremos de los cortes. c) Con lesión intensa, en la que además del infiltrado perivascular generalizado, se encontró engrosamiento de los tabiques alveolares, con infiltración de células mononucleares (Fig. 5). Los resultados se muestran en la tabla III. Por otro lado, las ratas que fueron inmunizadas y no se nebulizaron no presentaron lesiones, lo que puede sugerir que las lesiones intensas ocurren cuando los animales se nebulizan y no simplemente por la presencia del ACF.

Biosíntesis y concentración de colágena.

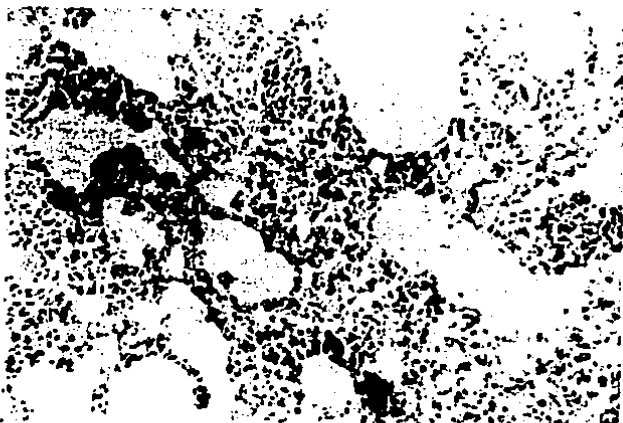


Figura 5. Fotomicrografía de pulmón de rata expuesta durante diez semanas a la inhalación de suero de pollo, se observa infiltrado perivascular y engrosamiento de los tabiques alveolares, con infiltración de células mononucleares. (H.E. 120x).

Lesiones Histológicas	Concentración de colágena mg.colágena /g tejido seco	Biosíntesis % colágena	Número de bandas en IEF Suero de pollo	suero de paloma
--------------------------	---	---------------------------	---	-----------------

Ratas inmunizadas
no nebulizadas

sin lesión				
NP-1	78.5	1.6	5	1
lesión mínima				
NP-4	78.5	1.37	3	1
NP-8	86.7	N. D.	5	0
NP-12	83	N. D.	6	1
Promedio	82.7 \pm 4.1	1.37	4.6 \pm 1.5	1

Ratas inmunizadas
y nebulizadas

lesión mínima

NP-3	88.2	1.6	1	1
NP-5	91.6	1.8	1	1
NP-7	81.3	N.D.	4	1
NP-13	69.3	N.D.	1	1
NP-14	63.3	N.D.	6	1
NP-15	66.7	N.D.	5	1
Promedio	76.7 \pm 11.9	1.7 \pm 0.14	3 \pm 2.2	1

lesión intensa

NP-2	91.2	1.6	3	1
NP-6	85.6	1.8	3	0
NP-10	95	1.6	1	1
Promedio	90.6 \pm 4.7	1.6 \pm 0.11	2.3 \pm 1.15	0.6 \pm 0.5

Ratas sin nebulizar
ni inmunizar

lesión mínima				
NP-9	61.74	1.31	0	0
sin lesión				
NP-16	71.05	1.66	0	0
NP-17	69.8	1.18	0	0
NP-18	62.95	1.47	0	0
NP-19	78.9	1.5	0	0
Promedio	68.8 ± 6.93	1.4 ± 0.18	0	0

Tabla III.- Resumen de los resultados del modelo II

Con respecto al estudio de concentración de colágena, no encontramos ninguna diferencia entre las ratas sanas y las que presentaban lesiones mínimas, (Tabla III). De todos modos, los animales que tenían lesiones más intensas mostraron una tendencia al aumento en esta proteína. En relación a la biosíntesis de colágena tampoco hubo ninguna diferencia entre ambos grupos.

Determinación de anticuerpos por IEF

No se encontró ninguna correlación entre el número de bandas y la presencia de lesiones en los animales. Todos los animales que fueron inmunizados presentaban anticuerpos, independientemente de si se hubieran nebulizado o no. Además se observó que existía una banda que era común al suero de pollo y paloma (Tabla III).

Finalmente ninguno de los ratones presentó lesiones pulmonares, por lo que se decidió que no tenía sentido realizar el modelo con estos animales.

Modelo Experimental III

Estudio morfológico.

Ninguno de los animales de este modelo tenía lesiones pulmonares.

Determinación de anticuerpos por IEF.

Las IEF de las ratas antes de ser inmunizadas no presentaron ninguna banda, (este estudio fué realizado para probar que las bandas de precipitación eran específicas). Después de la nebulización en LBA no se observó ninguna banda y solamente una rata presentó una banda de precipitación frente al Aga en suero.

En conjunto, estos datos sugirieron que el método de inmunización por vía aérea para esta enfermedad no es eficaz, y que para producir el padecimiento y sensibilizar apropiadamente a las ratas es necesario inmunizarlas por vía subcutánea con ACF, antes de retarlos con el Aga por nebulización.

Modelo Experimental IV

Estudio Morfológico

Las lesiones morfológicas fueron como las que se describieron en el modelo II, pero todas con un grado de lesión mínima. En este sentido no se incrementó el grado ni extensión de las lesiones, a pesar de haber aumentado el tiempo de nebulización.

Determinación de anticuerpos por IEF

En el suero de los animales agredidos el número de bandas de precipitación fué de 1 a 5, en cambio, en los LBA fué de 0 a 1, sin embargo no se pudieron correlacionar con las lesiones morfológicas. Ninguno de las ratas controles presentó bandas de precipitación en suero ni en LBA (Tabla IV).

Ensayo de supresión inducida por Concanavalina A

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos con esta prueba. como se puede observar, éstos datos sugieren que las ratas agredidas presentan un índice de supresión mayor como consecuencia de la exposición al AgA, no obstante, es necesario tener un mayor número de animales estudiados en los dos grupos, para obtener resultados más concluyentes. En este experimento se observó que la respuesta mitogénica de las ratas al PWM era muy pobre, por lo que se decidió utilizar otro mitógeno (fitohemaglutinina PHA) a fin de que fuera mayor la diferencia de incorporación de ³H-timidina entre las células expuestas al mitógeno solo y las que se co-cultivan con las células mitomizadas.

Modelo Experimental V

Estudio Morfológico

Rata No	Lesión Histológica	Número de Bandas en IEP en suero	en LBA	Porcentaje de supresión inducido por Concanavalina A (co-cultivo)*
<u>Ratas inmunizadas y nebulizadas</u>				
1	sin lesión	3	1	--
2	mínima	3	1	64
3	mínima	5	0	--
4	mínima	3	0	--
5	mínima	1	1	60
6	mínima	3	1	--
7	sin lesión	3	0	--
8	sin lesión	3	0	60
<u>Ratas inmunizadas no nebulizadas</u>				
10	sin lesión	0	0	0
11	sin lesión	0	0	30
12	sin lesión	0	0	0
13	sin lesión	0	0	40

Tabla IV - Resumen de los resultados del cuarto modelo

$$* \% \text{ Supresión} = 1 - \frac{\text{cpm células tratadas con Concanavalina A y mitomicina}}{\text{cpm células normales con PWM}} \times 100$$

Como se puede observar en la tabla V, no hay diferencias entre las ratas nebulizadas y los controles. En ambos grupos existía tejido linfóide bronquialveolar (BALT) de + a +++, y lesiones focales o moderadas de alveolitis. Este tipo de lesiones, se atribuyó a la infección por Mycoplasma pulmonis y no a una respuesta al Aga, por lo que se decidió traer una cepa de ratas Wistar de un bioterio independiente, las que fueron previamente analizadas antes del siguiente modelo.

Cultivos celulares.

Este estudio se realizó antes de conocer los hallazgos morfológicos y a ciegas. Los resultados de la incorporación con 3H-timidina y los dos ensayos de supresión se resumen en la tabla VI. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre los controles y las ratas nebulizadas.

En vista de que hasta el momento, los modelos obtenidos no reunían los criterios necesarios, se decidió implementar la siguiente serie de experimentos, exclusivamente con análisis morfológicos.

Modelo Experimental VI

Estudio Morfológico

Ratas No

Ratas sin inmunizar
ni nebulizar

BALT

Grado de Alveolitis

Otras Observaciones

1	++++	Focal mínima	-----
2	+++	No presenta	Edema Pulmonar
3	+++	Moderado	-----
4	++	No presenta	Congestión +
5	-	No presenta	Bronquitis Purulenta con Absceso
6	++	Focal	Congestión +

Ratas inmunizadas
y nebulizadas

7	+++	Moderada	-----
8	++++	Focal	-----
9	+++	Moderada	-----
10	+++	Moderada Focal	-----
11	-	Focal	-----
12	++	Focal	Congestión +
13	+	Focal	Congestión +
14	+	Focal Múltiple	Congestión +
15	+	Focal	Congestión +
16	-	-----	Bronquiectasia

Tabla V.- Lesiones histológicas del modelo V. BALT - Tejido Linfóide Bronquialveolar.

Rata No.	CPM incorporación de Células estimuladas con PHA (Índice de estimula- ción).	CPM incorporación de Células estimuladas con Aga (Índice de estimula- ción).	% De Supresión indu- cida por ConA. (Células estimuladas con PHA).	Índice de Supresión mediado por prostac- glándinas *
<u>Ratas sin inmunizar ni nebulizar</u>				
1	35,194±6900 (41.9)	- - -	38	1.2
2	4,064±1069 (19)	- - -	64	1.7
3	3,362±1126 (18.3)	- - -	65	1.6
4	46,972±4003 (27.19)	1497±701 (0.34)	51	1.03
5	43,993±1102 (25.3)	2150±79.3 (1.17)	40	1.01
6	6,039±388 (5.2)	3453±739 (0.79)	73	0.67
Promedio	23,604±21362 (22.8)	2366±995 (0.76)	55.16±14.3	1.2±0.38
<u>Ratas inmunizadas y nebulizadas</u>				
7	329±16.7 (1.18)	- - -	70	1
8	4388±1427 (87.76)	- - -	63	1.49
9	38018±9930 (75.1)	851±268 (0.46)	48	1.10
10	38470±3275 (28.75)	3462±634 (1.6)	58	1.19
11	54422±2735 (22.63)	512±178 (0.32)	62	0.99
12	13426±2208 (16.1)	968±845 (0.41)	79	1.03
13	36960±2662 (41)	2083±191 (0.72)	76	1.01
14	27896±1182 (33)	1616±173 (0.67)	70	0.88
15	22585±2077 (426)	- - -	13	1.02
16	5049±425 (33.4)	- - -	-10	1.2
Promedio	24154±18049 (38.1)	1581±1080 (0.69)	52.9±29.02	1.09±0.16

Tabla VI- Resumen de los resultados del modelo V.

* Índice de supresión mediado = $\frac{\text{CPM células mononucleares estimuladas con PHA con indometacina}}{\text{CPM células mononucleares estimuladas con PHA sin indometacina}}$

En este modelo, el uso de ratas hembras no dió el resultado esperado. Todos los animales presentaban pequeños focos inflamatorios.

Modelo Experimental VII

Los dos grupos de ratas, las inyectadas con paraquat y nebulizadas con Aqa y las inyectadas con paraquat y nebulizadas con BBF presentaban el mismo tipo de lesiones, caracterizadas por focos de fibrosis; este tipo de alteración estructural pulmonar es típica de las producidas por el paraquat, como ha sido previamente informado (46).

Modelo Experimental VIII

No hubo diferencias desde el punto de vista morfológico entre los tres grupos estudiados; se observaron lesiones multifocales de distribución irregular constituidas por acumulos principalmente de linfocitos y escasos macrófagos en las luces alveolares.

Modelo Experimental IX

En los animales que fueron inmunizados con Spa y ACF y posteriormente nebulizados con Spa, se encontraron lesiones granulomatosas, con macrófagos, células gigantes y

linfocitos predominantemente de localización subpleural. Sin embargo, al analizar los controles que se inmunizaron con ACF más PBS y se nebulizaron con PBS, observamos el mismo tipo de lesiones, lo que demuestra que éstas habían sido producidas por el adyuvante.

Los pulmones de los animales que fueron inmunizados con SPA sin adyuvante y nebulizados con SPA fueron normales.

Modelo Experimental X

Los animales inmunizados con hidróxido de aluminio más SPA y nebulizados con SPA, presentaron escasas zonas focales de neumonitis, con células inflamatorias, principalmente neutrófilos y linfocitos. Los controles de inmunización eran normales.

Modelo Experimental XI

Finalmente, en este modelo realizado en cobayos, se observaron pequeñas zonas focales de neumonitis, con células inflamatorias, principalmente neutrófilos y linfocitos.

RESULTADOS EN HUMANOS

El Porcentaje de supresión inducida por Con A en los pacientes con AAE fué de 29.6 ± 15.3 ; los contactos sanos presentaron un porcentaje de supresión de 46.08 ± 15.2 , y en los normales se encontró un porcentaje de 61.25 ± 9.3 . (Fig 6) Las diferencias fueron significativas entre pacientes y contactos sanos ($p < 0.05$), entre contactos sanos y normales ($p < 0.05$); y entre normales y pacientes ($p < 0.05$).

En el estudio de supresión mediada por prostaglandinas los pacientes presentaron un índice de 1.31 ± 0.18 , los contactos sanos de 1.14 ± 0.18 y los normales de 1.08 ± 0.12 . (Fig.7). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y los contactos sanos $p < 0.05$, entre pacientes y normales también hubo diferencias significativas $p < 0.01$; sin embargo entre contactos sanos y normales no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

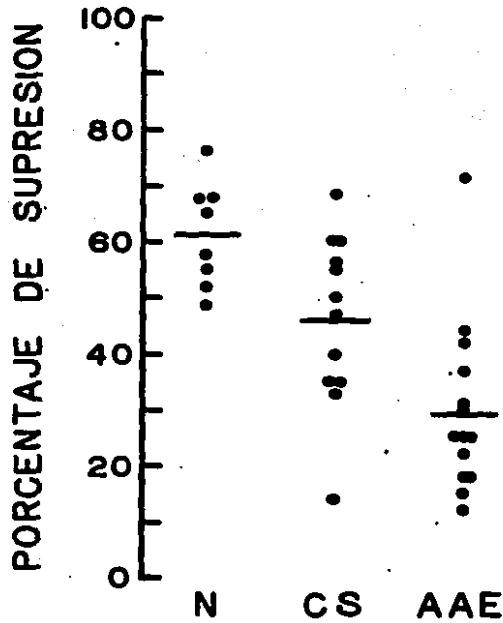


Figura 6. Porcentaje de supresión inducida por Concanavalina A. N = Normales, CS = Contactos sanos, AAE = Pacientes con Alveolitis alérgica extrínseca.

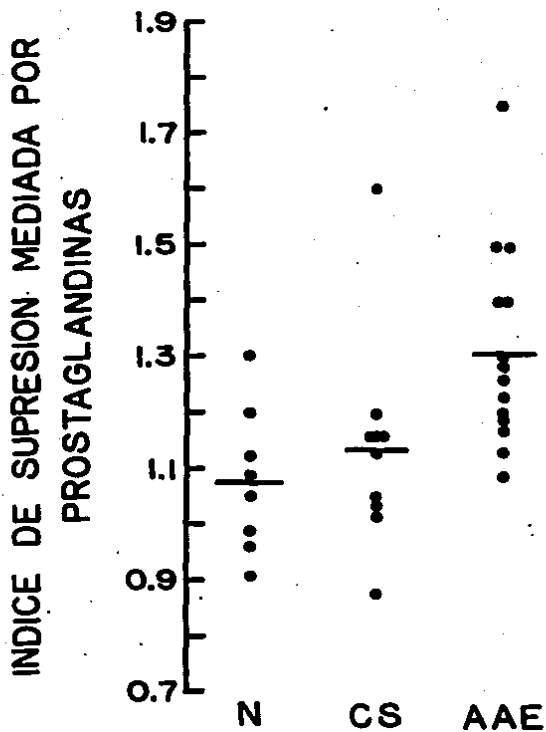


Figura 7. Índice de supresión mediada por prostaglandinas. N = Normales, CS = Contactos sanos, AAE = Pacientes con Alveolitis alérgica extrínseca.

DISCUSION

La AAE está probablemente mediada por una compleja serie de eventos interrelacionados, donde el papel principal parece estar desempeñado por hiperreactividad inmunológica celular, pero cuyos mecanismos desencadenantes no han podido ser precisados.

Una forma posible de estudio secuencial de las alteraciones, desde un tiempo cero hasta que la enfermedad se ha desarrollado completamente, es por medio de un modelo experimental adecuado. En este sentido, un buen modelo experimental debería presentar por lo menos las tres características básicas siguientes:

- a) Inflamación intersticial difusa de predominio mononuclear, y los demás cambios descritos en la enfermedad humana (4).
- b) Lesiones desencadenadas después de la exposición repetida a un antígeno, (relación causa-efecto).
- c) Modelo reproducible.

Si se analizan cuidadosamente los modelos publicados en la literatura, es obvio que hasta el momento no se ha podido

desarrollar un modelo satisfactorio de AAE. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones:

a) La gran cantidad de modelos que se han intentado, incluyendo diferentes antígenos, distintas formas de inmunización y varias especies animales. Si ya existiera un buen modelo de esta enfermedad y fuera reproducible en cualquier laboratorio, probablemente este sería utilizado por la comunidad científica interesada en este padecimiento como ocurre p.e. con el modelo de cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, que a pesar de tener algunas limitaciones, presenta muchas similitudes bioquímicas y morfológicas con la cirrosis humana y es fácilmente reproducible.

b) El análisis de las ilustraciones que aparecen en los artículos que utilizan algún modelo de AAE muestra tres deficiencias.

1) Una parte de los artículos no tienen fotos morfológicas (alrededor del 33%).

2) En varias publicaciones donde aparecen microfotografías de las lesiones están tomadas a grandes aumentos, lo cual no permite tener una visión panorámica del resto del parénquima.

3) En los modelos en donde se muestran microfotografías a pequeños aumentos, las lesiones son habitualmente focales, o bien no corresponden a los tipos de alteraciones histológicas características de la AAE.

Nosotros hemos intentado obtener un buen modelo experimental de AAE, que nos permitiera realizar un estudio morfológico e inmunológico secuencial y aunque los dos primeros modelos mostraron algunos resultados alentadores, después ya no pudieron ser repetidos. Los cambios en la concentración y el tipo de antígeno, en el tiempo de exposición, en el adyuvante utilizado, en el sexo, en la especie animal y en las cepas respectivas no mejoraron los resultados.

Esta situación podría deberse cuando menos a dos hechos:

1.- Que la AAE sea un padecimiento que, por lo menos cuando es inducido por el AgA, sea especie-específico y en este sentido, que el humano sea el mamífero más susceptible; en apoyo a esta idea está la observación de que solo se ha descrito un modelo natural de AAE, en ganado vacuno e inducido por un antígeno particulado, la Mycrosporidium faeni (49); además, esta observación no ha sido repetida ni en el ganado vacuno ni en ninguna otra especie. Una situación similar se ha encontrado en otras enfermedades como la lepra y la cisticercosis humana, que además de

tener al hombre como huésped, su existencia fuera de él se encuentra limitada a una sola especie (50,51).

2.- Que la AAE sea una enfermedad que se dé con poca frecuencia, aún en poblaciones altamente expuestas y de hecho en humanos hay familias de varios miembros, donde sólo uno se enferma, y familias expuestas donde no se enferma ninguno, a pesar del tiempo e intensidad de la exposición al antigéno. Si esto sucediera en los animales, para conseguir un número significativo de éstos con alveolitis se tendría que usar grandes números, además de conocer al mamífero no humano más susceptible, para obtener un número significativo de enfermos.

Sin embargo, nuestros ensayos en modelos experimentales mostraron algunas modificaciones inmunológicas interesantes que aunque deben de ser tomadas con cautela nos sirvieron de apoyo para los estudios realizados en humanos. Entre estas observaciones destacan:

a) En el modelo I los linfocitos de las ratas más lesionadas presentaban mayores índices de estimulación al cultivarse con un mitógeno inespecífico, lo que nos llevó a sugerir que probablemente hubiera diferencias en la respuesta supresora y para estudiar este aspecto diseñamos

los experimentos de supresión inducida por Concanavalina A y la mediada por prostaglandinas.

b) En este mismo contexto, en el modelo IV los animales agredidos aumentaron su actividad supresora casi al doble, en relación a los controles y presentaron lesiones mínimas, lo cual era fuertemente sugestivo de que esta podía ser una respuesta de defensa frente a la exposición repetida al antígeno. De hecho, como se verá más adelante estos animales se comportaron como los contactos humanos sanos.

c) Otro fenómeno que "se vió entre líneas" en estos modelos es que el AgA, además de provocar una respuesta específica, parece tener un débil efecto mitogénico inespecífico, lo cual podría contribuir como un mecanismo de daño pulmonar.

Finalmente otra observación importante que se derivó de estos modelos experimentales es que la respuesta inmune humoral no parece desempeñar un papel en el desarrollo de la enfermedad, dado que independientemente del diseño del modelo, los animales invariablemente hicieron anticuerpos contra varios componentes del AgA y no desarrollaron el padecimiento. Este hallazgo está de acuerdo con el escaso papel que hoy se le atribuye a la respuesta inmune humoral en la patogenia de la AAE humana (52).

Por otro lado los resultados obtenidos en los pacientes con AAE, en los contactos sanos y en los sujetos normales permiten sugerir un papel en la regulación de la respuesta inmune para el desarrollo de esta enfermedad, como se mencionó en los resultados la mayoría de los enfermos tenía una disminución en su actividad supresora inducida por Con A (29.6 ± 15.3). El porcentaje de supresión bajo era independiente del tiempo de exposición al antígeno.

El hecho de que algunos de los contactos sanos tuvieran el porcentaje de supresión bajo y otros normal (5 de 10 lo tenían menor a 45%) parecería apoyar que la disminución de la supresión precede a la enfermedad. Aunque no podemos saber a largo plazo cual fué la evolución de los contactos sanos que nosotros estudiamos porque, además de que se necesitaría efectuar un seguimiento de éstos a largo plazo, el contacto con el antígeno siempre se suspende, pues estos individuos son familiares de los pacientes y la primera recomendación que se les hace es que eviten la exposición a éste.

Así, aunque no podemos asegurar que el efecto de la supresión disminuida es causal en base a éste estudio puntual, los resultados de manera indirecta lo sugieren, ya que la mitad de los pacientes fueron contactos sanos por un

tiempo largo y se puede inferir que su comportamiento en relación a la actividad supresora fué similar a la de los sujetos asintomáticos en éste estudio.

Por otro lado existen otras enfermedades que tienen en su patogenia un fondo inmunopatológico, como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, etc (33,35), en las cuales también se ha demostrado una baja en la actividad supresora similar a la de este estudio; tomando todas estas observaciones en conjunto, podemos suponer que tal anomalía ocurre en la AAE, y que posiblemente la precede. De esta manera, la pérdida en el equilibrio entre las actividades inmunes supresora y la actividad facilitadora podría explicar (al menos parcialmente) la hiperreactividad humoral y celular característica de este padecimiento.

En relación al posible mecanismo por el cual la Con A induce la actividad supresora existen varias hipótesis apoyadas en diferentes estudios experimentales. Por ejemplo, en linfocitos humanos se han aislado y caracterizado dos factores solubles liberados por células reguladoras, que además de ejercer su función inhibitoria por la interacción célula-célula, producen sobrenadantes con actividad supresora (53,53,55). En 1986 Morimoto et al, determinaron por medio de anticuerpos monoclonales que las

moléculas 2H4 de las células T activadas con Con A desempeñan un papel en la generación de supresión, demostrando que las células supresoras activadas con Con A pertenecen a la subclase 2H4

(56). En animales también se ha descrito e intentado caracterizar este sistema supresor (57). En ratones Balb/c linfocitos de timo activados "in vitro" e "in vivo" con Con A, suprimen la respuesta proliferativa de linfocitos en cultivo mixto (58). Así mismo, en ratas Brown Norway, se encontró que el sobrenadante de células de bazo estimuladas con Con A era capaz de producir supresión y/o facilitación de la respuesta inmune dependiendo de la dosis utilizada (59). Finalmente, en ovinos se ha demostrado que las células de sangre periférica y células mononucleares de ganglios linfáticos tratados con dosis mitogénicas de Con A, inducen la producción de células supresoras que disminuyen la respuesta proliferativa a la estimulación de diversos mitógenos (60).

En relación a la actividad supresora mediada por prostaglandinas, esta fue descrita por primera vez en células adherentes al vidrio (61). Pruebas posteriores han sugerido que está mediada por macrófagos (62). Aunque el mecanismo de acción por el cual estas moléculas producen supresión no ha sido completamente elucidado, diversos

trabajos sugieren que las prostaglandinas actúan sobre una célula T induciendo en ella la liberación de dos factores solubles, los cuales serían responsables de la supresión (63,64).

Sorprendentemente, en nuestro estudio los pacientes presentaron un ISMP = 1.31 ± 0.18 , los contactos sanos de 1.14 ± 0.18 y los normales de 1.08 ± 0.12 . El incremento de este índice en los pacientes puede interpretarse de dos formas: a) que se deba como lo ha sugerido Goodwin (65), a la existencia de una relación inversa entre la actividad de las células activadas por Con A y las células productoras de prostaglandinas. En apoyo a esta hipótesis se encuentran dos trabajos publicados recientemente, uno realizado en enfermedad de Hodgkin, y otro en esclerosis sistémica progresiva, en las cuales se observó un fenómeno similar (37,66), probablemente el aumento de las prostaglandinas en sangre periférica podría ser un mecanismo compensatorio para que se incremente la actividad supresora local. b) el exceso de producción de prostaglandinas constituye un mecanismo de defensa que presenta el enfermo como respuesta a la agresión para evitar el inicio de la fibrogénesis. Como se ha demostrado recientemente, la AAE al igual que cualquier otra enfermedad pulmonar intersticial difusa, puede evolucionar en algunos casos hacia la fibrosis. Los

mecanismos anti-fibrogénicos son muy complejos y la mayoría de ellos en la actualidad aún no se conocen. No obstante, en términos generales tres eventos deben suceder para que se desarrolle la fibrosis pulmonar, que son proliferación de fibroblastos, aumento en la síntesis de colágena y disminución de la actividad colagenolítica. En este sentido se conoce que las prostaglandinas actúan sobre estos tres mecanismos, inhibiendo la proliferación de fibroblastos, disminuyendo la síntesis de colágena y aumentando la producción de colagenasa, al menos "in vitro" (67,68).

Sin embargo es importante mencionar que estos estudios se realizaron en células de sangre periférica, y que probablemente lo que ocurre localmente en el pulmón pueda no correlacionarse con la respuesta periférica; en este sentido hay evidencias de que esto sucede en enfermedades como la sarcoidosis, donde existe anergia cutánea y disminución de linfocitos T periféricos mientras que en el pulmón se observan un incremento de los linfocitos T los cuales están activados.

El pulmón es un órgano que está constantemente en contacto con antígenos y en el que las interacciones entre las células locales son importantes para mantener el tono de

la respuesta inmune en un nivel adecuado ; aunque no se conocen con precisión los mecanismos supresores se sabe que estos desempeñan un papel importante en dicha función (69) . Así hay evidencias de que los macrófagos pulmonares tienen una fuerte capacidad supresora, y se piensa que esta supresión esta mediada por prostaglandinas (70). En este contexto se ha demostrado que la administración sistémica de prostaglandinas provoca una disminución de formación de granulomas en un modelo de lesión pulmonar con huevos de Schistosoma mansoni (71). Por otro lado en ratones que genéticamente son susceptibles de formar gránulomas al ser inyectados por vía intratraqueal con BCG, se encuentra en las lesiones un aumento significativo en la producción del factor inhibidor de la migración de macrófagos y la interleucina 1 (72).

Actualmente no sabemos con precisión lo que ocurre en el caso de la AAE por lo que es necesario realizar experimentos con células locales con el fin de observar lo que ocurre en microambiente donde se produce la enfermedad, esto complementará la información que se tiene de los experimentos diseñados con células de sangre periférica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- García-Procel E., Selman M. (1975) Alveolitis Alérgica Extrinseca. Rev. Neumol. Cir. Torax (Mex) 36:109-116.
- 2.- Fink J.N. (1976) Hypersensitivity Pneumonitis. En Kirkpatrick C., Reynolds HY (eds.) Immunologic and infectious reactions in the lung . New York, Marcel Dekker.
- 3.- Selman M., Chapela R., Terán L., Hernández C., Salas J., Barquín N., Martínez E. (1985) Alveolitis alérgica extrínseca. Retrospectiva y Perspectiva . Arch. Bronconeumol. 21(3):118-123.
- 4.- Hensley G., Garancis J., Chevaryl B., Fink J.N. (1969) Lung biopsies of pigeon breeders' disease. Arch. Pathol. 87:575-578.
- 5.- Kawanami D., Basset F., Barrios R., Lacroinque J., Ferrans N., Crystal R. (1983) Hypersensitivity pneumonitis in man. Light and electron microscopic studies of 18 lung biopsies. Am. J. Pathol. 110:275-282.
- 6.- Martínez E., Bessudo A., Treviño S.C., Terán L., Selman M. (1987) Circulating autoantibodies in pigeon breeders' disease. Allergol. et Immunopathol. (enviado a publicación)
- 7.- Boyd G., Mc Sharry C.P., Banham S.W., Lynch P.P. (1982) A current view of pigeon fanciers' lung. A model for

pulmonary extrinsic allergic alveolitis. Clin. Allergy 12:53-59.

8.- Fink J.N., Sosman A., Salvaggio J., Barboriak J. (1971) Precipitins and the diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. J. Allergy 48:179-184.

9.- Gerard J., Wurstenberger B., Fernández B. (1978) Analysis of cell-mediated hypersensitivity, immune complexes and monocyte released factors in Allergic alveolitis and asymptomatic exposed subjects. Clin. Allergy 8:455-461.

10.- Moore V.L., Fink J.N., Barboriak J.J., Ruff L.L., Schlueter D.P. (1974) Immunologic events in pigeon breeders' disease. J. Allergy Clin. Immunol. 53(6):319-328.

11.- Chapela R., Egufa J., Selman M. (1979) Estudio de la albúmina, inmunoglobulinas y electrolitos en lavado bronquial de pacientes con Fibrosis pulmonar idiopática y Alveolitis alérgica extrínseca. Rev. Invest. Clin. INN 31: 35-39.

12.- Leatherman J., Michael A., Schwartz B., Hoidal J. (1984) Lung T cells in Hypersensitivity Pneumonitis. An. Intern. Med. 100:390-392.

13.- Costabel U., Bross K., Marxen J., Matthys H. (1984) T lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of Hyper_sensitivity Pneumonitis. Chest 85 (4):514-518.

- 14.-Reynolds H.Y., Fulmer J.D., Kasmierowski J.A., Roberts W.C., Frank M.M., Crystal R.G. (1977) Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients from idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin Invest.* 59:165-175.
- 15.- Selman M., Chapela R., Torres M., Barquin N., Terán L., (1982) Heterogeneidad de la historia natural de la Alveolitis alérgica extrínseca. *Rev. Neumol. Cir. Torax (Mex)* 43: 15-22.
- 16.- Miyamoto T., Kabe J. (1971) The lung as the site of delayed-type hypersensitivity reactions in guinea pigs. *J. Allergy* 47(3):181-185.
- 17.- Unanue E.R., Benacerraf B. (1973) Immunologic events in experimental hypersensitivity granulomas. *Am. J. Pathol.* 71(3):349-359.
- 18.- Hensley G.T., Fink J.N., Barboriak J.J. (1984) Hypersensitivity Pneumonitis in the monkey. *Arch. Pathol.* 97:33-38.
- 19.- Salvaggio J., Phanuphak P., Stamford R., Bice D., Claman H. (1975) Experimental production of granulomatous pneumonitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 56(5):364-379.
- 20.- Santives T., Roska K., Hensley G., Moore V., Fink J., Abramoff P. (1976) Immunologically induced lung disease in guinea pigs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 57(6):582-594.

- 21.- Joubert J.R., Asch K., Moroz A.L., Hogg C.J. (1976) Acute hypersensitivity pneumonitis in the rabbit I. An animal model of horseradish peroxidase as an antigen. Am. Rev. Respir. Dis. 113: 503-513.
- 22.-Barboriak J.J., Knoblock H.W., Hensley G.T., Gombas D.F., Fink J.N. (1976) Animal model of sensitization by inhalation. Clin. Exp. Immunol. 24:542-545.
- 23.- Willoughby W., Willoughby J., Cantrell B., Wheelis R., (1979) In vivo response to inhaled proteins. II Induction of Interstitial pneumonitis and enhancement of immune complex-mediated alveolitis by inhaled Con A. Lab. Invest. 40(3):399-414.
- 24.- Richerson H., Bueksler M., Swanson P., Butler J., Kopp W., Rose E. (1982) Chronic hypersensitivity pneumonitis produced in the rabbit by adjuvant effect of inhaled MuramylDipeptide (MDP). Am. J. Pathol 106:409-420.
- 25.- Calvanico N.J., Ambegaonkar S., Geoghegan W.D., Careyhanly W., (1984) Analysis of rabbit lung lavage immunoglobulins during the course of pulmonary inflammation induced with aerosolised antigen. Clin. Exp. Immunol. 56:302-310.
- 26.- Calvanico N.J., Garancia J.C. (1985) Specificity and duration of post-inflammatory suppression in the rabbit lungs

challenged with aerosolised antigen. Clin. Exp. Immunol. 59:336-342.

27.- Bice D.E., Salvaggio J., Hoffman E. (1976) Passive transfer of experimental hypersensitivity pneumonitis with lymphoid cells in the rabbit. J. Allergy Clin. Immunol. 58(2):250-262.

28.- Peterson L.H., Braley J.F., Calvanico N.J., Moore V.L. (1979) An animal model of hypersensitivity pneumonitis in the rabbits. Development of chronic pulmonary inflammation and cell-mediated hypersensitivity after repeated aerosol challenge. Am. Rev. Respir. Dis. 119:991-999.

29.- Schuler M.R., Schmitt D. (1984) Experimental hypersensitivity pneumonitis: Lack of tolerance. Am. Rev. Respir. Dis. 130:772-777.

30.- Rittner C., Bannenkamp J., Mollenhauer E. (1983) Pigeon breeders' association with HLA-DR3. Tissue Antigen 21:373-379.

31.- Muers M., Faux J., Ting A., Morris P. (1982) HLA A,B,C, and HLA DR-4 antigens in extrinsic allergic alveolitis (bugdgerigar fanciers' lung disease). Clin. Allergy 21: 47-53.

32.- Selman M., Terán L., Mendoza A., Camarena A., Martínez-Cordero E., Lezama M., Rubio H. (1987) Increase of

HLA-DR7 in Pigeon Breeders' Lung in a Mexican population. Clin. Immunol. Immunopathol. 44:63-70.

33.- Frajman M., Diaz-Jouanan E., Alcocér-Varela J., Fishbein E.), Guevara M., Alarcón-Segovia D. (1983) Effect of pregnancy on function of circulating T-cells from patients with Systemic Lupus Erythematosus: correlation of T-cell suppression and autologous mixed lymphocyte responses. Clin. Immunol. Immunopathol. 29:94-102.

34.- Mehra V., Mason LL. H., Fields J., Bloom B. (1979) Lepromin-induced suppressor cells in patients with Leprosy. J. Immunol. 123(4):1813-1817.

35.- Bakane T., Takada S., Murakawa Y., Kotani., Honda M., Veda Y. (1982) Analysis of suppressor T cell function in patients with Rheumatoid Arthritis: Defects in production of a responsiveness to Concanavalin A-induced suppressor T-cells. J. Immunol. 129(5):1972-1977.

36.- Muraguchi A., Tachibana T., Miki Y., Kuritani T., Kishi H., Kishimoto T. (1982) Depressed functions of T-cells and the presence of suppressor macrophages in patients with Sarcoidosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 23:189-201.

37.- Haim N., Meidav A., Samuelly B., Segal R., Mekori T., Robinson E. (1984) Prostaglandin-related and adherent cell suppressor system in apparently cured Hodgkins' disease patients. J. Biol. Res. Mod. 3:219-225.

38.- Humes J.L., Bonney R.J., Pelus L., Dahlgren M.E., Sadowski S.J., Kuehl F.A., Davies P. (1977) Macrophages synthesize and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 269:149-157.

39.- Boyum A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(Suppl. 97):77.

40.- Shou L., Schwartz S.A., Good R.A. (1976) Suppressor activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. *J. Exp. Med.* 143:1100-1108.

41.- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

42.- Duchterlony D. (1968) en: *Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis.* Ann Arbor Sci. Pub. Ann Arbor Michigan.

43.- Waithe W.I., Hirschorn K. (1967) Lymphocyte response to activators en: *Handbook of Experimental Immunology. Vol 2 Cellular Immunology* Ed. D.M. Weir.

44.- Rojkind M., Gonzales E. (1971) An improved method for determining specific radioactivities of prolin 14-C and

hydroxyproline 14-C in collagen and noncollagenous proteins. Anal. Biochem. 57(17):1-7.

45.- Phan S.H., Thrall R.S. (1981) The role of soluble factors in bleomycin induced pulmonary fibrosis. Am. J. Pathol. 106:156-164.

46.- Selman M., Montaño M., Montfort I., Pérez-Tamayo R. (1985) A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in the rat. Exp. Mol. Pathol. 43:375-387.

47.- Schrier D.J., Kunkel R.G., Phan S.H. (1983) The role of strain variation in murine bleomycin-induced Pulmonary fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis. 127:63-66.

48.- Rozig J., Vaessen M.B. (1979) Mitogen responsiveness in rats. Transplantation Proc. 11(3):1657-1659.

49.- Pirie H.M., Dawson C.D., Breeze R.G., Wiseman A., Hamilton J. (1971) A bovine disease similar to farmer's lung: Extrinsic allergic alveolitis. Vet. Res. 88:346-350.

50.- Storrs E.E. (1971) The nine-banded armadillo: A model for leprosy and other biomedical research. Int. J. Lepr. 39:704-714.

51.- Flisser A. (1985) Cysticercosis: A mayor threat to human, health and livestock production. Food Technol. 39(3):61-64.

52.- Salvaggio J.E., de Shizo R.D. (1986) Pathogenesis of Hypersensitivity Pneumonitis. Chest 89:190-193.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 53.- Fleisher T.A., Greene W.C., Blaese M.R., Waldman T.A. (1981) Soluble suppressor supernatants elaborated by Concanavalin A-activated human mononuclear cells. II Characterization of a soluble suppressor of B cell immunoglobulin production. J. Immunol. 126(3):1192-1197
- 54.- Greene W.C., Fleisher T.A., Waldman T.A. (1981) Soluble suppressor supernatants elaborated by Concanavalin A-activated human mononuclear cells. I. Characterization of a soluble suppressor T-cell proliferation. J. Immunol. 126(3):1185-1191.
- 55.- Salinas-Carmona M.C., Gery Russel P., Nussenblatt R. (1982) Mitogen-induced suppressor factor(s) from human lymphocytes: effects on lymphoid and nonlymphoid cells and biophysical properties. Cell. Immunol. 71:44-53.
- 56.- Morimoto C., Letvin N., Rudd C., Hagan M., Takeguchi T., Schlossman S. (1986) The role of the 2H4 molecule in the generation of suppressor function in Con A-activated T cells. J. Immunol. 137:3247-3253.
- 57.- Tadakanuma T., Kuhner A.L., Rich R.R., David J.R., Pierce C.W. (1976) Biological expressions of lymphocyte activation . V. Characterization of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by Concanavalin-A activated spleen cells. J. Immunol. 117(1):323-330.

58.- Rich R.R., Rich S.S. (1975) Biological expressions of lymphocyte activation IV Concanavalin A-activated suppressor cells in mouse mixed lymphocyte reactions. J. Immunol. 114(3_):1112-1115.

59.- Rocha B., Freitas A., Sousa M. (1979) Characterization of rat spleen-cell population. I. Cell interactions in the regulation of in vitro response to Concanavalin A. Immunology 36:619-627.

60.- Ellis J.A., Demartini C. (1985) Ovine concanavalin A-induced suppressor cells: generation assay, age-related effects and re-evaluation of mechanisms of suppression. Immunology 54:353-362.

61.- Goodwin J.S., Bankhurst A.D., Messner R.P. (1977) Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. J. Exp. Med. 146:1719-1733.

62.- Stenson W.F., Parker C.W. (1980) Partial characterization of a prostaglandin-induced suppressor factor. Cell. Immunol. 50:82-93.

63.- Rogers T.J., Campbell L., Calhoun K., Nowowojewski I., Webb D.R. (1982) Suppression of B-cell and T-cell responses by prostaglandin-induced T-cell derived suppressor (PITS). I Analysis of the PITS factor. Cell Immunol. 66:269-276.

- 64.- Rogers T.J., Nowowojewski I., Webb D.R. (1980) Partial characterization of a prostaglandin-induced suppressor factor. *Cell Immunol.* 50:82-93.
- 65.- Goodwin J.S. (1980) Modulation of Concanavalin A-induced suppressor cell activation by prostaglandins E2. *Cell Immunol.* 49:421-425.
- 66.- Krawitt E.L., Holdstock G., Bland J.H., Chastenay B.F., Albertini R.J. (1982) Suppressor cell activity in Progressive Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* 9:263-267.
- 67.- Korn J.H., Halushka P.V., Le Roy E.C. (1980) Mononuclear cell modulation of connective tissue function. Suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J. Clin. Invest.* 65:543-554.
- 68.- Wahl S.W., Wahl L.M., (1985) Regulation of macrophage collagenase, prostaglandin, and fibroblast-activating-factor production by anti-inflammatory agents: different regulatory mechanisms for tissue injury repair. *Cell. Immunol.* 96:302-312.
- 69.- Reynolds H.Y. (1986) Lung immunology and its contribution to the immunopathogenesis of certain respiratory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78:833-847.

70.- Holt P.B. (1986) Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract: the role of alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol. 63:261-270.

71.- Chensue E.W., Kunkel S.L., Ward P.A., Higashi B.J. (1983) Exogenously administered prostaglandins modulate pulmonary granulomas induced by Schistosoma mansoni eggs. Am. J. Pathol. 111:78-87.

72.- Kobayashi K., Allred C., Castriotta R., Yoshida T. (1985) Strain variation of bacillus Calmette-Guérin-induced pulmonary granuloma formation is correlated with anergy and local production of migration inhibition factor and Interleukin 1. Am J. Pathol. 119:223-235.