



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Características fisiopatológicas de los pulmones de  
cobayos alérgicos con respuestas obstructivas variables a  
los retos antigénicos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:**

**SILVIA FERNANDA GUERRERO CLORIO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

### 1. Datos del alumno

Guerrero  
Clorio  
Silvia Fernanda  
5516466104  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309086961

### 2. Datos del tutor

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 2. Datos del tutor

Dra  
Blanca Margarita  
Bazán  
Perkins

### 3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3. Datos del sinodal 1

Dra  
Alicia  
Cruz  
Martínez

### 4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### Datos del sinodal 2

Dra  
María Sandra  
Cabrera  
Benítez

### 5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5. Datos del sinodal 3

M en C  
Mayra Dinorah  
Álvarez  
Santos

6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

M en C  
Georgina  
Nieto  
Castañeda

7. Datos del trabajo escrito.

Título

7. Datos del trabajo escrito.

Características fisiopatológicas de  
cobayos atópicos con respuestas  
obstructivas variables a los retos  
antigénicos

Subtítulo

Número de páginas

Año

36

2018



FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Características fisiopatológicas de los pulmones de cobayos atópicos con respuestas obstructivas variables a los retos antigénicos**

realizado por **Silvia Fernanda Guerrero Clorio** con número de cuenta **309086961** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Alicia Cruz Martínez

Propietaria Dra. María Sandra Cabrera Benítez

Propietaria Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins  
Tutora

Suplente M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos

Suplente M. en C. Georgina Nieto Castañeda

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 21 DE AGOSTO DE 2017

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres Silvia Clorio Velázquez y Jorge Guerrero Pacheco por todo el apoyo incondicional, por su tiempo, amor y por la educación que me brindaron, por ser como son ya que así he llegado hasta este punto, gracias por todo.

A mis hermanos por su confianza, por el apoyo que siempre me brindaron día a día, por estar a mi lado y más que hermanos son mis verdaderos amigos.

A Rodrigo Zavala Ramírez por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida sino en todo momento y que ha estado conmigo incluso en los momentos más complicados, siempre motivándome y ayudándome, gracias por tanto amor que me brindas. ZRTAM

A la Doctora Blanca Margarita Bazán Perkins quien tuvo la paciencia para lograr culminar este proyecto, agradezco el tiempo que me brindó y el conocimiento que me ha estado transmitiendo, le agradezco, por tanto.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por darme un espacio para poder desarrollar este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y ofrecerme tanto en esta gran casa de estudios, más que escuela, mi casa, por formarme como profesionalista y permitirme ser parte de ella.

A mis amigos por su cariño, apoyo y grandes consejos que me brindan a cada momento.

## ÍNDICE

Resumen .....	1
1. Introducción .....	3
1.1. Vías aéreas .....	3
1.2. Asma .....	4
1.2.1. Obstrucción de las vías aéreas .....	6
1.2.2. Hiperreactividad de las vías aéreas .....	7
1.3. El cobayo como modelo de asma .....	8
1.3.1. El cobayo .....	8
1.3.2. Modelo de asma en cobayos .....	9
1.3.3. Cobayos no respondedores al reto antigénico .....	9
2. Justificación .....	11
3. Hipótesis .....	11
4. Objetivos .....	11
4.1. Objetivo general .....	11
4.2. Objetivos particulares .....	11
5. Materiales y métodos .....	12
5.1. Diseño de estudio .....	12
5.2. Procedimiento de sensibilización, refuerzo y retos antigénicos .....	13
5.3. Pletismografía barométrica .....	13
5.4. Reactividad de las vías aéreas a la histamina inducida por antígeno .....	15

<b>5.5. Análisis histológico.....</b>	<b>16</b>
<b>5.6. Reactivos.....</b>	<b>17</b>
<b>5.7. Análisis estadístico .....</b>	<b>17</b>
<b>6. Resultados.....</b>	<b>18</b>
<b>6.1. Respuestas bronco-obstructivas después del reto antigénico en cobayos sensibilizados .....</b>	<b>18</b>
<b>6.2. Reactividad de las vías aéreas inducida por antígeno .....</b>	<b>22</b>
<b>7. Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>31</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>32</b>



## RESUMEN

Para el estudio del asma se han desarrollado varios modelos experimentales que en su gran mayoría corresponden al asma de tipo alérgico. Uno de los modelos más antiguos es el modelo de asma en cobayo (*Cavia porcellus*), y algunas de sus ventajas son la susceptibilidad a desarrollar respuestas tempranas y tardías después del reto al alérgeno. Además, el modelo de asma en cobayos es útil ya que la anatomía de las vías aéreas y la respuesta a los mediadores inflamatorios en éste modelo animal es similar al asma que se observa en humanos.

En múltiples reportes se ha descrito que las respuestas de bronco-obstrucción en el modelo de asma en el cobayo son variables. En los pocos estudios donde se analiza ésta variabilidad, se han descrito cobayos que nunca responden al reto antigénico y se les ha llamado cobayos no respondedores o NR. Los cobayos NR no sólo tienen una respuesta fisiológica diferente a los cobayos del modelo de asma, sino que también presentan diferencias en el perfil de células inflamatorias presentes en el pulmón. Por ejemplo, los cobayos del modelo de asma siempre presentan células Th2 y eosinófilos mientras que los cobayos NR presentan linfocitos Treg, Th1 y neutrófilos. Otra característica de los cobayos NR crónicos, es decir que han recibido un mayor número de retos antigénicos, es que carecen de hiperreactividad de las vías aéreas. Además, hemos observado otro tipo de cobayos que tienen respuestas variables (RV) a lo largo de los retos antigénicos. Este grupo RV no ha sido estudiado. El **objetivo** de la presente investigación fue describir las características funcionales e inflamatorias de cobayos RV y compararlas con las de los cobayos del modelo de asma y NR. Para éste estudio se recopilaron datos de estudios realizados del 2008 al 2016 de cobayos machos sensibilizados y retados con ovoalbúmina de tres a doce veces cada diez días, con el fin de inducir una respuesta alérgica típica del asma. Los cobayos controles recibieron retos con solución salina. Las respuestas obstructivas obtenidas mediante pletismografía barométrica fueron analizadas y los cobayos se clasificaron en tres grupos: los que tuvieron obstrucción de la vía aérea en todos los retos antigénicos (modelo de

asma), los NR y RV. Los resultados de este análisis mostraron que en el periodo de estudio el 43% de los cobayos fueron del modelo de asma, un 8% murió durante el reto antigénico, un 29% fueron RV y un 20% NR. El promedio de las respuestas máximas de obstrucción de las vías aéreas alcanzadas durante el reto antigénico por los cobayos del modelo de asma fueron significativamente mayores que la de los NR y controles ( $P<0.05$ ), pero no se diferenció de los RV. Las respuestas de los RV retados doce veces mostraron que los cobayos respondieron de dos hasta ocho veces durante los retos. Los cobayos RV que respondieron en el último reto antigénico tuvieron una reactividad de las vías aéreas a la histamina similar a la de los controles y a la de los cobayos RV que no respondieron en este reto. Los cobayos del modelo de asma y los NR retados tres veces fueron hiperreactores a la histamina. En ningún grupo de cobayos se observaron cambios en la reactividad basal a la histamina. Los cobayos del modelo de asma, los NR que recibieron tres retos antigénicos y los controles de doce retos con solución salina mostraron eosinófilos en los bronquiolos. Los NR que recibieron doce retos antigénicos presentaron neutrofilia en alveolos. Los RV no mostraron ningún tipo de célula inflamatoria en el pulmón. Estos resultados sugieren que la respuesta bronco-obstructiva inducida por el reto antigénico en los RV no induce, ni hiperreactividad de las vías aéreas, ni inflamación en el pulmón.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Vías aéreas

El aparato respiratorio comprende un conjunto de órganos que conducen el aire hacia los sitios donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso. Los conductos donde transita el aire desde el exterior del organismo se llaman vías aéreas o vías respiratorias, y éstas se encargan de filtrarlo y calentarlo antes de llegar a los alvéolos que son los sitios de intercambio gaseoso (Sobotta *et al.* Welsch., 2008). Estructuralmente, las vías aéreas son como árboles invertidos donde el tronco representaría al conducto superior que inicia por la nariz, pasa por la faringe y la laringe hasta la tráquea donde inician los conductos inferiores o bronquios y bronquiolos, que serían como las ramas del árbol que se extienden de forma más numerosa y angosta conforme penetran en el pulmón (Picado., 1992; West., 2009; Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema de la porción conductora y respiratoria. Modificado de U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute, SEER 2017. <https://training.seer.cancer.gov/>.

Histológicamente las vías aéreas están revestidas con membranas mucosas. En algunas regiones, la membrana mucosa tiene pelos, como en la nariz, que ayudan a filtrar el aire. Otras regiones contienen cilios para propulsar el moco.

Un hecho importante es que la reducción del calibre de las vías aéreas es una gran limitante para el libre flujo de aire, y tiene como consecuencia la disminución de la función pulmonar (West., 2009). El estrecho calibre de las vías aéreas induce la limitación de las vías aéreas reduciendo de manera importante la función pulmonar siendo un componente común de muchas enfermedades incluyendo el asma (OMS., 2017).

## **1.2 Asma**

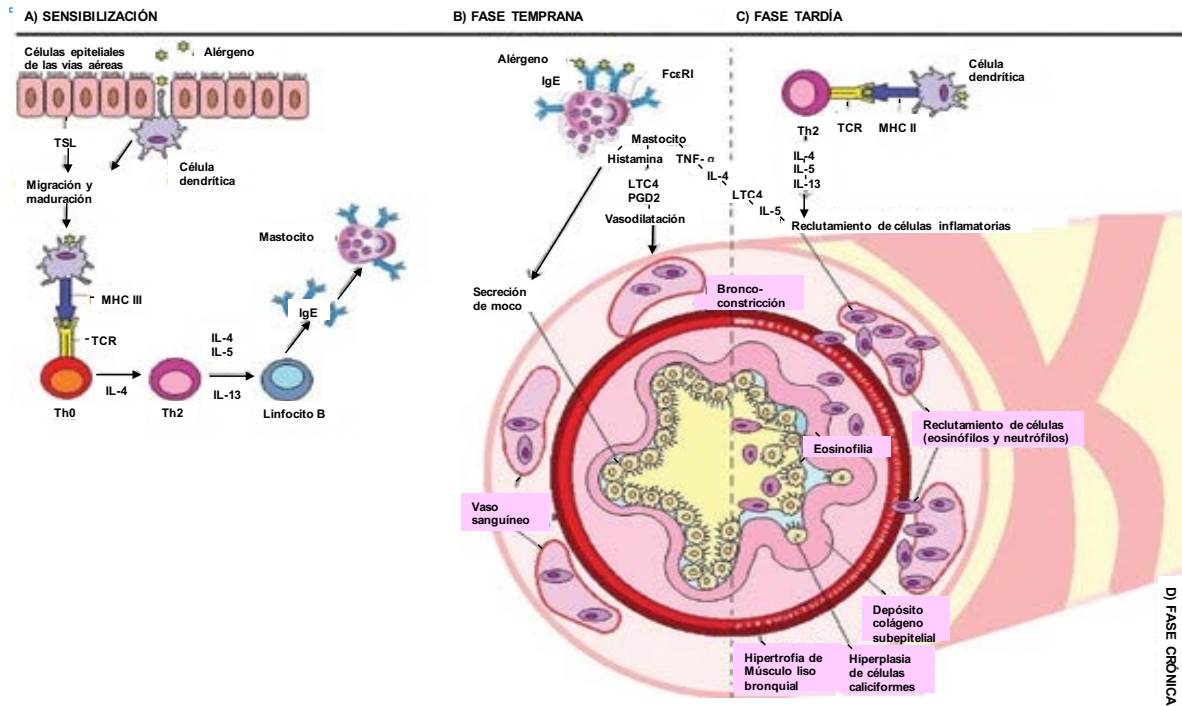
El asma es una enfermedad de las vías aéreas con muchos eventos patogénicos heterogéneos en los que la inflamación crónica de las vías aéreas y sus consecuencias juegan un papel principal. Durante una crisis de asma, el revestimiento de los bronquios se inflama y el músculo liso que rodea a los bronquios y bronquiolos se contrae, lo que provoca un estrechamiento de las vías aéreas y una disminución del flujo de aire que circula por los pulmones (Kim., 2010; GINA., 2017).

Las exacerbaciones del asma pueden ser desencadenadas por cualquier alérgeno identificable en el asma atópico o extrínseco o por desencadenantes no identificables en asma no atópico o intrínseco (Shin., 2009; Des ., 1993; GINA., 2017). Después de la exposición al alérgeno, la exacerbación del asma se caracteriza por una respuesta inmediata o temprana, seguida algunas horas después, por una respuesta tardía de larga duración (Picado., 1992; Lemanske., 2000; GINA., 2017). Sin embargo, las respuestas aisladas o tempranas se observan comúnmente. Asimismo, en algunos individuos la exposición al alérgeno puede inducir respuestas variables como una respuesta asmática atenuada e incluso puede desarrollarse tolerancia (Custovic *et al.*, 2002). En la actualidad, la variabilidad del asma se ha clasificado de acuerdo a los parámetros clínicos o fisiológicos, estímulos desencadenantes o fenotipos inflamatorios (GINA., 2017).

Muchos factores están asociados a la gran variabilidad de asma incluyendo genéticos, dosis del alérgeno, y grado de exposición o sensibilización (Alvarez-Puebla *et al.*, 2001). En consecuencia, la búsqueda de modelos animales capaces de reproducir manifestaciones múltiples de asma es fundamental.

Los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de asma incluyen factores que tienen que ver con el huésped (obesidad, genética y sexo) y factores ambientales como ácaros del polvo, contaminación del aire o caspa de los animales de compañía, alérgenos que se encuentran fuera de casa, como los pólenes o los mohos, humo del tabaco y contaminación atmosférica (OMS, 2017). Además, los aspectos de desarrollo como la maduración de la respuesta inmune, el desarrollo de la atopia y el momento de las exposiciones infecciosas durante los primeros años de vida están emergiendo como factores importantes que modifican el riesgo de asma en la persona genéticamente susceptible (Bazan - Perkins *et al.*, 2009). En el desarrollo del asma participan muchas células inflamatorias como mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T y células epiteliales (Fig. 2). Los mediadores inflamatorios liberados por estas células generan y mantienen un estado de inflamación crónica que induce bronco-obstrucción, hiperreactividad bronquial y cambios estructurales en las vías aéreas (Roldán *et al.*, 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en México, la prevalencia de asma es de 5% a 10% (INER., 2014), llegando a 4,000 muertes al año por esta causa (GINA., 2017).

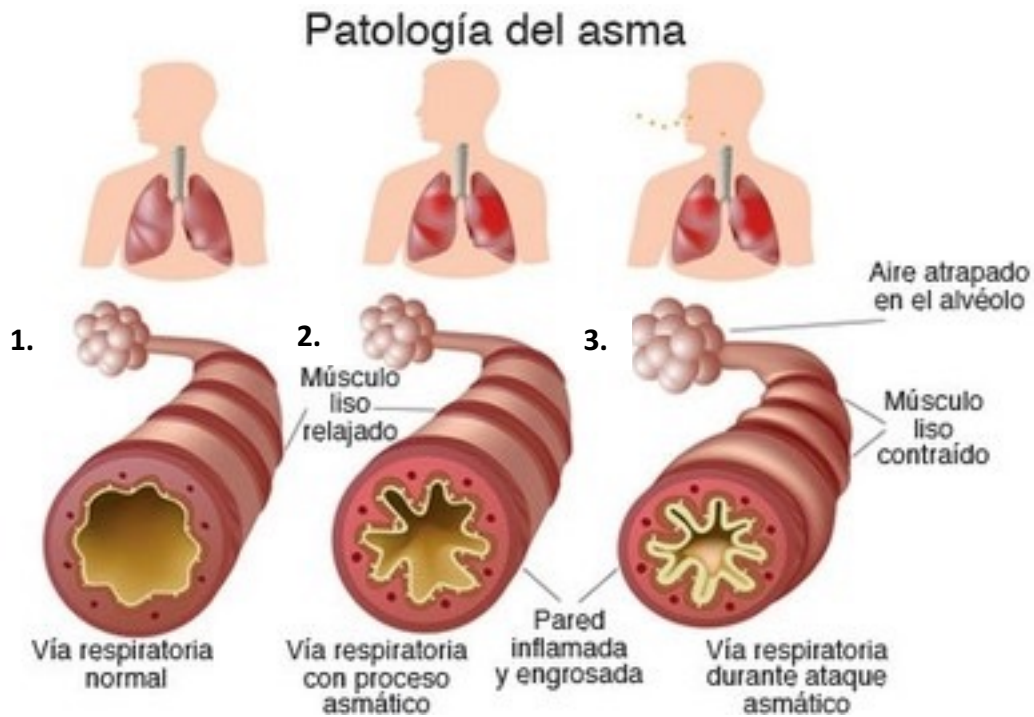


**Figura 2.** Esquema de los mecanismos inmunológicos involucrados en las diferentes etapas del asma alérgica. Modificado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67443217009>.

### 1.2.1 Obstrucción de las vías aéreas

Las crisis de asma se caracterizan por la reducción transitoria del calibre de las vías aéreas, proceso conocido como bronco-obstrucción o broncoespasmo. Ésta reducción induce la retracción elástica del tejido pulmonar o parénquima y cambia la relación volumen pulmonar y tiempo del ciclo respiratorio. Debido a que el calibre de las vías aéreas es menor en un individuo asmático (Fig. 3.), esto producirá una mayor resistencia al paso de aire y un flujo turbulento produciendo mayor dificultad en la respiración (Guyton., 2001).

Además del broncoespasmo transitorio, las crisis de asma se acompañan de edema en la pared bronquial, formación de tapones de moco, inflamación, y en procesos crónicos se han detectado cambios permanentes en la arquitectura del pulmón conocidos como remodelación de las vías aéreas (Hogg., 1993).



**Figura 3.** Se observa en la primer imagen un bronquio sano (1), en la segunda imagen un bronquio con obstrucción por moco que se da por los factores inflamatorios (2) y en la tercer imagen observamos cómo se comporta un bronquio durante un ataque (3). Modificado de Normal Breathing. 2017. [www.normalbreathing.com/d/bronchospasm.php](http://www.normalbreathing.com/d/bronchospasm.php)

### 1.2.2 Hiperreactividad de las vías aéreas

La hiperreactividad de las vías aéreas es una de las anomalías funcionales más importantes del asma, y resulta en el estrechamiento de las vías aéreas en respuesta a un estímulo físico o químico que sería inocuo en una persona sana. Esto provoca que las vías aéreas al estar estrechas, inducen a una importante limitación del flujo de aire variable y síntomas intermitentes. La hiperreactividad de las vías aéreas está relacionada tanto con la inflamación como con la reparación de las vías aéreas, y es parcialmente reversible con la terapia (GINA., 2017). Diversos estudios muestran que individuos que no padecen alguna enfermedad respiratoria también presentan hiperreactividad que describe un riesgo a desarrollar enfermedades de las vías aéreas, incluyendo asma (Obase., 2003).

### 1.3 El cobayo como modelo de asma

#### 1.3.1 El cobayo

*Cavia porcellus* es una especie doméstica de roedor perteneciente a la familia *Caviidae* conocida coloquialmente como cobayo y proviene originalmente de la región Andina de América del Sur. Los primeros experimentos documentados realizados en cobayos datan de 1780 y desde entonces los cobayos han desempeñado un papel fundamental en el estudio epidemiológico y el desarrollo farmacéutico del asma (Terril., 1998).

Los cobayos hembra alcanzan la pubertad a las seis semanas mientras que los machos entre las nueve y diez semanas. Una vez que las hembras llegan a la madurez sexual entran en celo aproximadamente cada 16 días. Se alcanza el peso adulto de los entre los ocho a los doce meses de edad, y los machos llegan a pesar 1200g mientras que las hembras hasta 900g (Hubrecht., 2010). El periodo de gestación de las hembras es de entre 59 y 72 días y cada camada tiene un promedio de tres a cuatro crías, con un peso de 60 a 120g (Terril., 1998).

Los cobayos nacen con los ojos abiertos y son capaces de asimilar alimento sólido a pocas horas de su nacimiento. La radiación UVB es utilizada para crear vitamina D aunque para los cobayos no se sabe si ésta pueda ser esencial (Watson *et al.*, 2014). Requiere en cantidades mayores ácido fólico y menores cantidades de vitamina D con una necesidad de consumir 10 mg/kg de vitamina C diariamente (Richardson., 2000).

Al igual que los mamíferos, los pulmones de los cobayos, están conformados por lóbulos, tres en el pulmón derecho y dos en el izquierdo. Estos lóbulos a su vez se subdividen en segmentos más pequeños (por ejemplo, segmento inferior, superior o medio) (Chummy., 2003). A su vez dentro de los lóbulos pulmonares discurre un sistema tubular bronquial. Es decir, los bronquios principales, izquierdo y derecho, se van subdividiendo, disminuyendo progresivamente su diámetro, en bronquios, bronquiolos y alveolos (Latarjet., 2007).



### **1.3.2. Modelos de asma en cobayos**

El cobayo ha resultado ser uno de los modelos más apropiados para la sensibilización pasiva con alérgenos donde se objetiva los fenómenos de obstrucción de la vía aérea que caracterizan al asma (Kawamoto *et al.*, 2003). De hecho, debido a que el cobayo tiene muchas similitudes biológicas con el humano, como la anatomía de las vías aéreas y la respuesta a los mediadores inflamatorios, los hace muy útiles en muchos campos de la investigación, por lo que han recibido el nombre de 'conejillo de indias' (von Békésy., 1960; Noguchi., 1919). En el 2006, Reino Unido realizó más de 30.000 experimentos científicos con cobayos, que incluían estudios principalmente sobre sistema respiratorio, nervioso e inmunitario, y esto representó menos del 1% del total de la investigación con animales (von Békésy., 1960). En particular, la reacción alérgica extrema, conocida como shock anafiláctico, se ha estudiado ampliamente en los cobayos, debido que esta reacción es más intensa que en la mayoría de las demás especies (Von Békésy., 1960; Chung., 1995).

Con respecto al modelo de asma del cobayo, se ha visto que, como el humano, es susceptible a desarrollar respuestas tempranas y tardías después del reto al alérgeno (Custovic *et al.*, 2002; GINA., 2017). Sin embargo, las respuestas de bronco-obstrucción en el cobayo son variables, y en un estudio de Ramos-Ramírez *et al.*, (2013) se pudieron determinar las características funcionales e inflamatorias de un grupo de cobayos sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) que tenían la particularidad de que nunca respondieron al reto antigénico.

### **1.3.3 Cobayos no respondedores al reto antigénico**

El perfil inmunológico de los cobayos del modelo de asma, que siempre responden al reto antigénico, se muestra en la tabla 1. En esta tabla se muestra que los cobayos no respondedores (NR) estudiados por Ramos-Ramírez *et al.* (2013) tienen características inmunológicas diferentes a la de los cobayos del modelo de asma, entre ellas, la presencia de neutrofilia, en lugar de eosinofilia, y de tener un perfil de Th1 y T reguladoras en lugar de Th2 típicas del asma.

**Tabla 1.** Diferencias inmunológicas en los cobayos modelo de asma y no respondedores al reto antigénico. El modelo agudo consta de 3 retos antigénicos, mientras que el crónico consta de 12 retos antigénicos (Ramos *et al.* 2013). Modificado de Tesis de Doctorado

	Modelo de asma		No respondedor	
	Agudo	Crónico	Agudo	Crónico
IgE específica al antígeno	✓	✓	X	X
IgG específica al antígeno	✓	✓	✓	✓
IL-4, IL5	✓	✓	X	X
IL-10	✓	✓	✓	✓
IL-13	✓	✓	X	X
IL-17A	✓	✓	✓	X
Linfocitos Th1	X	X	X	✓
Linfocitos Th2	✓	✓	X	X
Linfocitos Th3	X	X	✓	✓
Linfocitos Th17A	✓	✓	✓	X
Linfocitos Tr1	X	X	✓	X
Linfocitos Treg FOXP3+	X	X	✓	✓
TNF- $\alpha$	✓	✓	X	X
TGF- $\beta$	✓	✓	X	✓
Eosinofilia	✓	✓	X	X
Neutrofilia	X	X	✓	✓

## 2. JUSTIFICACIÓN

El asma es un importante problema de salud pública que ha aumentado considerablemente en las últimas tres décadas en países occidentales (Kim., 2010). El asma es un rasgo complejo causado por múltiples factores ambientales en combinación con más de 100 genes de susceptibilidad mayor y menor (Mutius., 2012) y tiene muchas formas diferentes o fenotipos.

En el laboratorio hemos observado que además de los cobayos del modelo de asma y los NR al reto antigénico, hay un grupo de cobayos que presentan respuestas variables (RV). Estos cobayos a veces responden con bronco-obstrucción al reto antigénico y a veces no. Este es un grupo de animales muy interesante debido a que en el humano se caracteriza por tener también respuestas variables al antígeno (Kline *et al*, 1999; Pipkorn., 1988) y estos cobayos RV podrían representar una de las manifestaciones más comunes del asma alérgica en el humano.

### **3. HIPÓTESIS**

Los cobayos de respuesta variable (RV) podrían mostrar características inflamatorias y funcionales similares a la de los cobayos del modelo de asma, después de ser expuestos a los retos antigénicos.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Analizar las características fisiopatológicas e inmunológicas de los cobayos con RV a los retos antigénicos.

#### **Objetivo particular**

1. Analizar los cambios del índice de bronco-obstrucción de cobayos expuestos a los retos antigénicos.
2. Determinar los porcentajes de cada uno de los grupos de cobayos que conforman nuestra población de estudios realizados entre 2008 al 2016.

3. Determinar el promedio de las respuestas obstructivas de los cobayos que fueron expuestos a los retos antigénicos y que fueron retados tres o doce veces.
4. Identificar en las respuestas bronco-obstructivas del grupo RV, las veces que cada animal triplica la basal.
5. Obtener el grado de reactividad de las vías aéreas a la histamina en cobayos seleccionados al azar, y en particular de los RV que respondieron y no respondieron al último reto antigénico.
6. Analizar contenido celular inflamatorio de los cobayos del objetivo 5.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

En este estudio se usaron cobayos machos y sanos (350-400 g) comprados originalmente de Harlan México (cepa HsdPoc: DH) y criados en nuestras instalaciones de laboratorio institucionales. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz / oscuridad filtrados con aire acondicionado de 12/12 h, a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50-70% de humedad y se alimentaron con pastillas esterilizadas (2040 Harlan Teklad Guinea Pig Diet) y agua *ad libitum*. Las condiciones de manejo de los animales estuvieron apegadas a los protocolos aprobados por el Comité científico y ético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### **5.1 Diseño de estudio**

Después de la sensibilización antigénica inicial (como se describe más adelante), los registros funcionales de todos los cobayos que fueron parte de estudios realizados entre el 2008 al 2016 sobre diferentes aspectos del asma, y que recibieron de tres a doce retos antigénicos con OVA fueron analizados. Posteriormente se clasificaron los cobayos en modelo de asma (siempre presentaron obstrucción bronquial después del reto antigénico), cobayos que nunca respondieron al reto antigénico (NR) y cobayos que a veces respondían y a veces no (RV). De los cobayos que recibieron tres o doce retos antigénicos, se

seleccionaron al azar 10 cobayos de cada grupo. Para cada cobayo se obtuvo el grado de reactividad de la vía aérea y se analizaron laminillas de cortes histológicos para determinar el grado de inflamación. Se incluyeron animales control retados con solución salina.

## **5.2 Procedimiento de sensibilización, refuerzo y retos antigénicos**

Para desarrollar el modelo de alergia, cada cobayo recibió dos inyecciones, una en la parte subdermal y otra peritoneal, conteniendo una mezcla de 30 µg/ml de OVA con hidróxido de aluminio (1mg/ml) cada uno, disueltos en solución salina. El reforzamiento antigénico se realizó 8 días después con aerosoles de OVA (3 mg / ml de solución salina) administrados durante 5 min. Los aerosoles se produjeron mediante un nebulizador US-1 Bennett (flujo, 2 ml / min), liberando partículas mezcladas, un 44% de tamaño <4 µm, un 38% de 4-10 µm y un 18% > 10 µm (Impingente líquido multietapa, Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Hertfordshire, Reino Unido). A partir del día 15, los cobayos fueron retados cada 10 días con aerosoles de OVA (1 mg/ml en la primera exposición y 0.5 mg/ml en las posteriores) administrados durante 1 minuto. El grupo control fue sometido a tres o doce desafíos con vehículo (solución salina). Todos los retos se llevaron a cabo mientras que el cobayo estaba dentro de un pletismógrafo barométrico, lo que permitió registrar la respuesta bronco-obstruiva a la prueba antigénica inmediatamente después de la completa distribución de OVA, como se describe en la siguiente sección.

## **5.3 Pletismografía barométrica**

Para evaluar la función pulmonar indirectamente de acuerdo con los principios previamente descritos, se utilizó pletismografía de animales que se mueven libremente (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, EE.UU.) (Fig. 4). Brevemente, la presión dentro del pletismógrafo se midió a través de un transductor diferencial conectado a un preamplificador. Debido a que el aire en los pulmones es calentado y humidificado, durante la fase inspiratoria el volumen de aire dentro del tórax es mayor que el volumen de aire extraído por el animal desde la cámara de

pletismografía. Este mayor volumen de aire dentro del tórax, produce un incremento en la presión de la cámara de pletismografía y ocurre lo contrario durante la fase espiratoria. La señal de la cámara fue procesada con un software instalado por el ordenador (Buxco Bio System XA v1.1) para calcular varios parámetros respiratorios, incluyendo índice de bronco-obstrucción (ÍB). Este índice se obtuvo mediante la siguiente fórmula:  $\dot{I}B = ((Te-Rt)/Rt)(PEP/PIP)$ .

Dónde:

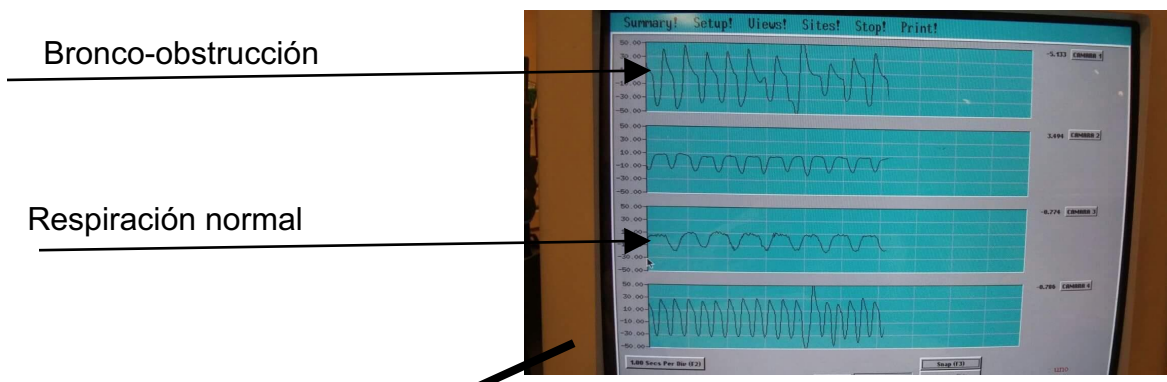
Te= Tiempo espiratorio (s)

Rt= Tiempo de relajación (s)

PEP= Pico de presión espiratoria (cmH<sub>2</sub>O)

PIP= Pico de presión inspiratoria (cmH<sub>2</sub>O)

El software se ajustó para incluir sólo respiraciones con un volumen de 1 ml o más, con tiempo inspiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio máximo de 3 s, y máxima diferencia entre volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10 %. Cinco minutos después de colocar el cobayo dentro de la cámara de pletismografía, se inició un registro de referencia basal del ÍB de 5 min. Un minuto después de la administración de OVA o vehículo, se registró ÍB a los 5 y 10 min, y cada 15 min después durante 1 a 24 h. Debido a que el Penh se calculó para cada respiración, se realizaron ajustes en el software para que los valores promedio de todas las respiraciones se produjeran durante 15 s, y luego para mediar estos valores durante los últimos 5 min de cada período.



**Figura 4.** Foto del equipo de pletismografía barométrica. El equipo funciona para medir la respuesta obstructiva y la función pulmonar de los cobayos.

**5.4 Reactividad de las vías aéreas a la histamina inducida por antígeno**

La reactividad de las vías aéreas comparando curvas dosis-respuesta de histamina antes y después de la administración de OVA. Brevemente, se administraron dosis incrementadas no acumulativas de aerosoles de histamina (0.013 a 0.32 mg / ml) después de obtener el nivel basal de referencia de  $\dot{V}_B$ . Cada dosis de histamina se administró durante 1 minuto, y se obtuvo el valor  $\dot{V}_B$  promedio durante los siguientes 5 min. El intervalo entre las dosis fue de 10 min. La curva dosis-respuesta se detuvo cuando el  $\dot{V}_B$  triplicó su nivel basal. Después de aplicar la última dosis necesaria de histamina, se esperó a que el cobayo llegara a si  $\dot{V}_B$  basal y posteriormente se aplicó

un reto con OVA. Finalmente, una segunda curva a histamina se realizó 24 h después.

### **5.5 Análisis histológico**

Una hora después de concluir la segunda curva de histamina, se administró una sobredosis de anestésico a los cobayos con Pentobarbital sódico. Posteriormente se obtuvieron muestras del lóbulo inferior izquierdo del pulmón y se colocó en una solución formaldehído al 10 %, y seguidamente fueron embebidas en bloques de parafina. Los bloques fueron cortados con un grosor de 4  $\mu\text{m}$  para colocarlos en portaobjetos. Las secciones de pulmón sobre laminillas fueron procesadas con la técnica de Tricrómica de Masson donde se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno utilizando tintes ácidos como el escarlata de Biebrich. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones se tratan con ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico (Welsch., 2006). Ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolibdicos permiten que la escarlata de Biebrich difunda del colágeno pero no del citoplasma. Con ésta técnica, las fibras de colágeno se tiñeron de color azul, el citoplasma de color rojo y el núcleo celular de color lila (Welsch., 2006; Wolfgang., 2003).

Otras laminillas fueron teñidas utilizando hematoxilina-eosina que es uno de los métodos más populares de tinción empleada en histología y medicina diagnóstica. Este método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; mientras que la eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma (Ross *et al.*, 2006). De esta forma se pudo observar en cada sección al núcleo celular de color violeta, el citoplasma de rosa, el músculo liso de rojo, rosa o fucsia, los glóbulos rojos de rojo o anaranjado y la fibrina de rosa (Welsch., 2006).



Todas las secciones teñidas fueron examinadas utilizando un microscopio de luz con analizador de imágenes (Leica Microsystems, Cambridge, UK). Todas las muestras se codificaron y las regiones a medir fueron elegidas al azar. Todas las secciones de fueron codificadas eligiéndose de manera aleatoria los campos, al menos seis por cobayo (Ross *et al.*, 2006; Welsch., 2006).

## **5.6 Reactivos**

Ovoalbúmina (albúmina de huevo de pollo) grado II, O-fenilendiamina, ácido sulfúrico, Tween 20, sales contenidas en buffers de fosfato y bicarbonato, el diclorhidrato de histamina se compró de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El hidróxido de aluminio se compró de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El pentobarbital sódico se adquirió de Pfizer (Toluca, México).

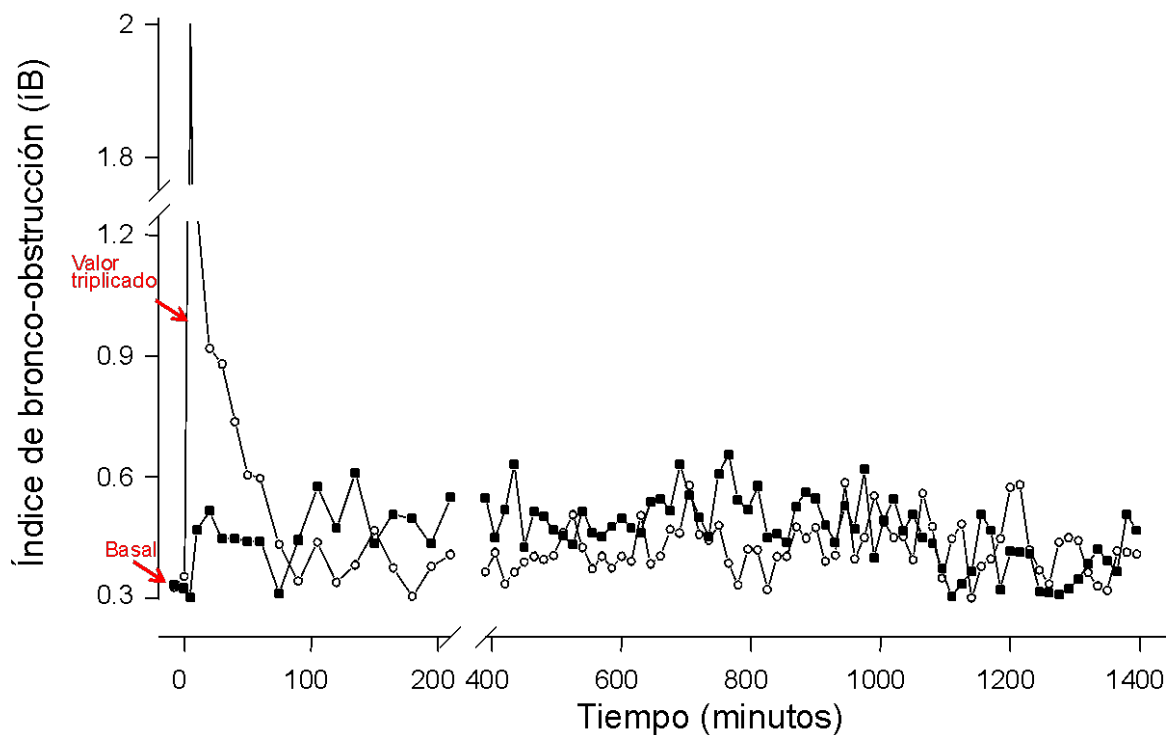
## **5.7 Análisis estadístico**

Se evaluó la respuesta de la vía aérea a la histamina mediante la dosis provocativa 200% (PD<sub>200</sub>), es decir, la dosis de histamina interpolada que causó un aumento que triplicó la IB basal. Los cambios en la respuesta a la histamina inducida por el reto antigénico se evaluaron mediante la prueba *t* de Student pareada en el programa Past. En las comparaciones múltiples, seguido de las pruebas de Bonferroni se utilizó ANOVA de una o dos vías. La significancia estadística se estableció en dos colas con una  $P < 0,05$ . Los datos en el texto, las tablas y figuras se expresan como media  $\pm$  SE.

## 6. RESULTADOS

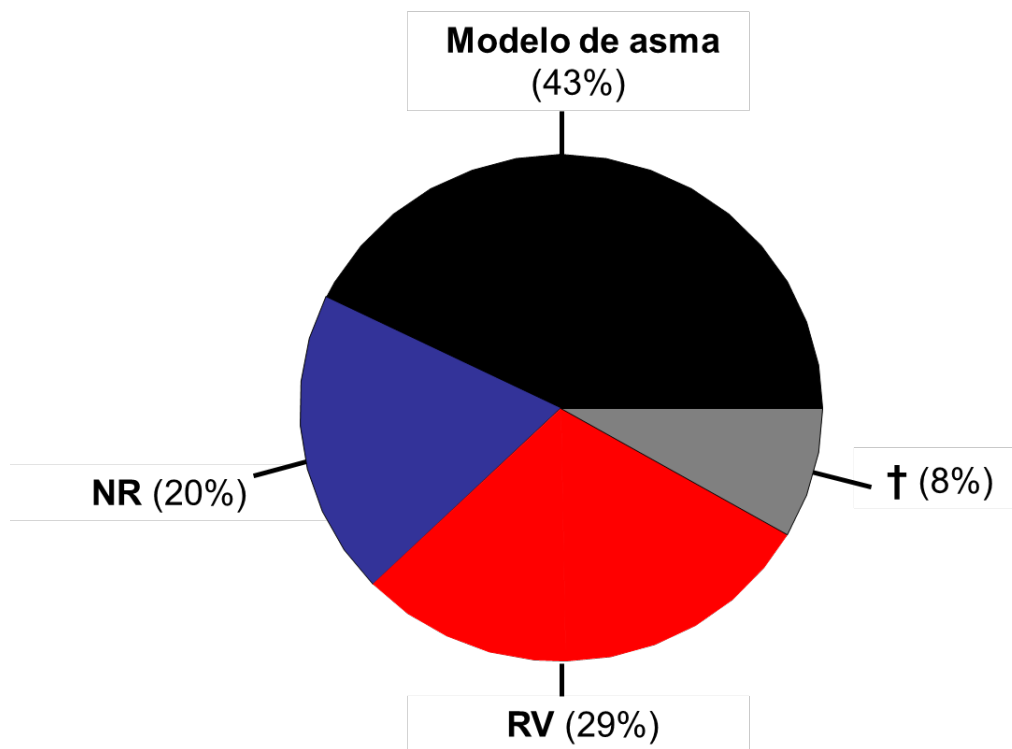
### 6.1 Respuestas bronco-obstructivas después del reto antigénico en cobayos sensibilizados

Las respuestas de obstrucción máxima de las vías aéreas inducida por retos antigénicos con OVA en cobayos sensibilizados obtenidas entre los años 2008 al 2016 fueron analizadas y clasificadas en varios grupos. Para la clasificación se seleccionaron cobayos que recibieron al menos tres retos antigénicos. Se catalogaron como cobayos del modelo de asma (R) a aquellos que presentaron una obstrucción capaz de triplicar el valor basal del índice de bronco-obstrucción (Fig. 5), como no respondedores (NR) a aquellos que nunca la triplicaron, y como cobayos de respuesta variable (RV) a los que eventualmente triplicaron su respuesta basal.



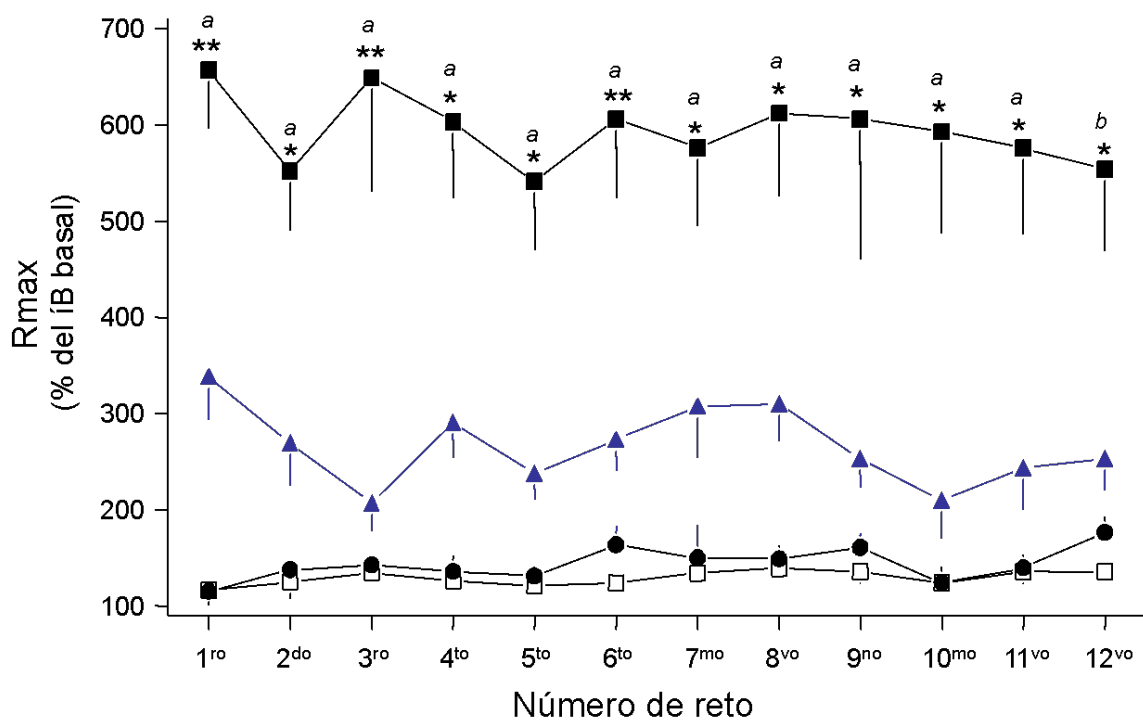
**Figura 5.** Representación gráfica de los cambios del índice de bronco-obstrucción después del reto antigénico en un cobayo que respondió al reto antigénico (círculo blanco) y uno que no respondió al reto (cuadros negros).

En la figura 6 se muestran los porcentajes cobayos incluidos en cada grupo de los grupos ya clasificados de todos los cobayos estudiados entre el 2008 al 2016 ( $n=98$ ). Los cobayos de modelo de asma corresponden a un 43 % de la población de estudio, mientras que los RV a un 29 % y finalmente los NR con un 20 %. Se incluyó un grupo adicional de cobayos que fue integrado por animales que murieron inmediatamente (alrededor de 2 min) después del primer ( $n=6$ ), segundo ( $n=1$ ) o tercer ( $n=1$ ) reto antigénico (8%). Debido a la muerte inesperada de estos cobayos, el suero se recogió de un solo animal.



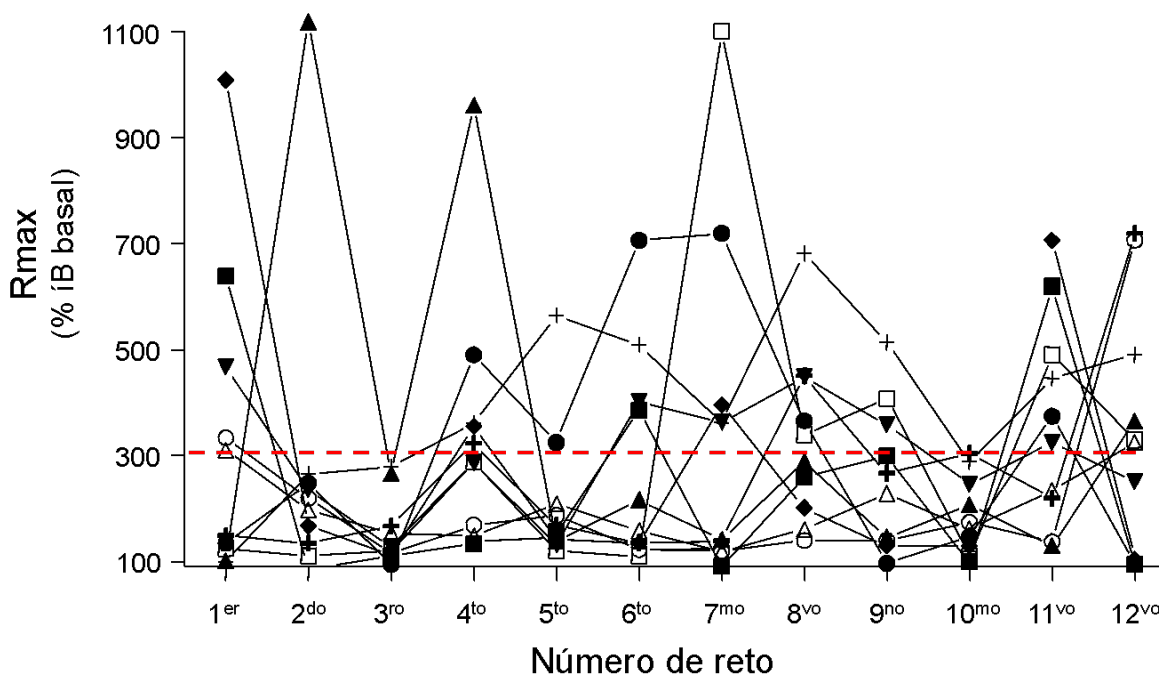
**Figura 6.** Porcentajes de cobayos en R, NR, RV y muerte súbita (†) obtenido de los estudios realizados entre 2008 al 2016 que incluye 98 cobayos que fueron retados antigénicamente al menos tres veces.

En la figura 7 se presentan los promedios de las respuestas obstructivas de 10 cobayos seleccionados al azar que corresponden a cobayos del modelo de asma, los NR y de RV que fueron retados doce veces con el antígeno. Se incluyó un grupo adicional de cobayos controles ( $n= 10$ ) a los que se les dio doce retos con solución salina fisiológica.



**Figura 7.** Promedio de las respuestas obstructivas inducidas por reto antigénico en cobayos retados doce veces. Los datos corresponden al valor máximo (Rmax) registrado durante la primer hora después del reto antigénico. El grupo de control (solución salina) corresponde a los cuadrados blancos, los del modelo de asma a los cuadros negros, los no respondedores (NR) al reto a los círculos negros y a los de respuesta variable a los triángulos. La significancia estadística corresponde al grupo de modelo de asma comparado con el grupo control ( $*P<0.05$  y  $**P<0.01$ ), y con el grupo NR ( $^bP<0.05$  y  $^aP<0.01$ ), ANOVA bidireccional con Post-test de Bonferroni. Los símbolos representan la media  $\pm$  SE de  $n= 10$  animales para cada grupo. íB = índice de bronco-obstrucción.

Las respuestas a los doce retos de los cobayos con RV se muestran en la figura 8. En la tabla 2 anexa a ésta figura, se muestra el número de veces que los cobayos mostrados en la figura 8 llegan a presentar respuestas que tripliquen la basal. En esta tabla se observa que hubo cobayos que triplicaron su basal por dos ( $n= 2$ ), tres ( $n= 2$ ), cuatro ( $n= 2$ ), cinco ( $n= 1$ ), seis ( $n= 2$ ) y hasta ocho ( $n= 1$ ) ocasiones.



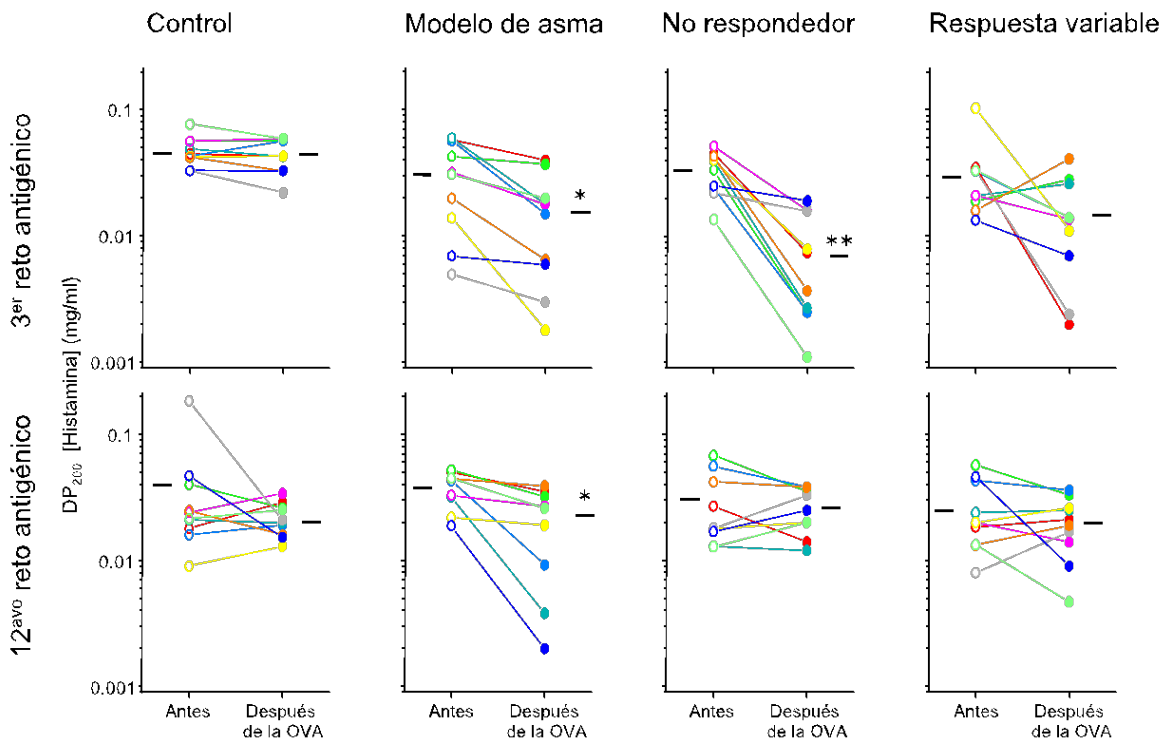
**Figura 8.** Respuestas máximas bronco-obstructivas de los diez cobayos sensibilizados con ovoalbúmina del grupo de respuesta variable (RV) mostrada en la figura 7 que fueron retados con antígeno doce veces. Cada símbolo representa un cobayo diferente. Rmax: respuesta máxima con respecto al porcentaje del índice de bronco-obstrucción (iB) basal.

**Tabla 2.** Número de veces que cada cobayo de la figura 8 triplica su basal.

▲	▼	◆	■	●	+	◀	■	◐	+
3	6	4	3	6	4	2	5	2	8

## 6.2 Reactividad de las vías aéreas inducida por antígeno

La reactividad a la histamina se evaluó en los cobayos de cada grupo que fueron retados tres o doce veces con el reto antigénico, es decir, modelo de asma, NR, RV y control. En los grupos control y de RV, la  $DP_{200}$  a la histamina no fue diferente a la  $DP_{200}$  obtenida después del reto a la OVA (Fig. 9). Por otro lado, en los cobayos de los grupos modelo de asma que recibieron 3 y 12 retos, y los NR que recibieron 3 retos, se observó una disminución significativa de la  $DP_{200}$  a la histamina en la segunda curva en comparación con la primera curva ( $P < 0.05$  para los cobayos del modelo de asma, y  $P < 0.01$  para los NR de 3 retos; Fig. 9).



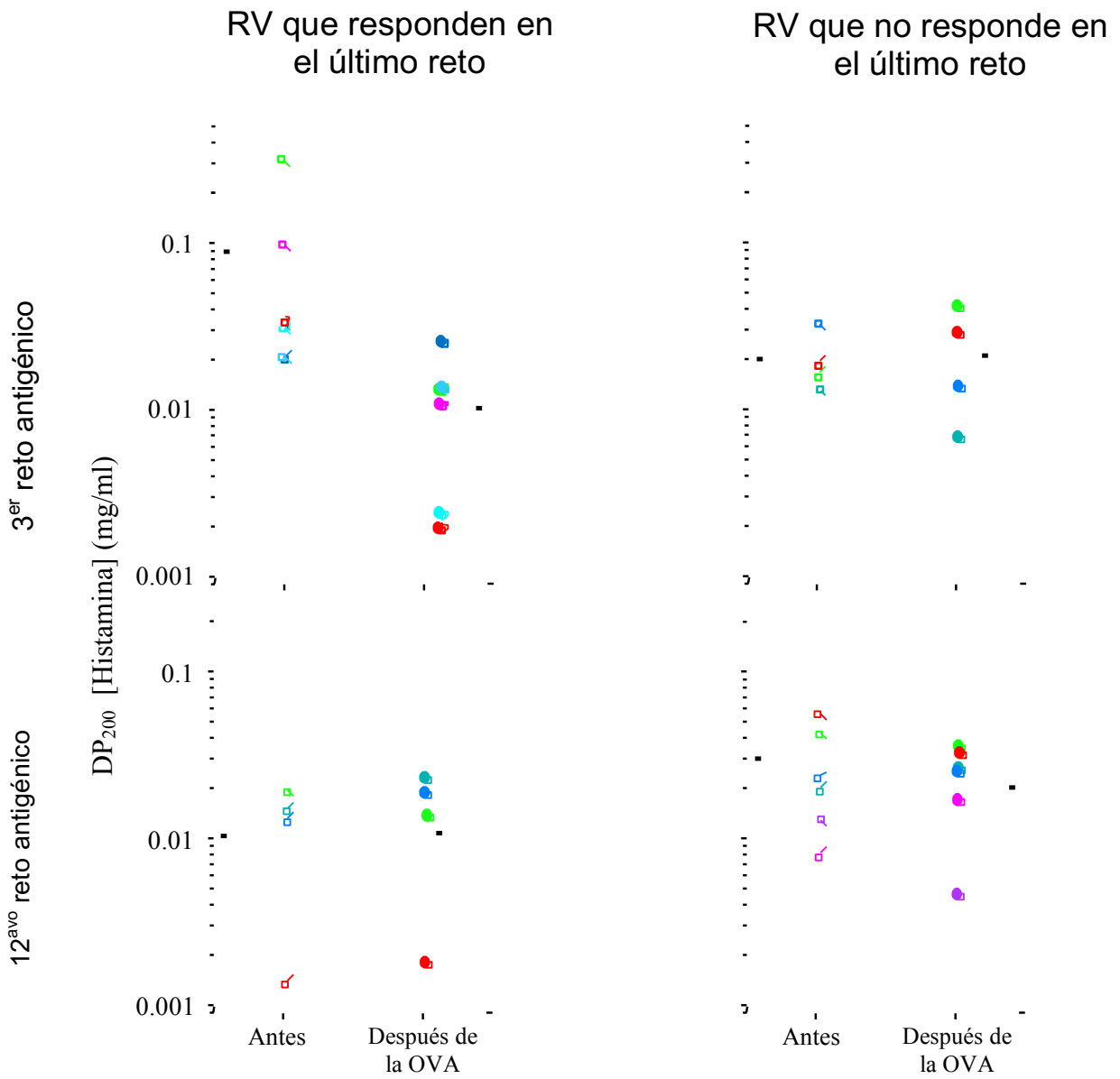
**Figura 9.** Reactividad de las vías aéreas a la histamina en cobayos expuestos al reto antigénico. La DP<sub>200</sub> se obtuvo antes y después del reto con OVA. \**P* < 0.05 y \*\**P* < 0.01, prueba de t de Student pareada comparando las DP<sub>200</sub> antes y después del reto antigénico en cada cobayo.

La reactividad basal a la histamina no se modificó por el número de retos en ningún grupo de cobayos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores promedio de la DP<sub>200</sub> a la histamina obtenida antes de la administración a la ovoalbúmina en cada uno de los grupos estudiados (agudos 35 días y crónicos 125 días)

	<b>Valores basales de la DP<sub>200</sub> a histamina</b>							
	<b>Control</b>	<b>Control</b>	<b>Modelo de asma</b>	<b>Modelo de asma</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>RV</b>	<b>RV</b>
	35	125	35	125	35	125	35	125
Promedio ± EE	0.047 ± 0.004	0.040 ± 0.016	0.033 ± 0.007	0.038 ± 0.004	0.034 ± 0.004	0.031 ± 0.006	0.032 ± 0.008	0.026 ± 0.005

En el caso de los cobayos de RV, se hizo un análisis posterior separándolos en dos grupos, los que triplicaron la basal en el último reto antigénico y los que no triplicaron la basal en éste reto (Fig.10).

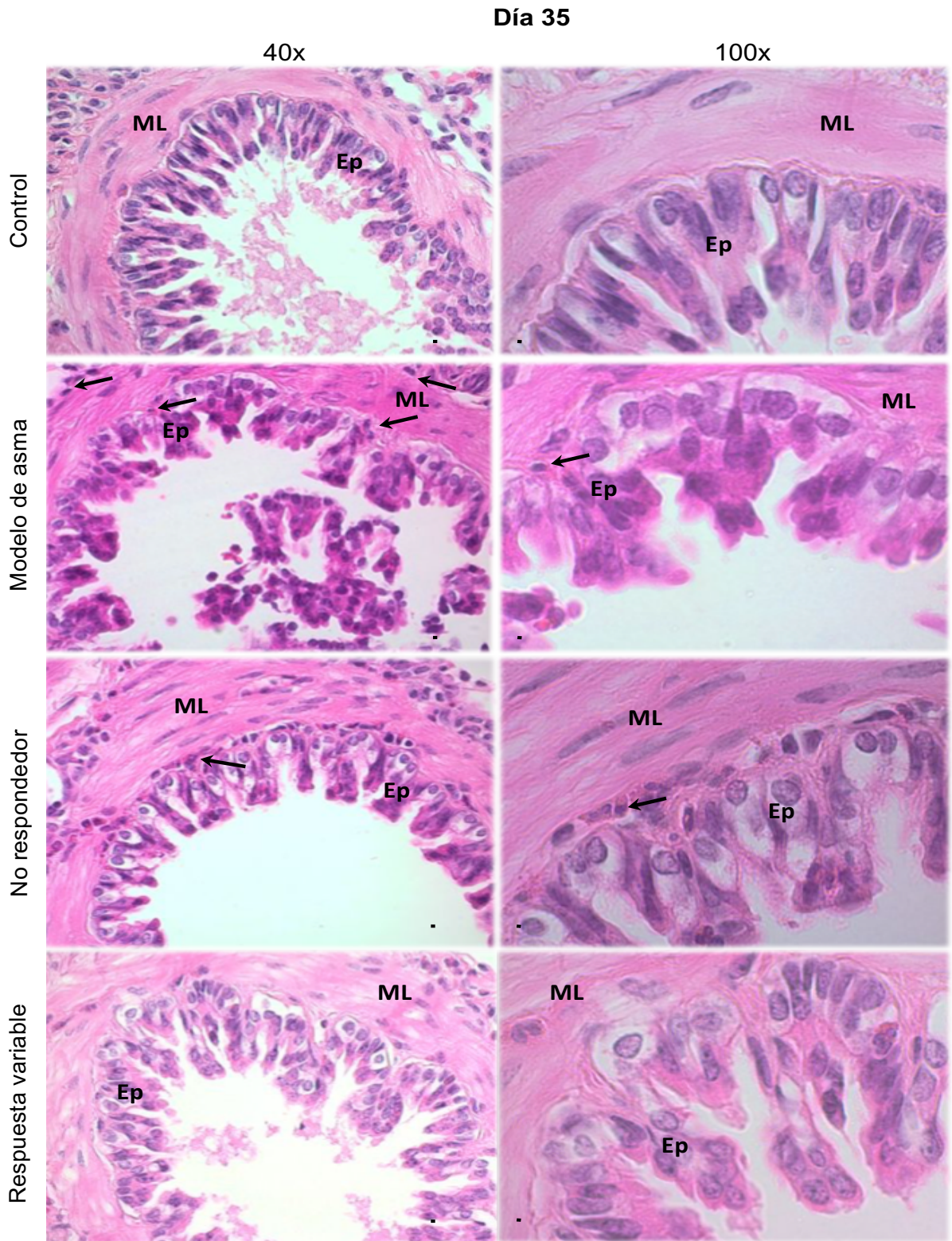


**Figura 10.** Reactividad de las vías aéreas a la histamina en cobayos RV que respondieron y no respondieron al último reto antigénico. La DP<sub>200</sub> se obtuvo antes y después del reto con OVA.



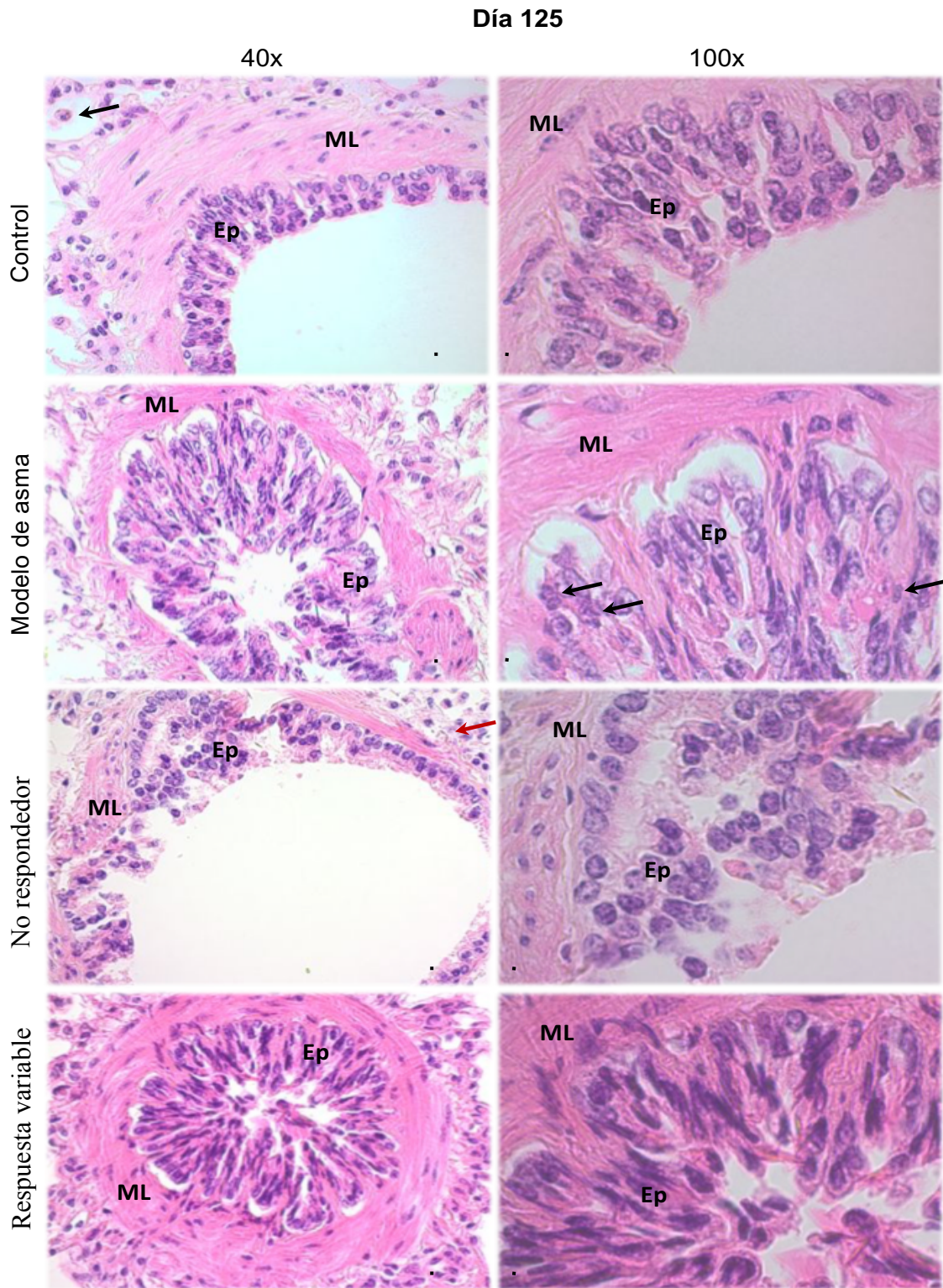
**Tabla 4.** Contenido celular en los cobayos control, modelo de asma, NR y de RV expuesto a ó 12 retos antigénicos. Las x indican la magnitud de inflamación.

	<b>Bronquiolos con eosinófilos</b>	<b>Neutrófilos alveolares</b>	<b>Inflamación intersticial (neumonitis)</b>
<b>Agudo (3 retos)</b>			
Control			
Modelo de asma	<b>xx</b>		
No Respondedor	<b>x</b>		
Respuesta Variable			
<b>Crónico (12 retos)</b>			
Control	<b>x</b>		
Modelo de asma	<b>xx</b>		
No Respondedor		<b>x</b>	
Respuesta Variable			



**Figura 11.** Fotografías de las secciones pulmonares de los cobayos agudos. ML (músculo liso), Ep (epitelio). Los eosinófilos (células inflamatorias) se encuentran marcadas con flechas negras

sobre el epitelio del bronquiolo. El modelo de asma y el no respondedor, fueron los únicos que mostraron esas células inflamatorias. Línea de escala igual a 200  $\mu$ m. Aumento 40x (izquierda) y 100x (derecha).



**Figura 12.** Fotografías de las secciones pulmonares de los cobayos crónicos. Los eosinófilos (células inflamatorias) se encuentran marcadas con flechas negras, sobre el epitelio del bronquiolo y con flecha roja se encuentran marcados los neutrófilos, sobre el parénquima. Los cobayos control y modelo de asma fueron los que mostraron eosinófilos mientras que el no respondedor fue el único en mostrar neutrófilos. ML (músculo liso), Ep (epitelio). Línea de escala igual a 200  $\mu\text{m}$ . Aumento 40x (izquierda) y 100x (derecha).

## 7. DISCUSIÓN

Varias enfermedades se caracterizan por limitar el flujo de aire, pero entre la más común es el asma (GINA., 2017). El asma es un padecimiento crónico muy heterogéneo donde usualmente se observa inflamación de las vías aéreas. La principal característica del asma son los episodios de obstrucción de las vías aéreas que pueden ser desencadenados por alérgenos en individuos atópicos o estímulos ambientales, emociones, etc. en el asma extrínseca. No obstante, se han descrito también desencadenantes no identificables en el asma no atópico o intrínseco (Vargas., 2009; GINA., 2017). En el asma alérgica, la exposición al alérgeno induce un episodio de exacerbación del asma que se caracteriza por una respuesta inmediata o temprana seguida, algunas horas más tarde, por una respuesta de larga duración. Estos episodios suelen ser variables, pues en ocasiones se observan solo respuestas tempranas o tardías, y más aún, que en ocasiones el alérgeno no produzca ninguna respuesta obstructiva. En la actualidad, la variabilidad del asma se ha clasificado de acuerdo a los parámetros clínicos o fisiológicos, estímulos desencadenantes o fenotipos inflamatorios (King., 2008). Muchos factores están asociados a la gran variabilidad de asma incluyendo genéticos, dosis del alérgeno, y grado de exposición a la sensibilización. En consecuencia, la búsqueda de modelos animales capaces de reproducir manifestaciones múltiples de asma es fundamental. El modelo del asma con el cual se realizó el presente estudio, además de generar cobayos del modelo de asma, también genera cobayos con respuestas obstructivas muy variables ante retos antigénicos repetitivos, cobayos que denominamos RV. Así mismo, en este estudio observamos que los cobayos RV no muestran características funcionales ni inflamatorias características del asma.

El cobayo ha sido utilizado como modelo de asma por ser apropiado para los modelos de sensibilización pasiva donde se quiere objetivar los fenómenos de hiperreactividad (von Békésy., 1960;). En este estudio determinamos, por métodos de pletismografía barométrica diferentes parámetros respiratorios de cobayos conscientes y con respiración espontánea (Hamelmann *et al.*, 1997). Se sabe que el modelo de asma del cobayo es susceptible a desarrollar respuestas tempranas y tardías después del reto al alérgeno. Nuestro modelo presenta solo respuestas tempranas que es la que ocurre a los pocos minutos, tras el contacto y la unión del alérgeno con la IgE específica fijada a los receptores de superficie del mastocito, y da lugar a la liberación de mediadores biológicamente activos, que originan un incremento en la permeabilidad vascular y la extravasación de fluido hacia los tejidos (Carrillo Díaz *et al.*, 2006). En el presente estudio, después del reto antigénico por exposición a la OVA se evaluó la bronco-obstrucción en cobayos sensibilizados a los que se les dieron de tres a doce retos antigénicos, las respuestas a los retos antigénicos se presentaron en dos patrones, respuestas  $\geq$  al 200% del  $\dot{V}_B$  basal o menores al 200%, muchas de las cuales fueron imperceptibles, y todas se presentaron durante la primera hora.

Evaluando todas las respuestas obstructivas considerando si se superaba el 200% del  $\dot{V}_B$  se clasificaron en respondedores, correspondiente al modelo de asma, en no respondedores o NR, y a los de respuesta variable o RV. Aunque es frecuente encontrar estos cobayos en otros estudios (comunicación personal) usualmente no se reportan este tipo de resultados y esto se podría deber principalmente a tres factores: 1) los animales que no responden son sacados del estudio y no se reportan, 2) usan inhibidores de la respuesta obstructiva alérgica, como anti-histaminérgicos o anticolinérgicos, (Nabe *et al.*, 1997; Humbles *et al.*, 1997) 3) en los estudios no miden la respuesta obstructiva o ajustan la dosis de OVA para obtener la respuesta (Smith *et al.*, 2007; Lancas *et al.*, 2006; Pare *et al.*, 1979).

El estrechamiento de la vía aérea es la vía final común que desemboca en los síntomas y cambios fisiopatológicos del asma. La principal alteración fisiopatológica del asma es la hiperreactividad (The Global Initiative for Asthma. Global Strategy for

Asthma Management and Prevention., 2006; Crinnion., 2012), y se ha visto que la hiperreactividad se produce principalmente durante las crisis, que suelen ser recurrentes con síntomas respiratorios asociados con la obstrucción del flujo de aire (Ying., 2009; GINA., 2017). Adicionalmente la hiperreactividad se ha vinculado con el reclutamiento de células inflamatorias como los eosinófilos (Haldar., 2009), y así como a alteraciones en la estructura de las vías aéreas (Kariyasam., 2007; Busse., 2010), aunque también los mediadores provenientes de células estructurales y otras células inflamatorias, como neutrófilos y células cebadas parecen importantes en el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas (Nagarkar., 2009; Blease., 2001). En el presente estudio, observamos hiperreactividad a la histamina en los cobayos del modelo de asma y NR agudos, pero no se observa en los cobayos de RV, aun cuando los RV respondían al reto antigénico, lo que sugiere que la respuesta alérgica obstructiva posiblemente no está asociada al desarrollo de hiperreactividad. Con respecto al infiltrado inflamatorio, en este estudio observamos que los cobayos del modelo de asma, los NR agudos y el control crónico mostraron eosinofilia en el pulmón. Los eosinófilos son importantes mediadores de la respuesta alérgica y es común encontrarlo en asmáticos. En un estudio previo, utilizando este mismo modelo de asma se encontró que los NR agudo no presentan eosinofilia en el lavado bronco-alveolar, pero en el presente estudio si se observó eosinofilia en el pulmón (Ramos-Ramírez *et al.*, 2013). Es probable que el proceso inflamatorio en los NR solo se establezca a nivel de reclutamiento de células en el pulmón y no exista migración al lavado bronco-alveolar. Encontrar eosinofilia en el pulmón de los cobayos controles crónicos pudiera deberse a un posible proceso infeccioso, ya que los eosinófilos se incrementan con infecciones por nematodos. Así mismo se determinó que los NR crónicos presentan neumonía. Este hallazgo fue inesperado ya que los cobayos no manifestaban ninguna sintomatología asociada a neumonía, por lo que se piensa que se estaba resolviendo esta neutrofilia de manera espontánea. Finalmente los cobayos de RV no presentaron ninguna célula inflamatoria en sus pulmones, sugiriendo que no había desarrollo de un cuadro parecido al asma, o infeccioso o neumónico.

## 8. CONCLUSIONES

- Los cobayos de RV presentan un fenotipo diferente al de modelo de asma y a los NR que no desarrollan hiperreactividad, ni ningún proceso inflamatorio en los pulmones.
- Se sugiere que es importante incluir a los cobayos RV en los estudios posteriores con el fin de determinar que provoca dicha variabilidad.
- En el asma alérgica intervienen varias poblaciones de células inflamatorias una de ellas, los eosinófilos, sin embargo éstos no fueron encontrados en los cobayos de RV.
- La bronco-obstrucción al reto antigénico no se asocia con la hiperreactividad.

## 9. REFERENCIAS

- Alvarez-Puebla MJ, Olaguibel-Rivera JM, Urbiola-Marcilla E, Garcia BE, Tabar-Purroy AI: Determinants of allergen-induced late bronchial responses in mild asthmatics. *Chest* 2001;119:120-127.
- Bazan-Perkins B, Sánchez-Guerrero E, Vargas M, Martinez E, Ramos-Ramírez., P, Alvarez-Santos M, Hiriart G, Gaxiola M, Hernández-Pando R:  $\beta$ 1-integrins shedding in a guinea pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Exp Clin Allergy* 2009; accepted.
- Blease K., Lukacs N., Hogaboam C., Kunkel S., 2001. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res*; 1:54-61
- Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001; 344: 350-62.
- Carrillo-Díaz T., Martínez-Tadeo J.A, Cumplido-Bonny J.A., 2006. *Archivos de Bronconeumología*;42(Supl.1): 13-19
- Chummy. S. Sinnatamby. *Anatomía de Last: regional y aplicada*. 1ª edición. Editorial Paidotribo; 2003. p.97
- Chung KF. Animal models of asthma. *Eur Respir Rev* 1995; 5;184-7.
- Crinnion WJ. Do Environmental Toxicants Contribute to Allergy and Asthma? *Altern Med Rev*. 2012;17:6-18. 4.
- Custovic A, Murray CS: The effect of allergen exposure in early childhood on the development of atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:417-423
- Des J.T., Balderrama E.F., 1993. *Enfermedades respiratorias, manifestaciones clinicas*, ed. El manual moderno, 453 pàg.
- GINA (Global Initiative for Asthma)., 2017 de <http://www.ginasthma.org/>  
Consultado: 5 de abril de 2017.
- Guyton A., Hall J. *Ventilación Pulmonar*. En: *Tratado de Fisiología Medica* 10ª ed. México D.F.: McGraw-Hill; 2001. p. 525-538



- Haldar P., Brighttling C., Hargadon B., et al 2009. Mepolizulab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 360 (10):973-984
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:766-775.
- Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease., 2009;4:435-59.
- Hubrecht R. & Kirkwood J., 2010. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals.*
- Humbles AA, Conroy DM, Marleau S, Rankin SM, Palframan RT, Proudfoot AE, et al. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. *J Exp Med* 1997; 186:601-612.
- INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias), 2014 de <http://www.iner.salud.gob.mx/> Consultado: 5 de abril de 2017.
- Kariyasam H., Aizen M., Barkans J., Robinson D., 2007. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not celular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 175: 896-904.
- Kawamoto, K, et al. (2003) Math1 Gene Transfer Generates New Cochlear Hair Cells in Mature Guinea Pigs In Vivo, *J Neurosci* 23(11):4395-4400
- Kim Y. H., DeKruyff & Umetsu D. T. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptative immunity. *Nature immunology.* 11:577-583.
- King CS, Moores LK: Clinical asthma syndromes and important asthma mimics. *Respir Care* 2008;53:568-580; discussion 580-562.
- Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt JL, Wohlford-Lenane CL, Powers LS, Jones MP, Schwartz DA., Variable airway

responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 160(1):297-303

- Lancas T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100:1610-1616.
- Latarjet, Ruiz Liard; *Anatomía Humana*; 4<sup>ª</sup> Ed. 2007; Panamericana.
- Lemanske RF. Inflammatory events in asthma: An expanding equation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105: S633-6.
- Mutius E, Drazen MJ. A Patient with Asthma Seeks Medical Advice in 1828, 1928, and 2012. *N Engl J Med.* 2012;366:827-34.
- Nabe T, Shinoda N, Yamada M, Sekioka T, Saeki Y, Yamamura H, et al. Repeated antigen inhalation-induced reproducible early and late asthma in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75:65-75.
- Nagarkar D. R., Wang Q., Shim J., 2009CXCR2 is required for neutrophilic airways inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of human rhinovirus infection. *J Immunol.* 183(10): 6698-6707.
- Obase Y, Shimoda T, Kawano T, Saeki S, Tomari S, Izaki K, Fukushima C, Matsuse H, Kohno S: Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in adolescents with asymptomatic childhood asthma. *Allergy* 2003;58:213-220.
- OMS (Organización Mundial de la Salud)., 2014, de <http://www.who.int/es/>  
Consultado: 25 abril de 2017
- Pare PD, Michoud MC, Boucher RC, Hogg JC. Pulmonary effects of acute and chronic antigen exposure of immunized guinea pigs. *J Appl Physiol* 1979; 46:346-353.
- Picado C: Early and late-phase asthmatic reactions: A hypothesis. *Allergy* 1992;47:331-333.

- Pipkorn, U., Karisson, G., & Enerback, L. 1988. The cellular response of the human allergic mucosa to natural allergen exposure. *Journal of allergy and clinical immunology*, 82(6), 1046-1054).
- Ramos-Ramirez P, Campos MG, Martinez-Cordero E, Bazan-Perkins B, Garcia-Zepeda E. 2013. Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Experimental lung research* 39:136-45).
- Rihardson V. G., 2010. *Diseases of Domestic Guinea Pigs*. 2° Ed.
- Roldán Bretón, Nuria Renata; Jiménez Vargas, Mariela; Salinas Miralles, Eva., 2015. Asma alérgica: mecanismos inmunológicos, fisiopatología y tratamientos actuales *Investigación y Ciencia*, vol. 23, núm. 65, Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, México, pp. 66-72
- Ross M. H, Pawlina W., 2006. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ª ed. Ed. Panamericana, 1-7 pág.
- Shin S., Takeda K., Gelfand E., et al. 2009. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res*. 1(1):10-18.
- Smith N, Broadley KJ. Optimisation of the sensitisation conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:183-190.
- Sobotta et al Welsch U., 2006. *Histología*. 2° Ed. Editorial medica panamericana. Pág 5-7
- Sobotta et al Welsch 2008; *Conducting passages* U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2017 de <https://training.seer.cancer.gov/>. Consultado: 1 de abril de 2017.
- Terril L. A., Clemons D. J. & Suckow M. A. *The Laboratory Guinea Pig* (CRC Press INC, 1998).
- The Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*; 2006. de <http://www.ginasthma.org/>. Consultado: 15 junio de 2017.

- Vargas M. H. Epidemiología del asma., 2009. Neumología y cirugía del tórax; 68(S2):S91-S97.
- Vargas MH., 2017. Epidemiología del asma, Neumología y Cirugía de Tórax 68:s91-s7
- Von Békésy, G. (1960) Experiments in Hearing, available online: <http://asa.aip.org/books/experiments.html>
- Von Mutius E, Sears. Risk factors for development of asthma. Eur Respir Mon. 2003; 8: 57-73.
- Watson M. K., et al. Evaluating the clinical and physiological effects of long term ultraviolet Bradiation on guinea pigs (*Cavia porcellus*). PloS one 9, e114413, doi:10.1371/journal.pone.0114413 (2014).
- West J., 2009 Fisiología respiratoria 7ª edición. Ed. Panamericana,186 pág.
- Wolfgang K., 2003. Atlas color de citología e histología. Unidécima edición, Ed. Panamericana, 340 pág.
- Ying S., Zhang G. et al., 2006. How Much Do We Know about Atopic Asthma: Where Are We Know? Cellular & Molecukar Immunology. 3(5): 321-332