



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA AL  
PROCESO INFLAMATORIO DE LAS VÍAS AÉREAS EN UN  
MODELO DE ASMA ALÉRGICA EN COBAYO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**PATRICIA RAMOS RAMÍREZ**

**TUTOR**

**DR. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA**

*DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,  
UNAM*

**COMITÉ TUTOR**

**DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO**

*DEPARTAMENTO DE AUTOINMUNIDAD, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS "ISMAEL COSIO VILLEGAS" (INER)*

**DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**

*DEPARTAMENTO DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL, INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSIO VILLEGAS" (INER)*

MÉXICO D.F. JUNIO, 2013



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.

DOCTORADO  
en  
CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dr. Enrique Ortega Soto
<b>VOCAL:</b>	Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes
<b>VOCAL:</b>	Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval
<b>VOCAL:</b>	Dra. Sara Huerta Yépez
<b>SECRETARIO:</b>	Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

**DIRECCIÓN DE TESIS**

**Dr. Eduardo Alberto García Zepeda**

*DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,  
UNAM*

**Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins**

*DEPARTAMENTO DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL, INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSIO VILLEGAS" (INER)*

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación sobre la Biología de las Quimiocinas (CBRL) del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; en el Laboratorio de Hiperreactividad Bronquial (número de proyecto B03-08) y en el Laboratorio de Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas" (INER). Durante sus estudios de doctorado la sustentante recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número CVU/becario 256077/215795.

*A la memoria de mi Mamá,  
Otilía Ramírez,*

*Gracias por tu esfuerzo y dedicación, por el amor que  
siempre me diste, por tu dulzura y alegría; por apoyarme  
incondicionalmente y por ser la guía y el pilar de mi  
camino.*

*God doesn't give us the people we want, he gives us people we need to love us, leave us,  
help us, hurt us and make us become the person we were meant to be.*

## **AGRADECIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO**

A la Dra. Blanca M. Bazán-Perkins por su invaluable dirección y por incluirme en su grupo de investigación brindándome las herramientas necesarias para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Eduardo A. García por su invaluable dirección en este proyecto y por incluirme en su grupo de trabajo.

Al Dr. Erasmo Martínez por su invaluable asesoría y por permitirme desarrollar gran parte de este proyecto en su laboratorio de investigación brindándome las herramientas necesarias para ello.

A la Dra. Gloria Soldevila por su colaboración en la purificación celular y su asesoría en los análisis de citometría de flujo.

A la Dra. Patricia Segura por el apoyo durante la elaboración de este proyecto.

Al Técnico Eduardo Flores por su invaluable ayuda durante la realización de este proyecto.

A la Q.F.B. Erika Méndez por su asesoría y por las largas horas en el citómetro y en los análisis de la citometría.

Al M. en C. Jesús Argueta por su asesoría en la citometría de flujo.

A la M. en C. Cynthia López y a la Q.F.B. Cecilia Franco por su asesoría en las técnicas de biología molecular.

Al Laboratorio de Patología Experimental del INER por el procesamiento histológico de las muestras obtenidas durante la elaboración de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A la Dra. Blanca M. Bazán Perkins por el apoyo durante mi formación científica y por la guía que me ha brindado.

A mi hermano Juan Ramos, por el cariño que nos ha unido.

A la M. en C. Georgina Nieto por ser una guía en mi camino y apoyarme en todo momento.

A Jesús Argueta por el cariño y el apoyo que me ha brindado en todo momento.

A Laura Ruiz y a Paola Santana porque más que mis amigas son mis hermanas.

A Olivia Téllez y a Eduardo Flores por compartir conmigo las largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que tanto quiero, Cynthia López, Erika Méndez, Jaciel Tamayo, Cecilia Franco, Jazmín Hernández, Elisa Cruz, Sandra Guzmán, Aglae Cruz, Alberto Chinney, Julio Valdivia y Fernando Galicia.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio del INER, Olivia Téllez, Karen Larios, Fernando Gutiérrez y Fernando Carbajal.

Gracias a Dios, por darme el regalo de la vida.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Vías aéreas</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Asma</b>	<b>2</b>
1.2.1 <i>Definición</i>	2
1.2.2 <i>Etiología</i>	2
1.2.3 <i>Epidemiología</i>	3
1.2.4 <i>Clasificación</i>	3
<b>1.3 Mecanismos inmunológicos del asma alérgica</b>	<b>4</b>
1.3.1 <i>Sensibilización al alérgeno</i>	4
1.3.2 <i>Respuesta alérgica temprana o inmediata</i>	5
1.3.3 <i>Respuesta alérgica tardía</i>	6
1.3.4 <i>Inflamación crónica</i>	6
<b>1.4 Hiperreactividad de las vías aéreas</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Bronco-obstrucción</b>	<b>9</b>
1.5.1 <i>Remodelación de las vías aéreas</i>	10
<b>1.6 Linfocitos T reguladores</b>	<b>10</b>
<b>1.7 Linfocitos T reguladores en el asma alérgica</b>	<b>11</b>
<b>1.8 Modelos de asma en animales</b>	<b>12</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>14</b>
<b>3. Planteamiento del Problema</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>6. Material y métodos</b>	<b>18</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>35</b>

7.1 La administración de OVA induce el incremento de IgG1- específica pero no de IgE-específica en cobayos no respondedores al alérgeno	35
7.2 Los cobayos no respondedores al alérgeno no secretan histamina y tromboxano A <sub>2</sub> , pero si son capaces de responder a estos mediadores <i>in vitro</i>	35
7.3 La hiperreactividad de las vías aéreas puede ocurrir en cobayos no respondedores al alérgeno	37
7.4 Modelo de asma crónica en cobayo	38
7.4.1 <i>La exposición crónica a OVA induce dos patrones de respuesta bronco-obstructiva</i>	39
7.4.2 <i>Los cobayos no respondedores al reto crónico con el alérgeno no desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas</i>	40
7.4.3 <i>La fibrosis de las vías aéreas puede ocurrir en ausencia de respuesta bronco-obstructiva en cobayos expuestos de manera crónica a OVA</i>	41
7.5 Efecto del reto con OVA sobre la producción temporal de IgG1 e IgE específicas en suero de cobayos	43
7.6 Efecto de la administración de OVA sobre el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas de cobayos	44
7.6.1 <i>El reto con el alérgeno no induce el reclutamiento de eosinófilos pero si de linfocitos en los cobayos no respondedores</i>	46
7.6.2 <i>La histamina induce la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos hacia las vías aéreas</i>	48
7.7 La ausencia de respuesta bronco-obstructiva está asociada a la disminución de mediadores característicos de la respuesta alérgica	50
7.7.1 <i>Sobrenadantes de homogenado pulmonar</i>	51
a) Perfil de citocinas Th1/Th2	51
b) Citocinas pro-inflamatorias: IL-17A y TNF- $\alpha$	51
c) Citocinas reguladoras: IL-10 y TGF- $\beta$ 1	52
7.7.2 <i>Citocinas en lavado bronquioalveolar</i>	54

a) Perfil de citocinas Th1/Th2	54
b) Citocinas pro-inflamatorias: IL-17A y TNF- $\alpha$	54
c) Citocinas reguladoras: IL-10 y TGF- $\beta$ 1	55
7.7.3 <i>Citocinas intracelulares</i>	55
7.7.4 <i>Expresi3n de ARNm de citocinas en tejido pulmonar</i>	57
7.8 Caracterizaci3n de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos	59
7.9 La poblaci3n de linfocitos Th2 no se incrementa en cobayos no respondedores	62
7.10 Las poblaciones de linfocitos Tr1 y Th3 se incrementan en los cobayos no respondedores.	64
7.11 Los linfocitos T Foxp3+ se incrementan en el pulm3n de los cobayos no respondedores	66
<b>8. Discusi3n</b>	<b>69</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>10. Bibliograf3a</b>	<b>80</b>
<b>11. Publicaciones</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Estructura de las vías aéreas en humano	1
<b>Figura 2</b>	Estructura de la pared de las vías aéreas	2
<b>Figura 3</b>	Proceso de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas	5
<b>Figura 4</b>	Curvas dosis-respuesta que muestra los cambios en el volumen espiratorio forzado (FEV1) inducido por distintas dosis de histamina o metacolina	9
<b>Figura 5</b>	Linfocitos T reguladores durante el asma alérgica	13
<b>Figura 6</b>	Esquema de sensibilización y administración de los retos con OVA	21
<b>Figura 7</b>	Diseño de general del estudio	22
<b>Figura 8</b>	Representación esquemática del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento.	23
<b>Figura 9</b>	Parámetros medidos en la pletismografía barométrica	25
<b>Figura 10</b>	Curvas dosis-respuesta a histamina para evaluar la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el reto con OVA	26
<b>Figura 11</b>	Niveles de IgG1 e IgE específicos para OVA en suero de cobayos	39
<b>Figura 12</b>	Niveles de histamina, tromboxano A <sub>2</sub> y cisteinil leucotrienos en LBA de cobayos expuestos a OVA	40
<b>Figura 13</b>	Reactividad de las vías aéreas a histamina antes y después del reto con OVA en cobayos sensibilizados	42
<b>Figura 14</b>	Respuesta bronco-obstructiva máxima inducida por el reto con OVA en cobayos sensibilizados	43
<b>Figura 15</b>	Reactividad de las vías aéreas a histamina en cobayos del modelo agudo y del modelo crónico	44
<b>Figura 16</b>	Características histológicas representativas de la mucosa subepitelial en cobayos expuestos a doce retos con OVA (modelo crónico)	46

<b>Figura 17</b>	Análisis del curso temporal de la producción de IgG1 específica para OVA en suero de cobayo	47
<b>Figura 18</b>	Análisis del curso temporal de la producción de IgE específica para OVA en suero de cobayo	48
<b>Figura 19</b>	Conteo celular total en LBA de cobayos del modelo agudo y del modelo crónico	50
<b>Figura 20</b>	Poblaciones celulares representativas recuperadas en LBA de cobayos	50
<b>Figura 21</b>	Análisis de eosinófilos infiltrados en LBA de cobayos	51
<b>Figura 22</b>	Análisis de linfocitos infiltrados en LBA de cobayos	52
<b>Figura 23</b>	Análisis de neutrófilos infiltrados en LBA de cobayos	53
<b>Figura 24</b>	Análisis de macrófagos infiltrados en LBA de cobayos	54
<b>Figura 25</b>	Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de homogenado pulmonar de cobayos	57
<b>Figura 26</b>	Cuantificación de citocinas en LBA de cobayos	59
<b>Figura 27</b>	Tinción intracelular de citocinas en células provenientes del LBA de cobayos	61
<b>Figura 28</b>	Análisis de la expresión del ARNm de citocinas en pulmón de cobayos	62
<b>Figura 29</b>	Caracterización de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos	64
<b>Figura 30</b>	Análisis de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos	65
<b>Figura 31</b>	Análisis de la fracción R1 mediante citometría de flujo en células provenientes del LBA de cobayo	66
<b>Figura 32</b>	Evaluación del perfil de citocinas intracitoplasmáticas en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> provenientes del LBA de cobayos	67

<b>Figura 33</b>	Linfocitos Tr1 y Th3 en LBA de cobayos expuestos a OVA	69
<b>Figura 34</b>	Linfocitos T reguladores Foxp3 <sup>+</sup> en LBA de cobayos expuestos a OVA	71
<b>Figura 35</b>	Análisis de la expresión de Foxp3 en pulmón de cobayos expuestos a OVA	72

## ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Principales citocinas involucradas en la patogénesis del asma	7
<b>Tabla 2</b>	Oligonucleótidos diseñados para amplificar las proteínas de interés	37
<b>Tabla 3</b>	Respuesta máxima in vitro (g) a OVA, histamina, U46619 y leucotrieno D4 en tráqueas de cobayos	41

## RESUMEN

El asma es un desorden de las vías aéreas caracterizado por inflamación persistente e hiperreactividad bronquial. La inflamación induce episodios recurrentes de síntomas respiratorios asociados a la bronco-obstrucción. En algunos pacientes la bronco-obstrucción después de la exposición a alérgenos no siempre se ha observado. En el modelo de asma en cobayo desarrollado por nuestro grupo de investigación hemos encontrado un fenómeno similar. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune asociada a la inflamación de las vías aéreas en cobayos que no desarrollan una respuesta bronco-obstructiva inducida por alérgeno. Para ello, cobayos machos fueron sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y retados a intervalos de diez días con aerosoles de OVA. Los cobayos fueron expuestos a tres o doce retos con OVA para evaluar las características de un modelo agudo y de un modelo crónico de asma, respectivamente. La función pulmonar se registró mediante pletismografía barométrica durante cada reto. Los cobayos fueron divididos en dos grupos 1) cobayos que mostraron bronco-obstrucción (respondedores, R) y 2) cobayos que no mostraron bronco-obstrucción (no respondedores, NR) después del reto con OVA. Se incluyeron dos grupos sin sensibilizar (SS) correspondientes a la edad de los cobayos. Adicionalmente se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina para evaluar la reactividad de las vías aéreas y así determinar el efecto de la administración exógena de histamina sobre la respuesta inflamatoria en los cobayos, este grupo fue considerado como el valor basal de los parámetros inflamatorios analizados. En el tercer y doceavo retos se evaluó la reactividad de las vías aéreas, los niveles de IgG1 e IgE específicas para OVA, los niveles de histamina, tromboxano A<sub>2</sub> y leucotrienos en el lavado bronquioalveolar (LBA), la contracción traqueal *in vitro* inducida por mediadores contráctiles y OVA, el grado de fibrosis subepitelial, las células inflamatorias infiltradas en el LBA, los niveles de proteína y ARNm de citocinas y el número de linfocitos Th1, Th2, Th17, Tr1, Th3 y Foxp3<sup>+</sup>. Las muestras se obtuvieron inmediatamente y 24 horas (h) después del reto con OVA. Los grupos SS inmediatos mostraron un incremento, con respecto al grupo basal, en el número de macrófagos y neutrófilos infiltrados en el LBA, así como de IL-4, IL-5, IL-10 y TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que la administración de histamina induce la quimiotaxis de células y la secreción de mediadores específicos. Los grupos SS cuyas muestras se obtuvieron 24 h después del reto no presentaron cambios inflamatorios con respecto al grupo basal, lo que sugiere que a las 24 h la histamina ya no ejerce un efecto sobre la respuesta inflamatoria de las vías aéreas en los cobayos. La administración de histamina, tromboxano A<sub>2</sub> y leucotrieno D<sub>4</sub> indujo una contracción similar en las tráqueas de los cobayos de todos los grupos, mientras que la OVA indujo

la contracción traqueal solamente en el grupo R. Los niveles de IgG1 anti-OVA fueron similares en los grupos R y NR. El grupo NR no mostró bronco-obstrucción inducida por OVA a lo largo a los retos. En el grupo NR del modelo agudo se observó el reclutamiento de neutrófilos y la producción de IL-17A, así como hiperreactividad a la histamina, mientras que en el grupo NR del modelo crónico no se observó hiperreactividad. Los grupos R y NR del modelo crónico desarrollaron fibrosis subepitelial. El grupo R siempre mostró bronco-obstrucción inmediata a lo largo de los retos con OVA, hiperreactividad a la histamina, IgG1 e IgE específicas para OVA, infiltración de eosinófilos y neutrófilos en el LBA y una respuesta polarizada al perfil Th2. El grupo NR no desarrolló eosinofilia ni cambios en el perfil Th2, pero si un incremento en el número de linfocitos Tr1, Th3 y Foxp3<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que la respuesta bronco-obstrucciona en el cobayo esta asociada a la liberación de histamina y tromboxano A<sub>2</sub> inducida por IgE, mientras que la hiperreactividad de las vías aéreas puede ocurrir independientemente del desarrollo de respuesta bronco-obstrucciona e inflamatoria. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que la fibrosis subepitelial no contribuye al desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas y aunque los linfocitos T Foxp3<sup>+</sup> podrían estar asociados con la disminución en la progresión hacia la inflamación, no son capaces de prevenir la hiperreactividad de las vías aéreas en el modelo agudo ni el desarrollo de fibrosis subepitelial en el modelo crónico. Finalmente, el modelo de cobayos NR al alérgeno que desarrollan hiperreactividad en ausencia de respuesta inflamatoria puede representar una importante herramienta para comprender los mecanismos que inducen la hiperreactividad de las vías aéreas.

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígeno (por sus siglas en inglés, <i>antigen-presenting cell</i> )
ARNm	ARN mensajero
CCL	Quimiocina de la familia CC
CXCL	Quimiocina de la familia CXC
CysLTs	Cisteinil leucotrienos
DP <sub>20</sub>	Dosis provocativa 20
DP <sub>200</sub>	Dosis provocativa 200
ELISA	Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzima
FcεRI	Receptor de alta afinidad de inmunoglobulina E
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (por sus siglas en inglés, forced expiratory volume in the first second)
h	hora
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
íB	Índice de bronco-obstrucción
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG1	Inmunoglobulina G 1
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
i.p.	intraperitoneal
iTreg	Linfocito T regulador inducido

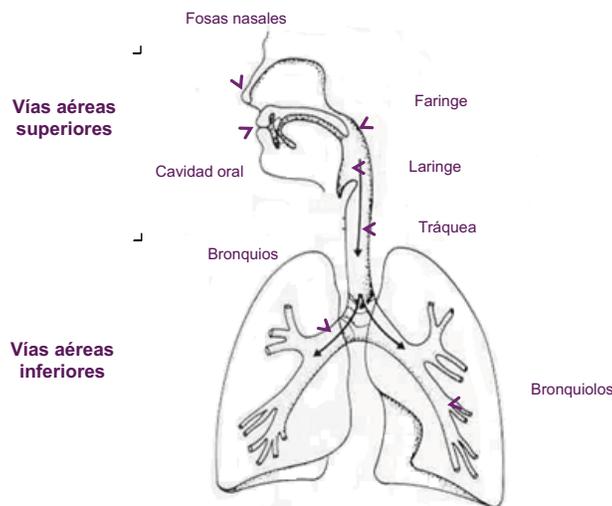
kD	kilodalton
LBA	Lavado bronquioalveolar
LTD4	Leucotrieno D4
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MCH-II, por sus siglas en inglés, <i>major histocompatibility complex</i> )
min	minutos
ml	mililitro
ng	nanogramo
NK	Células asesinas naturales (por sus siglas en inglés, <i>natural killer</i> )
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
NR	Cobayos del grupo no respondedor
nTreg	Linfocito T regulador natural
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Solución amortiguadora de sales y fosfatos
pg	picogramo
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (por sus siglas en inglés, <i>Phorbol myristate acetate</i> )
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (por sus siglas en inglés <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
R	Cobayos del grupo respondedor
Rmax	Respuesta máxima
s	segundo
SS	Cobayos del grupo sin sensibilizar
SSF	Solución salina fisiológica
Tconv	Linfocito T convencional
TCR	Receptor de célula T (por sus siglas en inglés, <i>T Cell Receptor</i> )

TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta 1 (por sus siglas en Inglés, <i>Transforming growth factor beta-1</i> )
Th	Linfocito T cooperador (por sus siglas en inglés, <i>T helper</i> )
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (por sus siglas en inglés, <i>Tumor necrosis factor</i> )
Treg	Linfocito T regulador
TXA2	Tromboxano A2
TXB2	Tromboxano B2
VA	Vías aéreas
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Vías aéreas.

El sistema respiratorio de mamíferos se divide en una parte conductora, una parte respiratoria y un mecanismo de ventilación<sup>1</sup>. La parte conductora, conocida como vías aéreas, consiste en una serie de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran en el pulmón<sup>2</sup>. Las vías aéreas superiores están formadas por las fosas nasales, la cavidad oral y la faringe, mientras que las vías aéreas inferiores son la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos (Fig. 1)<sup>1,2</sup>.



**Figura 1. Estructura de las vías aéreas en humano.**

La pared de las vías aéreas consiste en una capa mucosa, una capa de músculo liso y una capa fibrosa<sup>3</sup>. La capa mucosa incluye al epitelio, la membrana basal y la lámina propia. La capa de músculo liso disminuye conforme las vías aéreas disminuyen su calibre y desaparece en la parte respiratoria, los alvéolos. La capa fibrosa está conformada por cartílago y se encuentra solo en la tráquea y los bronquios<sup>3,4</sup> (Fig. 2). Las vías aéreas tienen la función de conducir el aire hacia los alvéolos<sup>2</sup>. Adicionalmente, en las vías aéreas el aire inspirado se entibia, se humedece y se eliminan los vapores hidrosolubles, el polvo y las bacterias ya que son captados por la membrana mucosa<sup>1</sup>. Los desórdenes funcionales y estructurales en las vías aéreas se han asociado a diversas enfermedades, entre ellas se encuentra el asma.

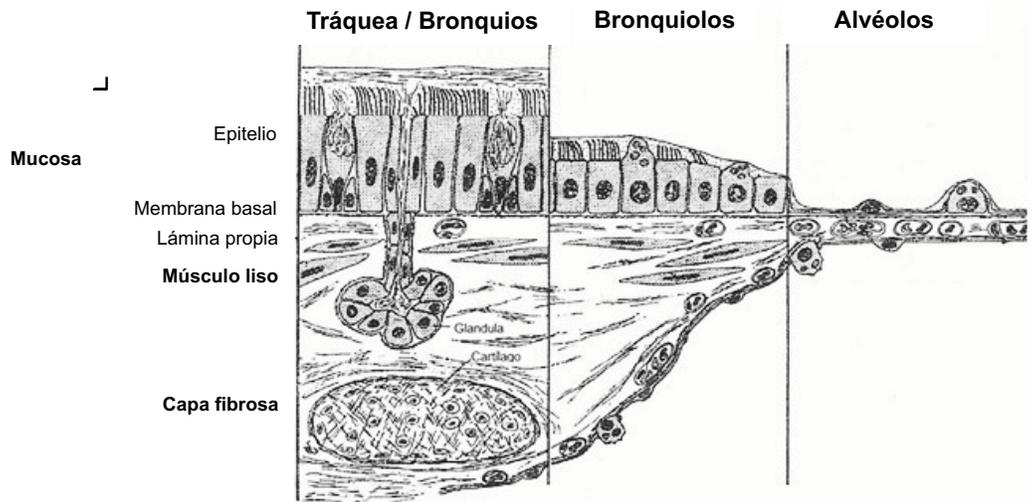


Figura 2. Estructura de la pared de las vías aéreas. Modificado de Jaramillo F., 2000<sup>4</sup>.

## 1.2 Asma.

### 1.2.1 Definición.

El asma es una enfermedad compleja y heterogénea que se ha definido por sus características clínicas, fisiológicas y patológicas como un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas en el que participan diversas células y elementos celulares<sup>5</sup>. La inflamación crónica está asociada con el incremento en la respuesta de las vías aéreas a una variedad de estímulos y conduce a episodios recurrentes de síntomas respiratorios, como sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Estos síntomas están asociados con la obstrucción generalizada pero variable del flujo de aire que frecuentemente es reversible de manera espontánea o con tratamiento<sup>5,6,7,8</sup>.

### 1.2.2 Etiología.

Los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de asma pueden ser factores relacionados con el huésped y factores ambientales<sup>5,7</sup>. Entre los primeros se encuentran genes que predisponen al incremento en los niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica para antígenos inocuos del medio ambiente denominados alérgenos. La producción de IgE específica para alérgenos se conoce como atopía<sup>9,10</sup>. Otros genes predisponen a la generación de mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción de las vías aéreas. También se ha descrito que la obesidad y el género son

factores de riesgo para desarrollar asma <sup>5</sup>. Entre los factores ambientales se encuentran aquellos que influyen en la expresión de los síntomas de la enfermedad, como la exposición a alérgenos, la contaminación ambiental, las infecciones virales, el humo del tabaco, los sensibilizadores ocupacionales, el ejercicio, la dieta y algunos fármacos como la aspirina <sup>5,6</sup>.

### **1.2.3 Epidemiología.**

El asma es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y su prevalencia se ha incrementado considerablemente en los últimos 20 años <sup>5, 11</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen 235 millones de pacientes con asma siendo la enfermedad crónica más frecuente en niños. Más del 80% de las muertes por asma tienen lugar en países con bajos ingresos. En el 2005 se registraron 255 mil muertes por asma y se ha sugerido su incremento en casi un 20% en los próximos 10 años <sup>11</sup>. En México la prevalencia de asma es del 2.5 al 5% y se estima que suceden 14.5 muertes por cada 100 mil asmáticos <sup>12, 13</sup>, lo que sugiere que esta enfermedad no se trata oportunamente predisponiendo a su persistencia o al incremento en su severidad. El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) reportó que en el 2011 el asma fue la principal causa de atención en la consulta externa y ocupó el primer lugar entre las diez principales causas de atención en la unidad de urgencias respiratorias <sup>14</sup>. El asma representa una significativa carga económica para los pacientes ya que su atención genera elevados costos directos e indirectos. Los ingresos a hospitales y los medicamentos son considerados costos directos, mientras que los costos indirectos incluyen el ausentismo laboral y escolar. Adicionalmente, la calidad de vida de los pacientes se ve afectada de manera importante ya que repercute sobre aspectos sociales y afectivos <sup>5</sup>. Debido a que el asma es una enfermedad con múltiples fenotipos se han propuesto diferentes esquemas para clasificarla y tener un mejor tratamiento clínico <sup>5, 15</sup>.

### **1.2.4 Clasificación.**

Diversos criterios han sido establecidos para agrupar a los pacientes con asma <sup>16, 17</sup>. De acuerdo a la frecuencia de los síntomas, el asma se ha clasificado en episódica, persistente, estacional y nocturna o matutina. La clasificación según el control de la enfermedad divide al asma en controlada y no controlada. Esta clasificación tiene como criterio la calidad de vida del paciente y la cantidad de medicamentos que se requieren para su control <sup>18, 19</sup>. El criterio según la severidad de la enfermedad combina la

frecuencia de los síntomas, pruebas de función pulmonar y marcadores de inflamación, por lo que el asma se puede clasificar como intermitente y persistente. El asma persistente a su vez se clasifica en leve, moderada o severa <sup>5, 17, 18</sup>. De acuerdo a su etiología el asma se ha clasificado en extrínseca o alérgica e intrínseca o no alérgica <sup>20, 21</sup>. El asma alérgica se origina por una reacción de hipersensibilidad tipo I y los síntomas aparecen como consecuencia del contacto con alérgenos como el polen, los ácaros, el moho o los hongos, éstos conducen al sistema inmune a una reacción inflamatoria exacerbada <sup>6, 10</sup>. En el asma no alérgica los síntomas no se asocian con la exposición a estos alérgenos y los pacientes reaccionan ante un variado número de estímulos como el aire frío o seco, el exceso de humedad, el ejercicio físico, los contaminantes o las infecciones y se ha sugerido que puede ser una forma de autoinmunidad o autoalergia debido a la activación anormal de linfocitos <sup>7, 21</sup>. El asma alérgica y no alérgica son clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similares. Por ejemplo, en ambos tipos existe una elevada producción de linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés, *T helper*) de la clase 2 (Th2), eosinófilos y mediadores pro-inflamatorios <sup>20, 21</sup>. La forma más frecuente de asma es de origen alérgico <sup>10</sup> y en algunos pacientes esta el asma alérgica y no alérgica s dos formas pueden coexistir <sup>7</sup>.

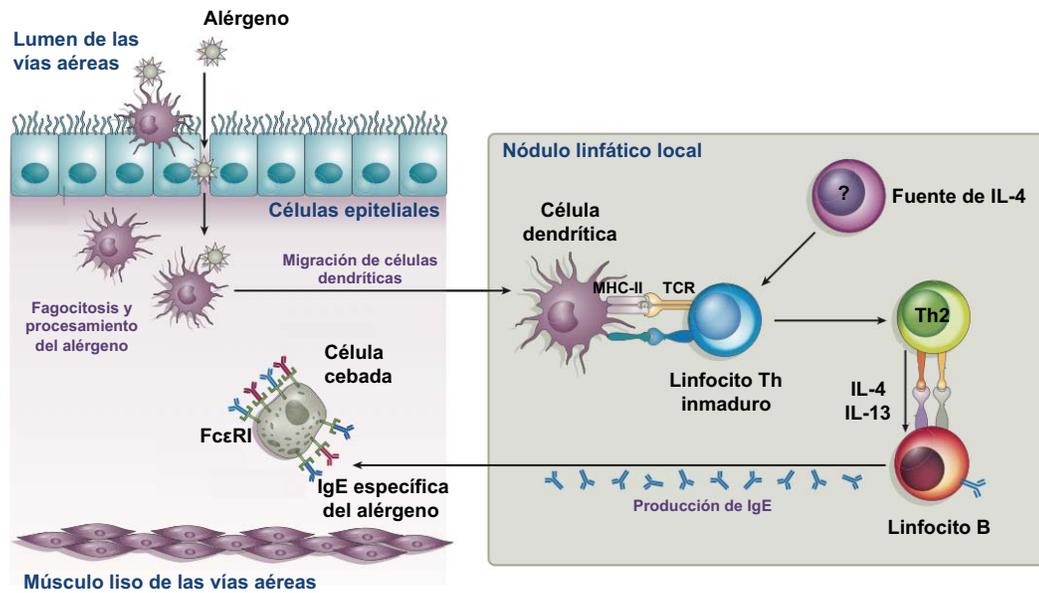
### **1.3 Mecanismos inmunológicos del asma alérgica.**

El asma alérgica esta mediada por mecanismos inmunológicos que pueden dividirse en 1) fase de sensibilización; 2) fase efectora, que a su vez se subdivide en respuesta alérgica temprana y respuesta alérgica tardía y 3) fase crónica <sup>9, 22, 23</sup>.

#### **1.3.1 Sensibilización al alérgeno.**

El proceso de sensibilización ocurre cuando el alérgeno es captado en el lumen de las vías aéreas por células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés, *antigen-presenting cell*) particularmente células dendríticas y macrófagos. Las APC degradan al alérgeno y unen los péptidos al complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MCH-II, por sus siglas en inglés, *major histocompatibility complex*) <sup>23, 24, 25</sup>. Posteriormente las APC migran hacia los nódulos linfáticos locales e interactúan, a través del MHC-II, con el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés, *T Cell Receptor*) cooperadores inmaduros lo que conduce a su activación <sup>6, 25</sup>. Una vez activado, en presencia de interleucina (IL)-4, el linfocito Th se diferencia hacia un linfocito Th2 que secreta IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Los linfocitos Th2 activan al linfocito B y

promueven la producción de IgE. La IgE se une a su receptor FcεRI sobre la superficie de células cebadas y basófilos dando lugar a la sensibilización<sup>6, 23, 26</sup>.



**Figura 3. Proceso de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas.** FcεRI, receptor de IgE de alta afinidad; IgE, inmunoglobulina E; MHC-II, complejo principal de histocompatibilidad de clase II; TCR, receptor de célula; Th, linfocito T cooperador. *Modificado de Galli S., 2008*<sup>23</sup>

### 1.3.2 Respuesta alérgica temprana o inmediata.

Después del proceso de sensibilización, la respuesta temprana se inicia cuando el alérgeno entra nuevamente en contacto con la mucosa traqueo-bronquial y se une a la IgE específica sobre células cebadas y basófilos. Las células sensibilizadas son activadas y secretan mediadores pro-inflamatorios preformados, como histamina, proteasas, proteoglicanos y nucleótidos; así como lípidos sintetizados *de novo*, como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos; y polipéptidos, como citocinas y quimiocinas<sup>23, 24, 27, 28</sup>. En conjunto, estos mediadores inducen la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, la vasodilatación y el incremento en la permeabilidad vascular, por lo que el calibre de las vías aéreas se reduce y limita el flujo de aire conduciendo a la manifestación de los síntomas respiratorios<sup>9, 28</sup>. La respuesta temprana alcanza su pico máximo en los primeros 15 minutos y se resuelve de 30-60 minutos<sup>24, 29</sup>.

### **1.3.3 Respuesta alérgica tardía.**

La respuesta tardía ocurre horas después de la exposición al alérgeno y se caracteriza por la infiltración y activación de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos Th2<sup>24</sup>. Adicionalmente se incrementa la expresión de moléculas de adhesión celular y la secreción de mediadores pro-inflamatorios, tanto por células residentes de las vías aéreas, como el epitelio y el músculo liso, como por las células del sistema inmune infiltradas, dando lugar a una segunda manifestación de los síntomas respiratorios<sup>23, 24</sup>. El reclutamiento selectivo de leucocitos hacia las vías aéreas se debe a la secreción local de mediadores como las citocinas<sup>24, 30</sup>. Durante el asma, las citocinas inducen la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, la extravasación microvascular y el reclutamiento y activación de células inflamatorias hacia las vías aéreas dando lugar a la inflamación crónica<sup>31, 32</sup>.

### **1.3.4 Inflamación crónica.**

La inflamación es una respuesta fisiológica ante diversos estímulos e involucra el reclutamiento y activación de células encargadas de eliminar agentes infecciosos y restaurar la estructura y función del tejido dañado<sup>33</sup>. Sin embargo, la respuesta inflamatoria exagerada induce cambios en la estructura de las vías aéreas y conduce al desarrollo de asma<sup>5</sup>. La inflamación crónica durante el asma se caracteriza por la infiltración de linfocitos T, eosinófilos, macrófagos/monocitos, células cebadas y neutrófilos. La inflamación crónica puede acompañarse de exacerbaciones agudas con un incremento en el número de eosinófilos y neutrófilos en la submucosa de las vías aéreas y la liberación de mediadores, como la histamina y los leucotrienos, que inducen bronco-constricción, formación de edema y secreción de moco<sup>9, 24, 32, 34</sup>. También se han observado cambios en las células residentes de las vías aéreas, como el engrosamiento de la capa del músculo liso, incremento en el número de miofibroblastos e incremento en el número de células en copa secretoras de moco<sup>24, 34</sup>. La inflamación crónica es un proceso inducido por la exposición repetitiva al alérgeno y las citocinas juegan un papel integral en perpetuar la inflamación<sup>32, 35, 36</sup>. Las citocinas son proteínas de señalización extracelular menores a 80 kD y son producidas por diferentes tipos celulares<sup>25</sup>. En la Tabla 1 se resumen algunas citocinas, sus principales fuentes celulares y su papel en la patogénesis del asma.

**Tabla 1. Principales citocinas involucradas en la patogénesis del asma**

Citocina	Fuente celular	Función durante el asma
IL-2	Linfocitos Th2	Activación de eosinófilos, crecimiento y diferenciación de linfocitos T.
IL-3	Linfocitos Th2, células cebadas, eosinófilos	Diferenciación de eosinófilos y neutrófilos, activación, supervivencia y quimiotaxis de eosinófilos.
IL-4	Linfocitos T, células cebadas	Síntesis de IgE, factor de crecimiento de linfocitos Th2, inhibición de linfocitos Th1, adhesión endotelial y sobreproducción de moco.
IL-5	Linfocitos T, células cebadas	Diferenciación, maduración y activación de eosinófilos, adhesión y quimiotaxis de eosinófilos, diferenciación de basófilos, cofactor en la síntesis de IgE. Remodelación de las vías aéreas.
IL-6	Linfocitos Th2, epitelio de las vías aéreas	Diferenciación de linfocitos Th17, inhibe la supresión mediada por linfocitos Treg.
IL-9	Linfocitos Th2, Th9, eosinófilos	Incrementa la producción de citocinas Th2, la producción de moco y la diferenciación de eosinófilos y basófilos. Factor de crecimiento de células cebadas y linfocitos T. Induce hiperreactividad de las vías aéreas.
IL-10	Linfocitos T, monocitos y macrófagos	Disminuye la supervivencia de eosinófilos, inhibición de células Th1/Th2 y disminución de la activación de monocitos/macrófagos. Inhibe la respuesta asmática tardía y la quimiotaxis de eosinófilos.
IL-13	Linfocitos Th2	Producción de IgE, activación de monocitos y macrófagos, hiperplasia de células en copa. Remodelación de las vías aéreas.
IL-17A	Linfocitos Th17, neutrófilos	Asma severa, quimiotaxis, activación y supervivencia de neutrófilos. Induce hiperreactividad de las vías aéreas. Activación de fibroblastos, células epiteliales y endoteliales.
IFN- $\gamma$	Linfocitos T y células NK	Activación de macrófagos, disminución de la activación de eosinófilos, inhibición de linfocitos Th2, activación de células epiteliales y endoteliales, disminución de la síntesis de IgE y de la hiperreactividad de las vías aéreas.
TNF- $\alpha$	Macrófagos, células cebadas, fibroblastos	Quimiotaxis y activación de neutrófilos. Induce hiperreactividad de las vías aéreas. Activación de células epiteliales y endoteliales.
TGF- $\beta$	Linfocitos Th3, Tregs, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliales, fibroblastos, músculo liso.	Disminuye la proliferación de linfocitos T, proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, hiperplasia del músculo liso, quimiotaxis de monocitos, macrófagos y células cebadas, deposición de proteínas de matriz extracelular. Remodelación de las vías aéreas.
CCL3	Monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células cebadas, linfocitos y fibroblastos	Reclutamiento de monocitos, eosinófilos, células dendríticas, linfocitos T, células NK y fibroblastos.
CCL5	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> , células epiteliales, fibroblastos, plaquetas, células cebadas y monocitos.	Reclutamiento de eosinófilos y linfocitos T hacia pulmón. Activación de integrinas y degranulación de basófilos y eosinófilos.
CCL7	Linfocitos T	Activación de basófilos y eosinófilos, quimiotaxis de células dendríticas y monocitos.
CCL11	Células epiteliales, endotelio vascular, músculo liso, macrófagos y células cebadas	Reclutamiento y activación de eosinófilos.

## Continuación

Citocina	Fuente celular	Función durante el asma alérgica
CCL13	Células epiteliales, endotelio vascular	Activación y quimiotaxis de macrófagos, eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2. promueve la liberación de histamina por basófilos y células cebadas.
CCL17	Células epiteliales, células cebadas	Migración de linfocitos Th2 hacia pulmón.
CCL22	Células epiteliales, células cebadas, macrófagos	Migración de linfocitos Th2 hacia pulmón.
CXCL8	Macrófagos, células cebadas, eosinófilos, linfocitos T, neutrófilos y fibroblastos	Reclutamiento de neutrófilos

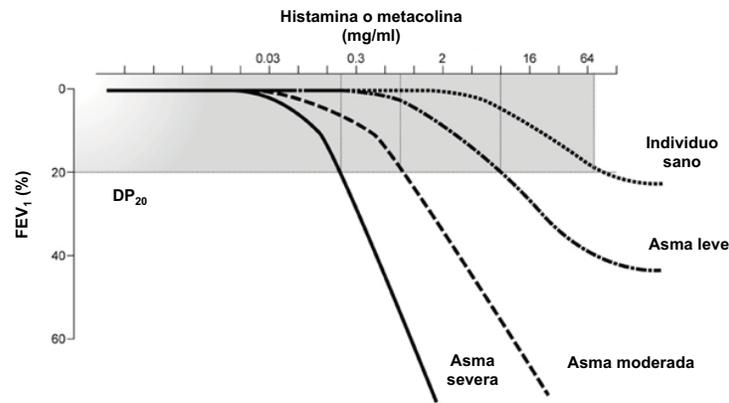
IL, interleucina; IFN, por sus siglas en inglés *Interferon-gamma*; TNF, por sus siglas en inglés *Tumor necrosis factor*; NK, por sus siglas en inglés, *natural killer*; TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés *Transforming growth factor beta*; CCL, quimiocina de la familia CC; CXCL, quimiocina de la familia CXC.

Fuente: <sup>35, 37, 38, 39, 40, 41, 42</sup>

Una importante consecuencia funcional de la inflamación crónica es que induce la inestabilidad de las vías aéreas haciendo que el calibre de esta estructura se reduzca exageradamente ante estímulos endógenos o exógenos, proceso conocido como hiperreactividad de las vías aéreas <sup>43</sup>.

### 1.4 Hiperreactividad de las vías aéreas.

La hiperreactividad es una respuesta bronco-constrictora exagerada del músculo liso ante la exposición a un pequeño estímulo que usualmente no provoca ninguna reacción en individuos sanos <sup>5, 20</sup>. La hiperreactividad es una característica clínica importante del asma y generalmente es proporcional al grado de severidad de la enfermedad <sup>44, 45, 46</sup>. La hiperreactividad de las vías aéreas suele evaluarse mediante la administración de concentraciones crecientes de un agente bronco-constrictor, como histamina o metacolina, que provoca la contracción del músculo liso. Esta respuesta se evalúa por medio de la dosis provocativa 20 (DP<sub>20</sub>) que se refiere a la concentración del agente que induce la disminución del 20% en la función pulmonar y el parámetro que evalúa directamente la obstrucción del flujo de aire es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>, por sus siglas en inglés, *forced expiratory volume in the first second*) <sup>2, 45, 47, 48</sup>. En sujetos sanos se requieren concentraciones elevadas del agente para inducir la disminución del 20% del FEV<sub>1</sub>, mientras que en sujetos con asma esta disminución se alcanza con concentraciones menores <sup>5, 43, 45</sup> (Fig. 4).



**Figura 4. Curvas dosis-respuesta que muestra los cambios en el volumen espiratorio forzado (FEV<sub>1</sub>) inducido por distintas dosis de histamina o metacolina.** En pacientes con asma severa la dosis provocativa 20 (DP<sub>20</sub>) es menor en comparación a la de pacientes con asma leve y asma moderada, mientras que un individuo sano tiene una respuesta máxima con una concentración mayor del agonista. Modificado de GINA 2012<sup>5</sup>.

Los factores que contribuyen a la hiperreactividad de las vías aéreas se han dividido en variables y persistentes<sup>43, 45</sup>. Los factores variables se asocian con el proceso inflamatorio y pueden ser influenciados por eventos ambientales como la exposición a alérgenos e infecciones respiratorias. Los factores persistentes han sido atribuidos a cambios en la estructura de las vías aéreas como el engrosamiento de la capa de músculo liso y el depósito de proteínas de matriz extracelular en la región subepitelial<sup>43, 45, 46</sup>. El proceso inflamatorio y los cambios en la estructura de las vías aéreas se han asociado con el desarrollo de la obstrucción del flujo de aire<sup>45</sup>.

### 1.5 Bronco-obstrucción.

La obstrucción del flujo de aire es la principal alteración funcional en el asma y da lugar a la crisis o exacerbación asmática. Durante la exacerbación asmática la obstrucción puede ocurrir en cualquier nivel del árbol traqueo-bronquial; sin embargo, las vías aéreas periféricas, son el principal sitio de obstrucción<sup>49</sup>. En pacientes con asma severa la bronco-obstrucción puede estar presente de forma continua y a partir de esta alteración pueden surgir otras anomalías funcionales, como el incremento del trabajo respiratorio, la alteración de los volúmenes pulmonares, el desequilibrio de la relación ventilación/perfusión y el compromiso del intercambio de gases. La bronco-obstrucción es ocasionada por la disminución del calibre de las vías aéreas, especialmente durante la espiración, y se debe a 1) la contracción del músculo liso, también denominado broncoespasmo, 2) la formación de edema y 3) la hipersecreción

de moco<sup>5,47</sup>. Durante la exacerbación asmática la obstrucción del flujo de aire suele ser episódica y generalmente es reversible de manera espontánea o con tratamiento. Sin embargo, en algunos pacientes la obstrucción se vuelve permanente debido al engrosamiento de la pared traqueo-bronquial como resultado de la inflamación crónica y/o remodelación<sup>50</sup>.

### **1.5.1 Remodelación de las vías aéreas.**

La remodelación involucra cambios en la composición, naturaleza y cantidad de los elementos estructurales de las vías aéreas como resultado de un proceso anormal de reparación inducido por la inflamación crónica<sup>51</sup>. Estos cambios involucran la hipertrofia e hiperplasia de las células del músculo liso, la deposición de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágena, y la activación de miofibroblastos en respuesta a citocinas y factores de crecimiento. En conjunto, estos cambios provocan el engrosamiento de la pared de las vías aéreas. Los cambios en la estructura de las vías aéreas conducen a la progresiva e irreversible obstrucción del flujo de aire y están asociados con la disminución de la función pulmonar en los pacientes con asma. La remodelación de las vías aéreas durante el asma involucra cambios en el epitelio, miofibroblastos, matriz extracelular y músculo liso. Estos cambios son orquestados por la interacción entre las células estructurales y las células inflamatorias infiltradas hacia las vías aéreas<sup>9, 34, 50, 51</sup>. La respuesta inflamatoria exacerbada en las vías aéreas se debe principalmente a defectos en la regulación de la respuesta inmune frente a los alérgenos y en este contexto, los linfocitos T reguladores (Treg) son un componente importante para limitar la respuesta inflamatoria y mantener la homeostasis pulmonar<sup>22, 52</sup>.

### **1.6 Linfocitos T reguladores.**

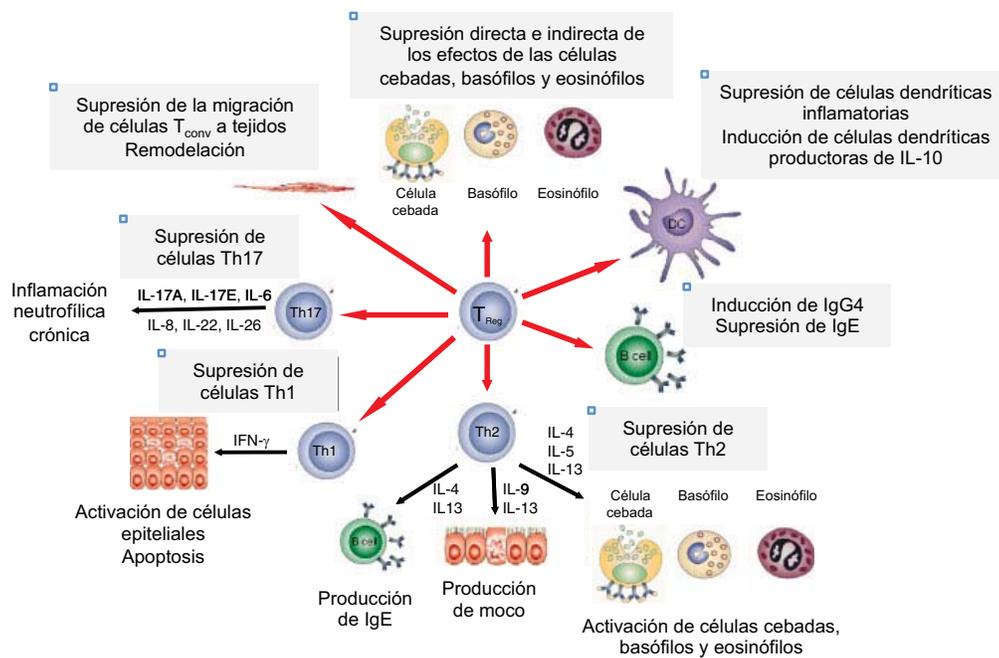
El término linfocitos T reguladores (Treg) se refiere a linfocitos T que modulan la función de otras células del sistema inmune. Los linfocitos Treg controlan el desarrollo de enfermedades autoinmunes y el rechazo de trasplantes, así como la respuesta inmune a agentes infecciosos, la inmunidad contra tumores y también tienen un papel crítico en controlar enfermedades alérgicas como el asma<sup>53, 54, 55</sup>. Los linfocitos Treg son un grupo heterogéneo de células que se originan tanto en el timo como en órganos linfoides periféricos y de acuerdo a su origen reciben un nombre en particular<sup>54</sup>.

El fenotipo de células CD25<sup>hi</sup> es característico de linfocitos Treg de origen tímico, mientras que los linfocitos Treg de origen periférico pueden ser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> <sup>56</sup>. Los linfocitos Treg generados en el timo se han denominado Treg naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (nTreg) y representan del 2 al 5% de los timocitos simples positivos CD4<sup>+</sup> <sup>53</sup>. Los linfocitos nTreg expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3 (por sus siglas en inglés, *forkhead box protein 3*) que es necesario para su desarrollo y función <sup>57</sup>. Los linfocitos Treg inducibles (iTreg) son generados en órganos linfoides periféricos en respuesta a antígenos foráneos o alérgenos y pueden o no expresar Foxp3. Los linfocitos iTreg Foxp3<sup>+</sup> se diferencian a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> en presencia de TGF-β y ácido retinoico, lo que los lleva a adquirir la función supresora <sup>58, 59, 60</sup>. Los linfocitos iTreg Foxp3<sup>-</sup> se han subdividido en Tr1 y Th3 y median la respuesta inmune vía la secreción de las citocinas IL-10 y TGF-β, respectivamente <sup>56</sup>. Los linfocitos iTregs tienen una expresión variable de CD25 dependiendo de su estado de activación y comparten el repertorio de TCR con los linfocitos T convencionales (T<sub>conv</sub>), lo que sugiere que los linfocitos iTreg controlan la respuesta inmune contra antígenos externos <sup>61, 62, 63</sup>. En modelos de asma alérgica se ha sugerido que tanto las nTreg como las iTreg controlan la enfermedad en una manera dependiente de IL-10 y TGF-β <sup>64</sup>.

### **1.7 Linfocitos T reguladores durante el asma alérgica.**

El pulmón está expuesto continuamente a una gran variedad de antígenos inocuos del medio ambiente y, por lo tanto debe mantener un estado de ignorancia o tolerancia inmunológica para mantener la homeostasis pulmonar y prevenir la potencial inmunopatología. Los linfocitos Treg tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de la inmunidad pulmonar. Los linfocitos Treg establecen la tolerancia inmune a antígenos inocuos y suprimen la respuesta inmune mediada por linfocitos T<sub>conv</sub> <sup>64, 65</sup>. En modelos animales de inflamación alérgica de las vías aéreas se ha descrito que la transferencia de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> atenúa la inflamación, la hiperreactividad y la remodelación de las vías aéreas mediante la secreción de IL-10 y TGF-β <sup>66</sup>. Diversos estudios señalan que la cooperación entre TGF-β e IL-10 tiene un papel importante durante la supresión de la inflamación alérgica mediada por iTreg <sup>67, 68, 69, 70</sup>. Los linfocitos Treg pueden interferir con el desarrollo de asma alérgica en diferentes fases como la sensibilización, la progresión hacia la inflamación, así como en la persistencia de las manifestaciones de la enfermedad, la hiperreactividad y la remodelación de las vías aéreas <sup>22, 71</sup>. Los linfocitos Treg suprimen la respuesta inflamatoria mediada por

linfocitos Th2 y Th17, así como de células cebadas, basófilos, neutrófilos y eosinófilos y promueven el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas <sup>72, 73</sup>. Adicionalmente, los linfocitos Treg suprimen la producción de IgE e IgG4 específicas de alérgenos <sup>74</sup> y promueven la formación de IgA e IgM <sup>75</sup>. También se ha descrito que los linfocitos Treg juegan un papel importante durante la remodelación al interactuar con las células residentes de las vías aéreas <sup>22, 70</sup> (Fig. 5). La comprensión de los mecanismos mediante los cuales los linfocitos Treg controlan la inflamación alérgica durante el asma, así como la fisiopatología de la enfermedad, ha sido posible gracias al uso de modelos de asma en animales.



**Figura 5. Linfocitos T reguladores durante el asma alérgica.** Los linfocitos Treg suprimen la respuesta inmune Th2 y contribuyen en el control de enfermedades alérgicas como el asma. Las flechas rojas indican los efectos regulador y supresor que los linfocitos Treg ejercen directamente o indirectamente sobre las células efectoras (células cebadas, basófilos y eosinófilos), células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T<sub>conv</sub> (Th1, Th2 y Th17) y células estructurales. Las flechas negras indican los mecanismos que contribuyen a la inflamación alérgica. *Modificado de Palomares O., 2010* <sup>22</sup>.

## 1.8 Modelos de asma en animales.

Los modelos de asma en animales han sido utilizados ampliamente para examinar los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, así como en estudios pre-clínicos <sup>76, 77</sup>. Comúnmente se utiliza la sensibilización sistémica con proteínas

foráneas, como la OVA, y el adyuvante hidróxido de aluminio para inducir una respuesta inmune del tipo Th2 y la producción de IgE específica. Una vez sensibilizados, los animales son expuestos a OVA inhalada o administrada vía intratraqueal o intranasal para inducir el desarrollo de eosinofilia e hiperreactividad de las vías aéreas<sup>78, 79</sup>. Existe una amplia variedad de modelos de asma en diferentes especies. Los modelos de asma más utilizados han sido los modelos en ratón, rata y cobayo<sup>76, 80, 81</sup>.

El cobayo es un buen modelo de asma ya que desarrolla una respuesta alérgica a antígenos foráneos muy similar a la del humano, compuesta por eosinófilos y neutrófilos; así como hiperreactividad a agonistas colinérgicos y la producción de IgG1 e IgE<sup>82</sup>. Aunque la escasez de cepas endogámicas y la falta de reactivos específicos son dos limitantes en el uso del cobayo como modelo experimental, estos animales exhiben cambios en la estructura de las vías aéreas similares a los que ocurren en pacientes asmáticos y han sido ampliamente utilizados en la evaluación de terapias contra el asma. Adicionalmente, la anatomía de las vías aéreas del cobayo es muy similar a la del humano<sup>76, 82, 83</sup>, lo que permite extrapolar los resultados obtenidos en la evaluación de la función pulmonar en el cobayo. En este contexto, el modelo de asma en cobayo ofrece un atractivo sistema para estudiar los eventos fisiopatológicos que originan la alteración de la función respiratoria en el asma y que resultan en la bronco-obstrucción.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El asma se caracteriza por episodios recurrentes de síntomas respiratorios asociados a la bronco-obstrucción. Una de las limitantes en el diagnóstico de asma es la variación en la percepción, severidad y frecuencia de la bronco-obstrucción, lo que repercute directamente en el control de la enfermedad y en la calidad de vida del paciente. La bronco-obstrucción en pacientes asmáticos se ha relacionado directamente con el grado de inflamación de las vías aéreas, por lo que la identificación de marcadores de inflamación asociados con la bronco-obstrucción podría contribuir al diagnóstico adecuado de la enfermedad y así minimizar el impacto negativo en la calidad de vida del paciente.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el modelo de asma alérgica en cobayo desarrollado por nuestro grupo de trabajo la exposición a OVA inhalada induce dos patrones de respuesta bronco-obstructiva. Un grupo de cobayos desarrolla una respuesta bronco-obstructiva transitoria típica del modelo de asma (cobayos respondedores, R)<sup>84, 85</sup>, mientras que alrededor del 20% de los cobayos no desarrollan una respuesta bronco-obstructiva después de uno o varios retos con OVA (cobayos no respondedores, NR) (n = 200). Observaciones similares se han descrito por otros autores en cobayos<sup>86</sup> y ratones<sup>87, 88</sup>; sin embargo, la falta de respuesta bronco-obstructiva al alérgeno ha sido un criterio de exclusión en los estudios. Adicionalmente, algunos pacientes con asma no son capaces de percibir la bronco-obstrucción ni cuantificar la dificultad respiratoria asociada a las variaciones del flujo de aire, lo que contribuye a la dificultad en el diagnóstico y por lo tanto al retraso en el inicio de un tratamiento adecuado<sup>89, 90</sup>. Algunos estudios han sugerido que la variabilidad en la respuesta bronco-obstructiva está asociada con el grado de inflamación de las vías aéreas<sup>91, 92, 93</sup>. Probablemente, los patrones de respuesta bronco-obstructiva observados en nuestro modelo de asma alérgica en cobayo son dependientes de la presencia y tipo de inflamación de las vías aéreas. Por ello, en este trabajo examinamos las características inmuno-fisiopatológicas de las vías aéreas de cobayos no respondedores a OVA.

## 4. HIPÓTESIS

Si la respuesta bronco-obstructiva inducida por alérgeno está mediada por mecanismos inflamatorios, es probable que existan diferencias en la respuesta inmune asociada a la inflamación entre los cobayos respondedores y no respondedores al alérgeno.

## 5. OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Analizar la respuesta inmune asociada a la inflamación de las vías aéreas en cobayos respondedores y no respondedores al alérgeno.

### ***Objetivos particulares***

1. Evaluar la respuesta alérgica en el modelo agudo de asma en cobayo.
  - 1.1 Cuantificar los niveles de IgG1 e IgE específicos para OVA.
  - 1.2 Cuantificar los niveles de mediadores químicos de la inflamación: histamina, tromboxano A<sub>2</sub> y cisteinil leucotrienos.
  - 1.3 Determinar *in vitro* la funcionalidad del músculo liso en respuesta a agonistas que inducen su contracción en cobayos expuestos a OVA.
  - 1.4 Medir el grado de reactividad a la histamina en cobayos expuestos a OVA.
  
2. Desarrollar un modelo de asma crónica en el cobayo.
  - 2.1 Evaluar la reactividad a la histamina en cobayos del modelo de asma crónica.
  - 2.2 Cuantificar el grado de fibrosis subepitelial en cobayos expuestos de manera crónica a OVA.
  
3. Caracterizar la respuesta inflamatoria en los cobayos del modelo agudo y del modelo crónico de asma.
  - 3.1 Cuantificar las poblaciones de células inflamatorias infiltradas en LBA

- 3.2 Cuantificar los niveles de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en sobrenadantes de homogenado pulmonar.
  - 3.3 Cuantificar los niveles de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en el LBA.
  - 3.4 Medir las citocinas intracelulares IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 en células infiltradas en el LBA.
  - 3.5 Medir la expresión del ARN mensajero (ARNm) de las citocinas IL-10, IL-13, IL-17A y TGF- $\beta$ 1 en pulmón.
4. Analizar el perfil de la respuesta inmune mediada por linfocitos T<sub>conv</sub> en el LBA de cobayos expuestos a OVA.
    - 4.1 Caracterizar la población de linfocitos en LBA mediante citometría de flujo.
    - 4.2 Analizar la fracción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos mediante citometría de flujo.
    - 4.3 Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Th17 mediante citometría de flujo.
5. Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos Treg en el LBA de cobayos expuestos a OVA.
    - 5.1 Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos Tr1 y Th3.
    - 5.2 Cuantificar la subpoblación de linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup>
    - 5.3 Cuantificar el ARNm de Foxp3<sup>+</sup> en el pulmón de los cobayos expuestos a OVA.

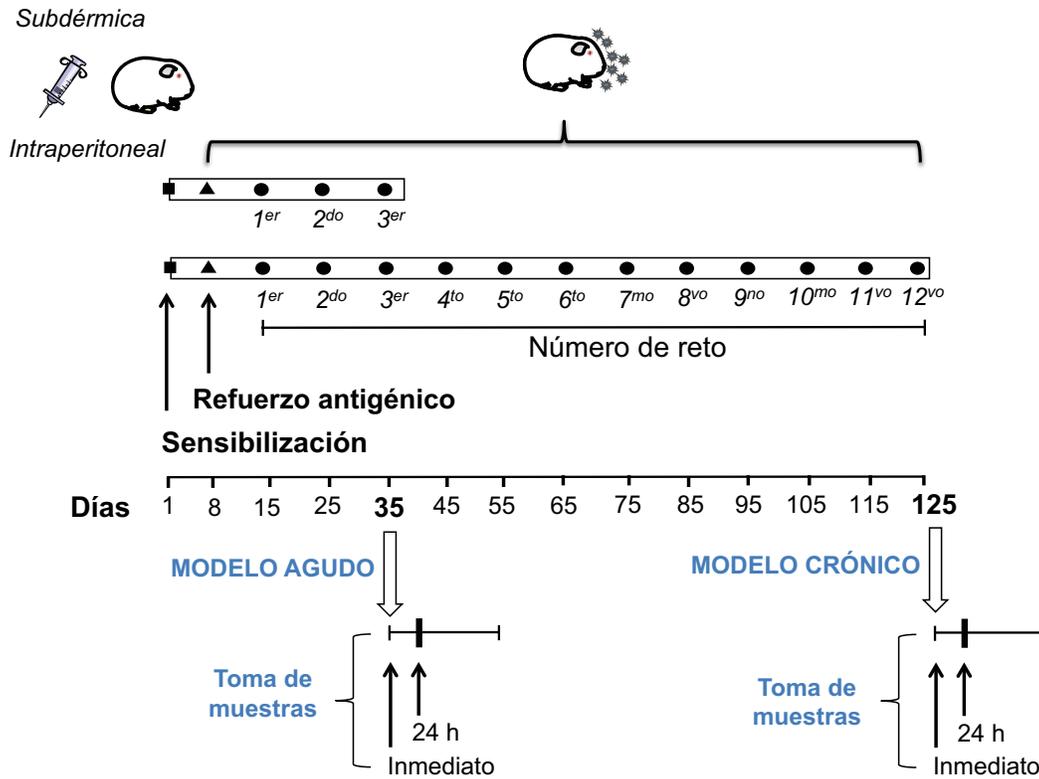
## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales.

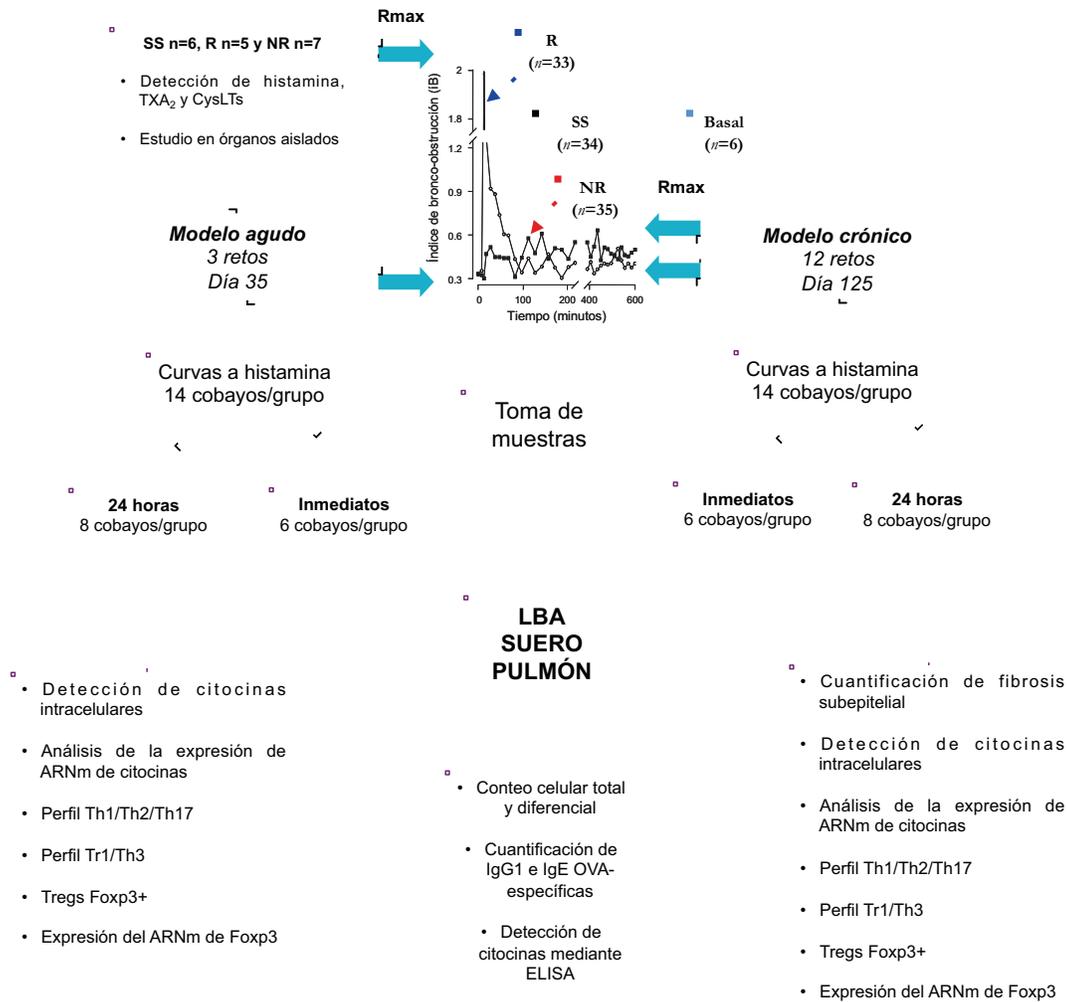
En este estudio se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados entre 350 a 400 g al inicio del protocolo. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de temperatura, humedad y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). Las condiciones consistieron en aire acondicionado filtrado, una temperatura  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50 a 60% de humedad, 12/12 horas de ciclo luz y oscuridad y cama esterilizada. Los animales se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan, S.A de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el comité ético y científico del INER.

### Diseño de estudio.

Después del protocolo inicial de sensibilización y refuerzo antigénico (Fig. 6) los cobayos fueron expuestos intermitente a aerosoles de OVA. Se seleccionaron 33 cobayos que mostraron obstrucción de las vías aéreas después del reto con OVA (respondedores, R) y 35 cobayos que no mostraron una respuesta obstructiva (no respondedores, NR) desde el primer reto (día 15). Los cobayos recibieron tres (modelo agudo) o doce (modelo crónico) retos con OVA que corresponden a los días 35 o 125, respectivamente. Los retos fueron aplicados a intervalos de diez días (Fig. 6). Se incluyeron 14 cobayos de cada grupo en el modelo agudo y 14 cobayos en el modelo crónico. En los días 35 y 125 se evaluó la reactividad de las vías utilizando curvas dosis-respuesta a histamina. En el estudio se incluyeron dos grupos sin sensibilizar (SS) correspondientes a la edad de los cobayos. Estos cobayos recibieron retos con solución salina fisiológica (SSF) e histamina para evaluar la reactividad de las vías aéreas. Adicionalmente, se incluyó un grupo de cobayos SS (n=6) que no recibió histamina para evaluar la reactividad de las vías aéreas, éste grupo fue considerado como el grupo basal para los parámetros inflamatorios analizados. Para los estudios en órganos aislados y para la cuantificación de mediadores químicos (histamina, tromboxano  $A_2$  y cisteinil leucotrienos), los cobayos no recibieron curvas a histamina (SS, n= 6; R, n=5 y NR, n=7). Las muestras de LBA, suero y tejido pulmonar fueron obtenidas inmediatamente después de evaluar la reactividad de las vías aéreas (grupos inmediatos) o 24 horas después (grupos 24 h) (Fig. 7).



**Figura 6. Esquema de sensibilización y administración de los retos con el alérgeno.** El modelo de alergia pulmonar se realizó en cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH. El día 1 se administró a cada cobayo una suspensión que contenía 60  $\mu$ g de OVA e hidróxido de aluminio. El día 8 se dio un refuerzo antigénico con 3 mg/ml de OVA inhalada. El primer reto por nebulización se dio el día 15 con una solución de 1 mg/ml de OVA. Los cobayos fueron retados cada diez días hasta completar tres retos (modelo agudo) o doce retos (modelo crónico). La reactividad de las vías aéreas se evaluó en el tercer y doceavo retos. Las muestras de suero, lavado bronquioalveolar (LBA) y tejido pulmonar se obtuvieron de manera inmediata ó 24 horas (h) después del reto.



**Figura 7. Diseño general del estudio.** SS, sin sensibilizar; R, respondedor; NR, no respondedor; iB, índice de bronco-obstrucción; Rmax, respuesta bronco-obstructiva máxima; LBA, lavado bronquioalveolar; TXA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>; CysLTs, cisteinil leucotrienos.

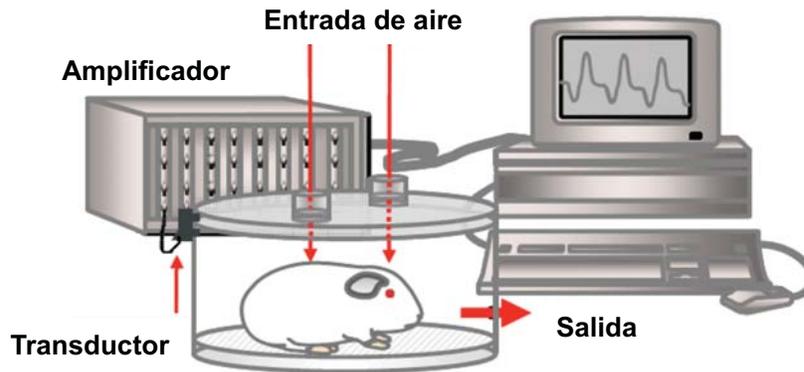
## Modelo experimental.

### Día 1: Sensibilización antigénica.

El primer día los animales fueron sensibilizados con OVA por vía intraperitoneal (i.p.) y subdérmica mediante una inyección que contenía 0.5 ml de una solución de OVA (60 µg/ml) Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.) e hidróxido de aluminio (1 mg/ml) (J.T. Baker, NJ, E.U.) disueltos en SSF (modificado de Campos G., 2001<sup>94</sup>) (Fig. 6).

## Día 8: Refuerzo antigénico.

El día ocho se administraron aerosoles de OVA. Los cobayos fueron colocados por separado dentro de una cámara provista de flujo de aire continuo (10 ml/s) y que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. La OVA fue nebulizada (3 mg/ml SSF) durante 5 minutos con un nebulizador US-Bennett (flujo de 2 ml/min). Este nebulizador produce una mezcla de partículas en donde el 44% es menor a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, el 38% de 4 a 10  $\mu\text{m}$  y el 18% mayor a 10  $\mu\text{m}$ . Cinco minutos antes y durante una hora posterior al refuerzo antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, E.U.) (Fig. 8).



**Figura 8. Representación esquemática del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento.** El transductor de presión diferencial registra los cambios de presión dentro de la cámara con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente a una computadora para su procesamiento.

## Pletismografía barométrica.

El sistema de pletismografía barométrica está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de una cámara y las compara con una cámara de referencia <sup>95</sup>. Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL4DN SenSym, Milpitas, CA, E.U.) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada mediante un programa de cómputo (Buxco Biosistem XA v1.1). Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más con un tiempo mínimo espiratorio de 15

segundos, tiempo inspirado de 3 segundos y una diferencia máxima entre los volúmenes inspirados y expirados del 10%. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de no incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada periodo fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. El valor del índice de bronco-obstrucción (íB) consistió en el promedio de 15 segundos de lecturas y de éstas, el promedio de los últimos 5 minutos de cada periodo.

El íB refleja el grado de obstrucción de las vías aéreas y se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y del que está dentro de los pulmones del cobayo. Durante la inspiración el aire ambiental se calienta de 25° a 37°C y se humidifica al 100% una vez que está dentro de los pulmones. Los sensores de la cámara de pletismografía detectan el cambio en el volumen como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio pues disminuye conforme el animal exhala el aire, el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente bajando el volumen del aire dentro de la cámara y este proceso se registra como una disminución en la presión. Aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa de la computadora, previamente calibrado, puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y la espiración en el tiempo <sup>96</sup> (Fig. 9). Para calcular el valor del íB el programa utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{íB} = ((\text{Te}-\text{Tr}) / \text{Tr}) (\text{PFE} / \text{PFI})$$

donde:

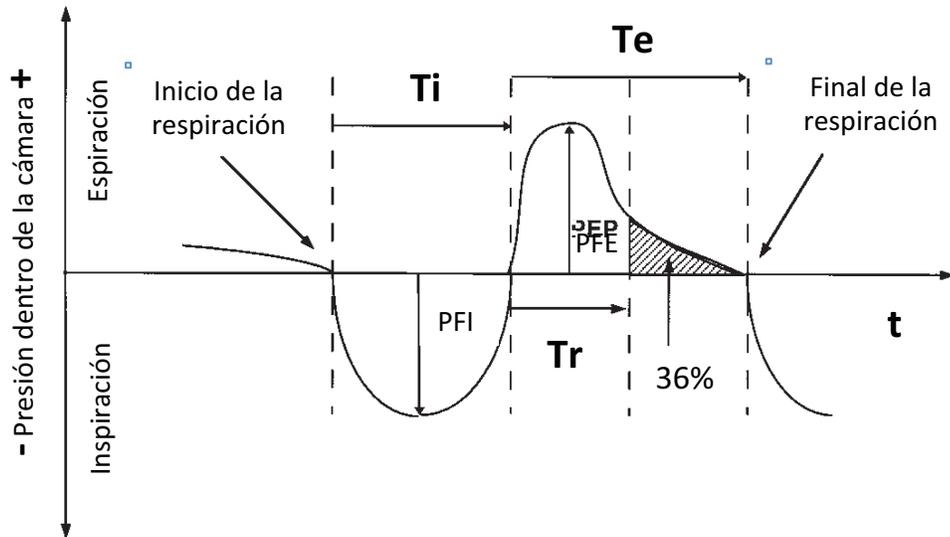
íB= Índice de bronco-obstrucción

Te= Tiempo total espiratorio (s)

Tr= Tiempo total de relajación (s)

PFE= Pico de flujo espiratorio (presión pasiva máxima, cmH<sub>2</sub>O)

PFI= Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH<sub>2</sub>O)



**Figura 9. Parámetros medidos en la pletismografía barométrica.** Esquema de un ciclo respiratorio donde se muestra la fase de inspiración (abajo) y la fase de espiración (arriba) que explica el cálculo de los parámetros en una cámara de presión para animales en libre movimiento. Ti, tiempo de inspiración en segundos; Te, tiempo de espiración; PFI, pico de flujo inspiratorio (ml/s); PFE, pico de flujo espiratorio (ml/s); Tr, tiempo de relajación en segundos, tiempo en el cual la presión cae un 36% del total de la presión dentro de la cámara durante la espiración. *Modificado de Hamelmann E., 1997*<sup>96</sup>.

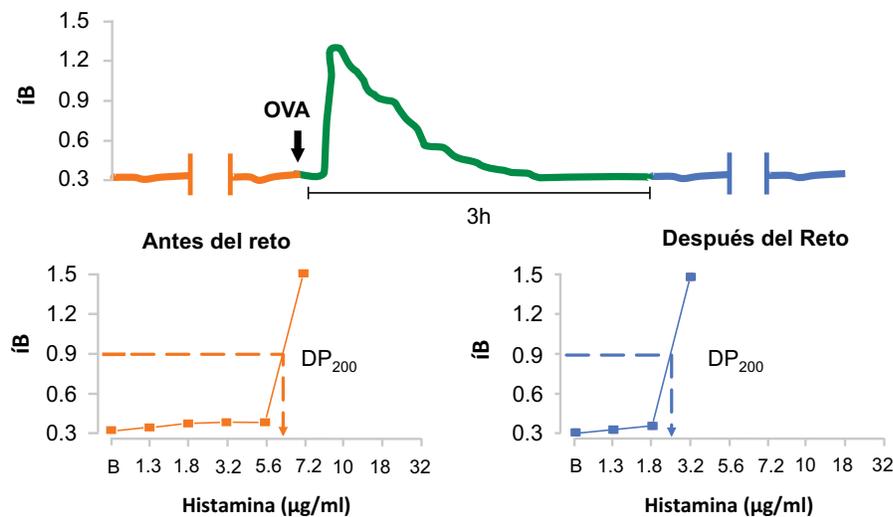
### Retos con el alérgeno.

El día 15 los cobayos sensibilizados recibieron el primer reto con OVA (1mg/ml SSF) siguiendo el protocolo de pletismografía del refuerzo antigénico. Los siguientes retos con OVA se administraron cada diez días en dosis de 0.5 mg/ml de SSF hasta completar grupos de cobayos con tres (modelo agudo) y doce (modelo crónico) retos con el alérgeno (Fig. 6). Los cobayos sin sensibilizar solo recibieron SSF durante los retos. Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado durante una hora.

### Reactividad de las vías aéreas.

La reactividad de las vías aéreas se evaluó en el día 35 (modelo agudo) y en el día 125 (modelo crónico) (Fig. 6) comparando curvas dosis-respuesta a histamina inhalada antes y después de la administración de OVA (Fig. 10). Inicialmente se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron durante un minuto dosis crecientes de histamina (0.013 - 3.2 mg/ml; Sigma). Para cada dosis se registró el íB durante 5 minutos y se

obtuvo el valor promedio. El intervalo entre cada dosis fue de 10 minutos. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una bronco-obstrucción que triplicara el íB basal (dosis provocativa 200, DP<sub>200</sub>). Posteriormente se esperó a que la bronco-obstrucción disminuyera a un íB aproximado al 50% del valor basal<sup>95</sup> y se retó durante un minuto con aerosoles de OVA a los cobayos de los grupos experimentales (0.5 mg/1ml SSF), mientras que los grupos sin sensibilizar solo recibieron aerosoles de SSF. La segunda curva a histamina se realizó tres horas después del reto con OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva<sup>97</sup> (Fig. 10). Para evaluar la reactividad de las vías aéreas se incluyeron dos grupos control sin sensibilizar (SS). El grupo control 1 recibió tres retos con SSF, mientras que el grupo control 2 recibió dos retos con SSF y en el tercer reto, cuando la reactividad de las vías aéreas fue evaluada, los cobayos recibieron OVA para demostrar que la hiperreactividad de las vías aéreas es una respuesta específica al reto con OVA.



**Figura 10. Curvas dosis-respuesta a histamina para evaluar la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el reto con OVA.** Dosis provocativa 200, DP<sub>200</sub>; íB, índice de bronco-obstrucción; OVA, ovoalbúmina.

### Obtención de LBA y homogenización del tejido pulmonar.

Los cobayos fueron sobredosificados con una inyección vía i.p. de pentobarbital sódico (28 mg/Kg) (Pfizer Toluca, México) para inducir paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se realizó una incisión a la altura del cuello y hasta el abdomen, se retiró la piel para exponer la caja torácica y localizar cuidadosamente la tráquea. Para

la obtención del LBA se realizó una incisión en la tráquea para introducir una cánula por donde se administraron 5 ml de SSF estéril mantenida a 37°C. La solución fue recuperada lentamente después de un minuto, este procedimiento se repitió y el fluido obtenido fue mezclado con el primero. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm y a una temperatura de 4°C en una centrifuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70°C en alícuotas de 2 ml que contenían inhibidor de proteasas (PMSF 0.2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina A 0.2 mM, todos adquiridos de Sigma) para su posterior análisis. El sedimento celular se utilizó para el conteo total y diferencial y para los análisis de citometría de flujo.

Para la obtención del homogenado pulmonar el lóbulo inferior derecho se depositó en una solución de lisis celular (2 ml por 100 mg de tejido; Tris 2 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y tritón al 1 %, todos adquiridos de Sigma) que contenía 5 µl de inhibidor de proteasas. El tejido fue disgregado mecánicamente empleando un homogenizador de velocidad variable (Polytron modelo PT 3100, Suiza). Las muestras fueron mantenidas en hielo durante el procedimiento, se midió el volumen total y se separó una alícuota para la determinación de proteínas totales utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad, EIA Drad Reagent, E.U.). El homogenizado se centrifugó durante 30 minutos para separar el sobrenadante y las muestras se almacenaron a -70°C hasta realizar la cuantificación de las citocinas. El LBA y el sobrenadante del homogenado pulmonar fueron utilizados para la detección de citocinas mediante ELISA de tipo directo.

### **Obtención de suero y detección de inmunoglobulinas específicas para OVA.**

Después de obtener el LBA se introdujo un sistema de extracción de sangre (S-Monovette, Sarstedt, Alemania) en el ventrículo derecho del cobayo. La sangre obtenida se agitó cuidadosamente por inversión un par de veces. Se obtuvieron aproximadamente 7 ml de sangre. Para obtener el suero, la sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C en una centrifuga (Heittich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania). El suero se almacenó en alícuotas a -70°C para cuantificar inmunoglobulinas mediante ensayo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA).

Para cuantificar los niveles de IgG1 e IgE específicas para OVA se sensibilizaron placas de 96 pozos (Costar, Portsmouth, NH, E.U.) con 100 µg/ml de OVA en una solución amortiguadora de carbonatos ( $\text{NaCO}_3$  0.015 M,  $\text{NaHCO}_3$  0.035 M, pH 9.6, todos adquiridos de Sigma) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se bloquearon los sitios no específicos con solución amortiguadora de sales y fosfatos (PBS) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  88 mM (J.T. Baker, Xalostoc, México) y NaCl 150 mM (Sigma); pH 7.2) que contenía 0.05% de Tween 20 (Sigma) (solución de lavado, PBS-T) y 1% de gelatina (Bio-Rad, EIA Drad Reagent, E.U.) (solución de trabajo, PBS-T 1% gelatina) durante tres horas con agitación constante y a temperatura ambiente. Las muestras de suero fueron diluidas 1:20 en la solución de trabajo y se dejaron incubando a 37°C durante una hora en agitación constante. Al término de la incubación se agregó a cada pozo 100 µl de la dilución de un anticuerpo hecho en conejo específico para IgG1 de cobayo conjugado con biotina (1:2000; ICN Biomedicals, Inc) o de un anticuerpo hecho en cabra específico para IgE de humano conjugado con peroxidasa de rábano (1:10000; Sigma) y se incubaron a 37°C durante una hora. Para la detección de la IgG1 específica se utilizó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Sigma) que se incubó a 37°C durante 30 min. Finalmente, se efectuó la reacción enzimática utilizando una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.01 M (J.T. Baker, México) que contenía 1 mg/ml de ortofenildiamino-benzidina (Sigma) y 0.2% de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Merck KGaA, Alemania). Para detener la reacción se agregaron 50 µl de ácido sulfúrico 2 N ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Fermont, Productos químicos Monterrey, México). Entre cada incubación las placas fueron lavadas seis veces con 200 µl de la solución de lavado. La absorbancia fue determinada utilizando un lector colorimétrico automatizado (LabSystems, modelo Multiskan, E.U.) a una longitud de onda de 492 nm. El suero de los cobayos sin sensibilizar se utilizó como control negativo.

### **Cuantificación de los niveles de histamina, tromboxano $A_2$ y cisteinyl leucotrienos.**

Tres grupos adicionales de cobayos (SS n=6; R n=5 y NR n=7) (Fig. 7) fueron expuestos a OVA o SSF para cuantificar los niveles de algunos mediadores químicos inflamatorios (histamina, tromboxano  $A_2$  y cisteinil leucotrienos). En estos cobayos no se evaluó la reactividad de las vías aéreas para evitar la interferencia de histamina exógena sobre la cuantificación de este metabolito.

## **Cuantificación de histamina.**

Las muestras fueron preparadas de acuerdo al método descrito por la casa comercial (Bertin Pharma, Francia). Después de coleccionar el LBA, la histamina se extrajo utilizando ácido perclórico 0.1 M (J.T. Baker, México) y las muestras fueron neutralizadas con hidróxido de sodio 1 M (NaOH) (J.T. Baker, México). El inmunoensayo enzimático está basado en la competencia entre la histamina y el conjugado acetilcolinesterasa-histamina por un anticuerpo específico para el metabolito.

Las muestras de LBA se colocaron en un volumen de 200  $\mu$ l en tubos de polipropileno y se añadieron 50  $\mu$ l de la solución de derivatización, este proceso incrementa la afinidad de la histamina por el anticuerpo y por lo tanto, incrementa la sensibilidad del ensayo. Posteriormente 100  $\mu$ l de las muestras se colocaron en los pozos de la placa de ensayo premarcadas con el anticuerpo específico para histamina y se incubaron durante 24 h a 4 °C. Los pozos fueron lavados cinco veces con 300  $\mu$ l de la solución de lavado y se añadieron a cada pozo 200  $\mu$ l del reactivo de Ellman, el sustrato enzimático de la acetilcolinesterasa y cromógeno. La placa se incubó durante dos horas en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. La intensidad del color fue determinada en un lector colorimétrico automatizado (LabSystems, modelo Multiskan, E.U.) a una absorbancia de 405 nm. Para la curva estándar se colocaron 100  $\mu$ l de las diluciones que contenían 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 y 0.39 nM/ml de histamina y se incluyeron pozos control que contenían únicamente el diluyente de la curva estándar. Cada muestra se analizó por duplicado y la intensidad del color fue proporcional a la cantidad del conjugado acetilcolinesterasa-histamina unido a la placa e inversamente proporcional a la cantidad de histamina libre en cada pozo.

## **Cuantificación de tromboxano A<sub>2</sub>.**

El tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) es un metabolito que se hidroliza rápidamente para formar tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) por ello, cuantificamos TXB<sub>2</sub> como un indicador de TXA<sub>2</sub>. Las muestras de LBA fueron tratadas de acuerdo al procedimiento descrito por el paquete comercial para el inmunoensayo enzimático (EIA, Cayman Chemical Company, E.U.). El ensayo está basado en la competencia entre el TXB<sub>2</sub> y el conjugado acetilcolinesterasa-TXB<sub>2</sub> por un antisuero de conejo específico para el TXB<sub>2</sub>. Debido a que la concentración del conjugado es constante y la concentración del TXB<sub>2</sub> es variable, la cantidad del conjugado que se une al antisuero es inversamente

proporcional a la concentración de TXB<sub>2</sub>. El complejo antisuero-TXB<sub>2</sub> se une a un anticuerpo monoclonal anti-conejo unido previamente a los pozos. La placa se lava para remover los reactivos no unidos y con el reactivo de Ellman, que contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa, se desarrolla la reacción enzimática. La intensidad del color es proporcional a la cantidad del complejo acetilcolinesterasa-TXB<sub>2</sub> unido al pozo e inversamente proporcional a la cantidad de TXB<sub>2</sub> libre.

En cada pozo se colocaron 50 µl de las muestras de LBA, 50 µl del conjugado acetilcolinesterasa-TXB<sub>2</sub> y 50 µl del antisuero. La placa se incubó durante 18 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavó cinco veces con 300 µl de la solución de lavado. Finalmente, se añadieron a cada pozo 200 µl del reactivo de Ellman y la placa se incubó durante una hora en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. La intensidad del color fue determinada en un lector colorimétrico automatizado a una absorbancia de 405 nm. Para la curva estándar se colocaron 100 µl de las diluciones que contenían 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 y 7.8 pg/ml de TXB<sub>2</sub> y se incluyeron pozos control que contenían únicamente el diluyente de la curva estándar.

### **Cuantificación de cisteinyl leucotrienos.**

Las muestras de LBA fueron tratadas de acuerdo al procedimiento descrito por el paquete comercial (Cayman Chemical Company, E.U.). Este ensayo se basa en la competencia entre cisteinil leucotrienos (CysLTs) y el conjugado acetilcolinesterasa-CysLTs por un anticuerpo monoclonal específico para CysLTs de manera similar que en la cuantificación de TXB<sub>2</sub>.

En cada pozo se colocaron 50 µl de las muestras de LBA, 50 µl del conjugado acetilcolinesterasa-CysLTs y 50 µl del anticuerpo monoclonal. La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, la placa se lavó cinco veces con 300 µl/pozo de la solución de lavado. Finalmente, se añadieron a cada pozo 200 µl del reactivo de Ellman y la placa se incubó durante una hora en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. La intensidad del color fue determinada en un lector colorimétrico automatizado a una absorbancia de 405 nm. Para la curva estándar se colocaron 100 µl de las diluciones que contenían 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 y 7.8 pg/ml de CysLTs y se incluyeron pozos control que contenían únicamente el diluyente de la curva estándar.

## **Estudio en órganos aislados.**

Las tráqueas de cobayos SS, R y NR fueron removidas y colocadas en una caja de Petri con solución Ringer Krebs (118 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 mM de KCl, 1.2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM de MgSO<sub>4</sub> y 11 mM de glucosa, todos adquiridos de Sigma) a temperatura ambiente. El tejido conjuntivo fue removido cuidadosamente y se obtuvo un anillo traqueal de longitud aproximada de 5 mm utilizando un microscopio estereoscópico (Kart Zeisz, Alemania). El anillo traqueal fue suspendido en una cámara de órganos aislados que contenía 5 ml de solución Ringer Krebs. A esta solución se le administró 1 µM de indometacina (Sigma) para evitar la síntesis de prostaglandinas endógenas. Adicionalmente, la solución fue continuamente burbujeada con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Posteriormente, las tráqueas se mantuvieron en equilibrio por un periodo de una hora a una tensión de 1 g. La tensión fue registrada con un transductor de tensión isométrica (Grass FT03, Grass Instruments, CA, E.U.). Para obtener los datos y registros de la contracción del músculo liso traqueal se utilizó el software de Axon Instruments, Inc. (Foster City, CA). Cada anillo traqueal fue estimulado con KCl 60 mM (Sigma) tres veces hasta obtener una respuesta máxima estable y establecer la viabilidad del tejido. Posteriormente se administró 3.74 µg/ml de OVA durante 20 minutos y se lavó la OVA. Finalmente, las tráqueas fueron estimuladas con histamina (10 µM) (Sigma); U46619 (10 nM) (Tocris, Bristol, UK), un mimético estable del tromboxano A<sub>2</sub>, y leucotrieno D<sub>4</sub> (1 µM) (Sigma). Cada fármaco se administró durante 20 minutos y los tejidos fueron lavados con solución Ringer Krebs entre cada estímulo.

## **Histología convencional y análisis morfométrico automatizado.**

Una vez que el suero fue obtenido se disecó el lóbulo inferior izquierdo del pulmón y se profundió con paraformaldehído al 4% (Electrón Microscopy Sciences, E.U.) para posteriormente incluir secciones sagitales del tejido en parafina. Algunas secciones de 4 µm de grosor se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson en el laboratorio de Patología del INER. La tinción tricrómica de Masson se utiliza para diferenciar las fibras de colágena del tejido muscular. Todas las secciones teñidas fueron examinadas y medidas utilizando un microscopio de luz con analizador de imágenes (Leica Microsystems, Cambridge, U.K.). Las muestras se codificaron y las regiones a medir se eligieron al azar. El área de la mucosa subepitelial de 6 bronquios y 6 bronquiolos fueron determinadas en micras cuadradas usando morfometría automatizada (Leica Qwin Image Analyzer, Leica Microsystems, Cambridge, U.K.). Los bronquios y

bronquiolos fueron identificados por la presencia o ausencia de cartílago en la pared de las vías aéreas, respectivamente.

### **Conteo celular total y diferencial.**

El sedimento celular obtenido en el LBA se resuspendió con 1 ml de SSF. El número total de células se estableció tomando 10  $\mu$ l de la suspensión celular que se colocaron en 40  $\mu$ l de azul de Tripán al 0.4% (Sigma). La muestra se depositó en una cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución y por el factor de la cámara (10,000) expresado como el número de células por mililitro de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener  $1 \times 10^6$  células/ml adicionando SSF y de esta solución se tomaron 50  $\mu$ l que se centrifugaron a 850 rpm durante 5 minutos para obtener un botón celular que fue teñido con la técnica de Romanowsky para realizar conteo diferencial. Esta tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology Reagent ABC, E.U.) mediante la que se tiñen los núcleos y gránulos de neutrófilos en púrpura, gránulos de eosinófilos en rosa-naranja y eritrocitos en rosa. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz (Olympus, Provis AX-70, Japón) en un aumento 100X.

### **Detección de citocinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.**

Las placas de 96 pozos (Costar, Portsmouth, NH, E.U.) fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con 100  $\mu$ l de LBA sin diluir o 100  $\mu$ l de sobrenadante del homogenado pulmonar diluido 1:10 en solución amortiguadora de carbonatos. El volumen de las placas fue decantado y los pozos fueron lavados con la solución de lavado (PBS-Tween 0.05%). Los sitios inespecíficos fueron bloqueados durante 3 horas a 37°C con la solución de trabajo que contenía 1% de albúmina bovina fracción V (Sigma) en PBS-Tween. Posteriormente se colocaron 100  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo de detección para cada citocina. IFN- $\gamma$ , IL-4; IL-17A, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  (R&D, Systems Inc. Mineapolis, E.U.), IL-5, IL-10 (BD, Bioscences, San Diego CA, E.U.). Se utilizó un anticuerpo secundario (anti-IgG1 de cabra acoplado a peroxidasa, Sigma; anti-IgG2a de rata acoplado a peroxidasa, Thermo Scientific) o un complejo estreptavidina-peroxidasa (Sigma) según el anticuerpo primario. Finalmente se agregó una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.01 M que contenía 1 mg/ml de ortofenildiaminobencilina y 0.2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo con 50  $\mu$ l por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Entre cada incubación las placas fueron lavadas seis veces con 200  $\mu$ l de PBS-

Tween. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector colorimétrico automatizado. Cada muestra se analizó por duplicado y se realizaron tres experimentos independientes para cada citocina. Para la cuantificación de TGF- $\beta$ 1 las muestras fueron activadas con ácido clorhídrico 20 mM (HCl) (Fermont, Productos químicos Monterrey, México) y neutralizadas con NaOH 1.2 N - HEPES 0.5 M<sup>98</sup>. Las lecturas obtenidas corresponden a los niveles totales de TGF- $\beta$ 1 bioactivo. La concentración de cada citocina fue calculada a partir de la interpolación de la absorbancia de curvas estándar con las citocinas recombinantes.

### **Tinción de marcadores de superficie y citocinas intracelulares.**

Para la tinción de citocinas intracelulares se utilizó un protocolo de permeabilización celular con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Las células obtenidas del LBA se lavaron con una solución de lavado que contenía PBS, 2% suero fetal bovino (Gibco, E.U.) y 0.02% de azida de sodio (Spectrum Quality, Inc, E.U.). El volumen se ajustó a  $1 \times 10^6$  células/ml y las células fueron estimuladas durante cuatro horas a 37 °C en 1 ml de medio RPMI suplementado (Gibco, E.U.), brefeldina A (5  $\mu$ g/ml; Sigma), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 10 ng/ml; Sigma) y ionomicina (1  $\mu$ g/ml; Sigma). Al término de la incubación las células se lavaron y se colocaron en placas de 96 pozos de fondo cóncavo. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, se bloquearon los receptores Fc utilizando suero de cobayo al 10% en solución de lavado durante 30 minutos a 4 °C. Para la tinción de membrana las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD4 (CT7) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec, E.A.), anti-PAN T (CT5) conjugado con alofocianina (APC) (AbD Serotec) y anti-CD25 APC (BD Biosciences) durante 30 minutos, a 4 °C y en oscuridad. A continuación las células fueron lavadas dos veces, fijadas y permeabilizadas con la solución comercial de fijación/permeabilización (BD Biosciences, E.U.) durante 20 minutos, a 4 °C y en oscuridad. Las células permeabilizadas fueron incubadas con anticuerpos para IFN- $\gamma$  APC (BD Biosciences), IL-13 APC (BioLegend, E.A.), IL-17A conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences), IL-10 PE (BD Biosciences) y TGF- $\beta$ 1 PE (R&D Systems) durante 30 minutos, a 4 °C y en oscuridad. Después de lavar, las células fueron fijadas con 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 1%.

### **Tinción para FoxP3.**

La tinción del factor de transcripción Foxp3 se realizó utilizando el protocolo recomendado por el proveedor (eBioscience, E.U.). Una vez que se realizó la tinción

con los marcadores de superficie (CD4, PAN T y CD25), las células se se fijaron y permeabilizaron con la solución comercial Fix/Perm (Treg Staining Kit, eBioscience, E.U.) durante tres horas a 4 °C y se lavaron con medio de permeabilización (Perm Buffer, eBioscience, E.U.). Finalmente se añadió el anticuerpo anti-Foxp3 conjugado a PE-Cy5 (eBioscience, E.U.) durante 30 minutos a 4 °C en medio de permeabilización.

### **Citometría de flujo.**

Las muestras fueron capturadas mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando el programa CellQuestPro versión 5.1.1 (BD Biosciences). Para el análisis de las células T reguladoras se adquirieron 10 000 células por cada muestra de la región CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, para el análisis de las citocinas intracelulares se adquirieron 10 000 células de la población total. El análisis de datos se realizó con el programa FlowJo (versión 8.7). La población linfocida fue seleccionada a partir del tamaño y granularidad celular y de los marcadores específicos para linfocitos T, PAN T y CD4. Los linfocitos presentan un tamaño y granularidad baja en comparación con otras poblaciones celulares que se encuentran en el LBA, como macrófagos y granulocitos. Los porcentajes obtenidos se relacionaron con el número de células totales infiltradas en el LBA y los datos se reportaron como número de células por mililitro de LBA.

### **Extracción de ARN de tejido pulmonar.**

La extracción de ARN se realizó mediante un sistema comercial basado en columna (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Maryland, E.U.). Los tejidos congelados fueron macerados en condiciones de esterilidad y con material libre de ARNsas. Treinta miligramos de tejido pulmonar fueron homogenizados en 350 µl de la solución comercial RLT (Qiagen) que contiene tiocianato de guanidinio y se adicionaron 350 µl de etanol al 70%. La mezcla se colocó en una columna y se centrifugó durante cinco minutos a 4 °C, se eliminó el líquido en el tubo colector y se agregaron 700 µl de la solución comercial RW1 (Qiagen) que contiene etanol. Posteriormente se centrifugó durante cinco minutos a 4 °C y se eliminó el líquido del tubo colector, se adicionaron 500 µl de la solución comercial RPE (Qiagen) que contiene hidrocloreuro de guanidinio, se centrifugó durante cinco minutos a 4 °C y la columna se transfirió a un tubo colector nuevo. Se adicionaron 50 µl de agua libre de ARNsas en la columna y se centrifugó durante cinco minutos a 4 °C. En el tubo de recolección se obtuvo el ARN. La cantidad de ARN fue evaluada por medio de espectrofotometría (260/280 nm) y la integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa.

## **Tratamiento con ADNsa I.**

El ARN fue tratado para eliminar los restos de ADN utilizando desoxirribonucleasa I (Invitrogen). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenía tris (hidroximetil) aminometano - ácido clorhídrico (Tris-HCl) 200 mM (BioRad, E.U.), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 20 mM (Merck, México) y cloruro de potasio (KCl) 500 mM (Sigma); 1U de ADNsa I y agua libre de ARNsas por cada microgramo de ARN en las muestras. Después de la incubación se inactivó la ADNsa I con 1  $\mu$ l de EDTA (Sigma) a 65 °C.

## **Síntesis de ADN complementario.**

Para obtener el ADN complementario (ADNc) se utilizó un sistema comercial y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Omniscript Reverse Transcriptase; Qiagen) A cada mezcla de reacción se agregaron 5  $\mu$ g de ARN, Oligo dT (500  $\mu$ g/ml; Promega, E.U.), dinucleótidos trifosfato (5 mM; Qiagen) y agua libre de ARNsas, la mezcla se calentó a 65 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las cadenas de ARN y se llevaron a hielo. Posteriormente se adicionaron 4  $\mu$ l del amortiguador para la enzima 10X (Qiagen) y se incubó durante 2 minutos a 37 °C. Se agregó la enzima reverso transcriptasa (4 U/ $\mu$ l; Qiagen) y se incubó durante 50 minutos a 37 °C. Al término de la incubación se inactivó la reacción calentando a 70 °C durante 15 minutos.

## **Diseño de los oligonucleótidos.**

Se accedió a la secuencia de ARN mensajero (ARNm) y regiones de los exones de las citocinas IL-13, IL-17A, IL-10, TGF- $\beta$ 1 de cobayo en [www.ensembl.com](http://www.ensembl.com) y se utilizó el programa Primer Express (Applied Biosystems, E.U.) para diseñar los oligonucleótidos sentido y antisentido. Los oligonucleótidos (Tabla 2) fueron seleccionados bajo las siguientes condiciones: longitud entre 19 y 25 nucleótidos, contenido de G - C 40 a 60%, valor de  $T_m$  = 60 °C y evitando complementariedad de 2 o 3 bases en el extremo 3' de los pares de oligonucleótidos para reducir la formación de dímeros.

## **RT-PCR en tiempo real.**

Para cuantificar la expresión del ARNm de las citocinas y del factor de transcripción Foxp3 se utilizó 1  $\mu$ g de ADNc por muestra y el reportero SYBR Green (RealQ PCR Master Mix kit; Ampliqon, Dinamarca). Se utilizó un termociclador ABI Prism 7000

(Applied Biosystems, E.U.) y para la reacción se utilizaron placas con cubiertas ópticas (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos específicos para cada citocina se mencionan en la tabla 2. Como control negativo se utilizó la mezcla de amplificación sustituyendo la muestra por agua libre de RNAsas y cada muestra se analizó por duplicado. El contenido de ADNc se normalizó sustrayendo el número de copias del gen endógeno HPRT del número de copias del gen de interés ( $\Delta Ct = Ct$  del gen de interés -  $Ct$  del gen HPRT). La expresión de cada gen se calculó utilizando la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ .

**Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar las proteínas de interés**

	Sentido	Antisentido
<b>HPRT</b>	AGGACTGAAAGGCTTGCTCG	ACAATGTGATGGCCTCCCA
<b>IL-13</b>	GGATCAGAAGAACCCGCTCT	AGGTTACAGCTCCACACCAT
<b>IL-17A</b>	TCAATGTTCCGATCATTGCTG	CCTGCCTTCACTGTAGCCATC
<b>IL-10</b>	CGGTGGAGCAGGTGAAAAATA	AGACGCCTTTCTCTTGGAGCT
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	ATGGTGGACAACAGCCACAAT	TGTGTGCGACAGTCTCAATGC
<b>Foxp3</b>	CTTTTCCTTCAAGGCCCGA	CTGGCCACGTTGATTCCAG

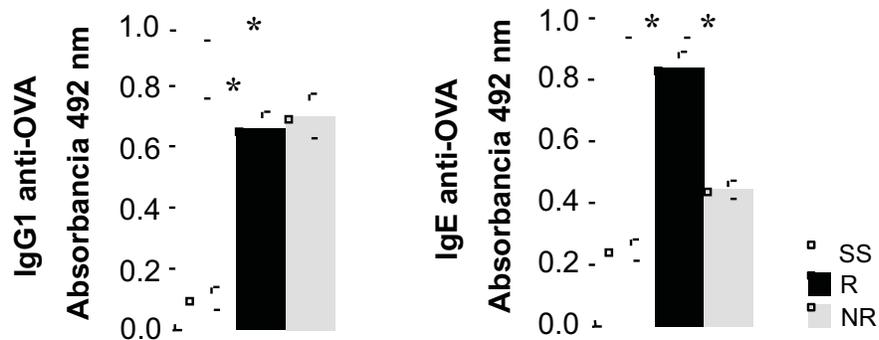
### **Análisis estadístico.**

La reactividad de las vías aéreas a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% ( $DP_{200}$ ), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el  $\dot{V}_B$  basal. Todos los valores fueron calculados con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versión 5.0a). Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si tenían una distribución normal. Los valores descriptivos de las variables fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Las comparaciones entre los grupos basal, SS, R y NR se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA), de una y dos vías, seguida por las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o Bonferroni, respectivamente. Las comparaciones entre grupos inmediatos y 24 horas, así como entre el modelo agudo y el modelo crónico se evaluaron con una prueba no pareada de t de Student. En todos los casos las significancias se establecieron con una  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 La administración de OVA induce el incremento de IgG1-específica pero no de IgE-específica en cobayos no respondedores al alérgeno.

Ha sido bien establecido que los cobayos producen anticuerpos homocitotrópicos de la clase IgG1 e IgE durante las reacciones alérgicas<sup>99</sup>. Para determinar si los cobayos se encontraban sensibilizados a la OVA, cuantificamos los niveles de IgG1 e IgE en suero mediante ELISA. Los niveles de IgG1 específica para OVA fueron similares en los cobayos de los grupos respondedor (R) y no respondedor (NR) y significativamente mayores al grupo sin sensibilizar (SS) ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ; Fig. 11). Los niveles de IgE específica para OVA fueron mayores en los cobayos del grupo R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ; Fig. 11).

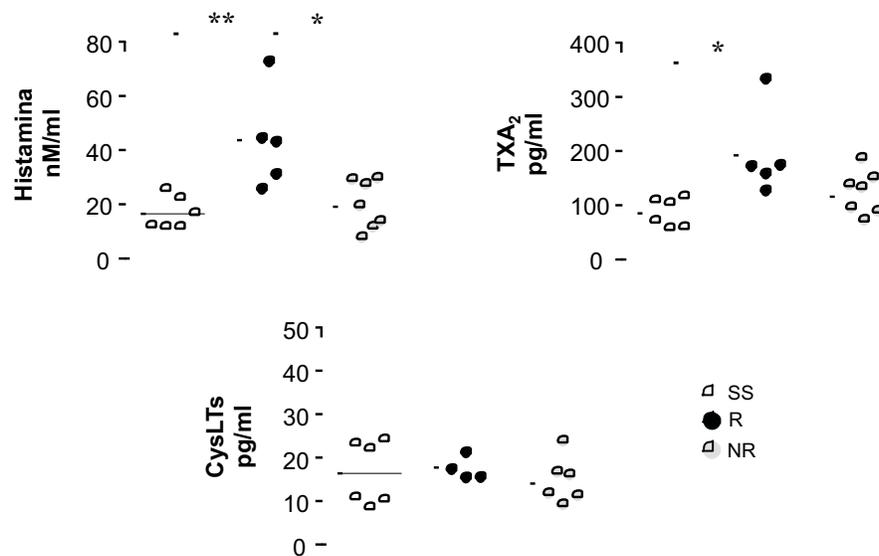


**Figura 11. Niveles de IgG1 e IgE específicos para OVA en suero de cobayos.** Los símbolos corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de la concentración de IgG1 e IgE específicas para OVA expresadas como la absorbancia a 492 nm en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR),  $n = 6$  cobayos por cada grupo;  $*p < 0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### 7.2 Los cobayos no respondedores al alérgeno no secretan histamina y tromboxano A<sub>2</sub>, pero si son capaces de responder a estos mediadores *in vitro*.

La bronco-constricción durante el asma esta mediada por la liberación de histamina y metabolitos derivados del ácido araquidónico, como prostaglandinas, tromboxanos y cisteinil leucotrienos, después de la activación de células cebadas y basófilos

dependiente de IgE e IgG1<sup>100</sup>. Para determinar si estos productos celulares se están secretando durante la respuesta alérgica en los cobayos expuestos a OVA, cuantificamos los niveles de histamina, tromboxano A<sub>2</sub> (medido como tromboxano B<sub>2</sub>) y cisteinil leucotrienos en el LBA. Los niveles de histamina, tromboxano B<sub>2</sub> y cisteinil leucotrienos no fueron diferentes entre los cobayos del grupo SS y el grupo NR. Los niveles de histamina fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con el grupo SS y el grupo NR ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente; Fig. 12). Los niveles de tromboxano A<sub>2</sub> fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con el grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 12). Los niveles de cisteinil leucotrienos no fueron diferentes entre los grupos.



**Figura 12. Niveles de histamina, tromboxano B<sub>2</sub> y cisteinil leucotrienos en LBA de cobayos expuestos a OVA.** Los símbolos representan la concentración de histamina, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y cisteinil leucotrienos (CysLTs) por cada cobayo y las barras corresponden a las medias de la concentración por cada grupo. Cada muestra se analizó por duplicado y los resultados se expresaron en nanomolar por mililitro (nM/ml) para histamina y en picogramos por mililitro (pg/ml) para TXA<sub>2</sub> y CysLTs a partir de curvas patrón. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ . SS, *sin sensibilizar*; R, *respondedor*; NR, *no respondedor*.

Para determinar si la ausencia de respuesta bronco-obstructiva en los cobayos NR al reto con OVA se debe a que no hay liberación de mediadores que estimulen la contracción del músculo liso de las vías aéreas o a que el músculo liso no es funcional, las tráqueas de los cobayos fueron expuestas *in vitro* a OVA, histamina, U46619 (un

mimético estable del tromboxano A<sub>2</sub>) y leucotrieno D<sub>4</sub>. La OVA indujo la contracción de las tráqueas de los cobayos R y NR. Sin embargo, las tráqueas de los cobayos NR tuvieron una respuesta significativamente mas pequeña que los cobayos del grupo R (p<0.05; Tabla 3). La administración de histamina, U46619 y leucotrieno D<sub>4</sub> indujo una contracción similar en las tráqueas de todos los grupos de cobayos (Tabla 3).

**Tabla 3. Respuesta máxima *in vitro* (g) a OVA, histamina, U46619 y leucotrieno D<sub>4</sub> en tráqueas de cobayos.**

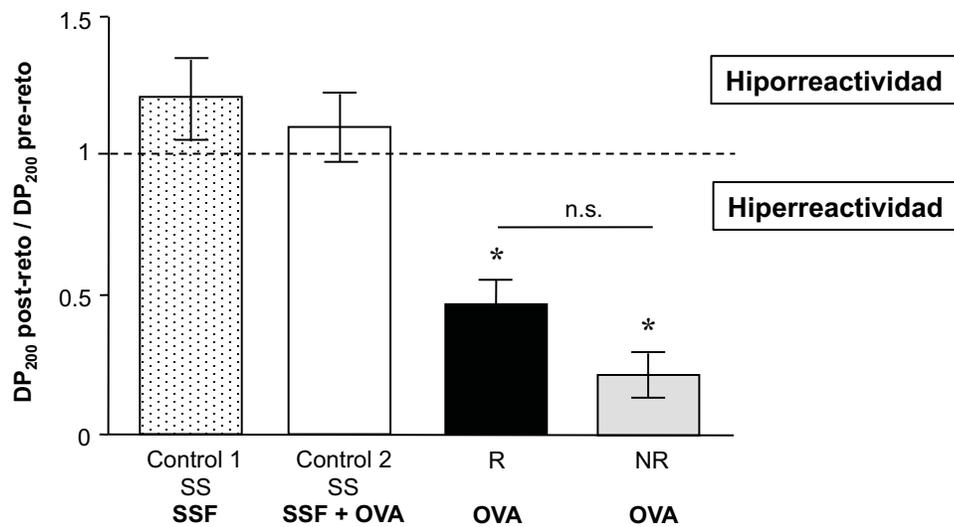
	<b>OVA (3.74 µg/ml)</b>	<b>Histamina (10 µM)</b>	<b>U46619 (10 nM)</b>	<b>LTD<sub>4</sub> (1 µM)</b>
<b>Sin sensibilizar</b>	0.12 ± 0.04 (n = 7)	1.1 ± 0.4 (n = 7)	1.06 ± 0.19 (n = 6)	0.56 ± 0.08 (n = 6)
<b>Respondedor</b>	1.6 ± 0.4 <sup>§</sup> (n = 10)	1.9 ± 0.5 (n = 10)	0.98 ± 0.05 (n = 3)	0.53 ± 0.05 (n = 6)
<b>No respondedor</b>	0.15 ± 0.08 (n = 7)	1.4 ± 0.6 (n = 7)	1.34 ± 0.28 (n = 6)	0.56 ± 0.07 (n = 6)

<sup>§</sup>p<0.05, prueba no pareada de t de Student

### 7.3 La hiperreactividad de las vías aéreas puede ocurrir en cobayos no respondedores al alérgeno.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se ha descrito que los cobayos R desarrollan hiperreactividad a la histamina<sup>84, 85</sup>. Para determinar si existían diferencias en la función pulmonar entre los cobayos R y NR al alérgeno, evaluamos la reactividad de las vías aéreas a histamina inhalada en el tercer reto con OVA. Se compararon curvas dosis-respuesta a histamina antes y después del reto. Las curvas fueron terminadas una vez que los cobayos alcanzaron la dosis provocativa 200 (DP<sub>200</sub>) es decir aquella dosis que triplicó el valor basal del índice de bronco-obstrucción (iB). El cociente DP<sub>200</sub> post-reto/DP<sub>200</sub> pre-reto representa el grado de reactividad de las vías aéreas. Valores menores a uno indican que la DP<sub>200</sub> post-reto fue menor a la DP<sub>200</sub> pre-reto, lo que representa un incremento en la reactividad de las vías aéreas o hiperreactividad. Valores mayores a uno indican que la DP<sub>200</sub> post-reto fue mayor a la DP<sub>200</sub> pre-reto, lo que representa una disminución en la reactividad de las vías aéreas o hiporreactividad. En el estudio se incluyeron dos grupos control SS.

Al grupo control 1 únicamente se le administró SSF, mientras que al grupo control 2 se le administró SSF y en el tercer reto se le administró OVA para demostrar que la hiperreactividad de las vías aéreas es una respuesta específica a la sensibilización con OVA. El cociente de la  $DP_{200}$  post-reto/ $DP_{200}$  pre-reto fue menor a uno en los grupos R y NR, mientras que en los grupos control SS fue mayor a uno, indicando que los cobayos R y NR son hiperreactores (Fig. 13). El incremento en la reactividad de las vías aéreas fue estadísticamente significativo en los grupos R y NR en comparación con los grupos control SS ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ; Fig. 13). No hubo diferencia significativa en la reactividad de las vías aéreas entre los grupos R y NR (Fig. 13).



**Figura 13. Reactividad de las vías aéreas a histamina antes y después del reto con OVA en cobayos sensibilizados.** La gráfica muestra el cociente de la dosis provocativa 200 ( $DP_{200}$ ) de cobayos respondedores (R), no respondedores (NR) y grupos control. Los grupos control corresponden a cobayos sin sensibilizar (SS). Los cobayos del grupo control 1 fueron retados únicamente con SSF y los cobayos del grupo control 2 fueron retados con OVA en el día 35. La línea discontinua en el centro de la gráfica señala el límite entre hiporreactividad (valores mayores a 1) e hiperreactividad (valores menores a 1). Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n = 6$  cobayos en cada grupo; \* $p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *n.s.*, *no significativo*.

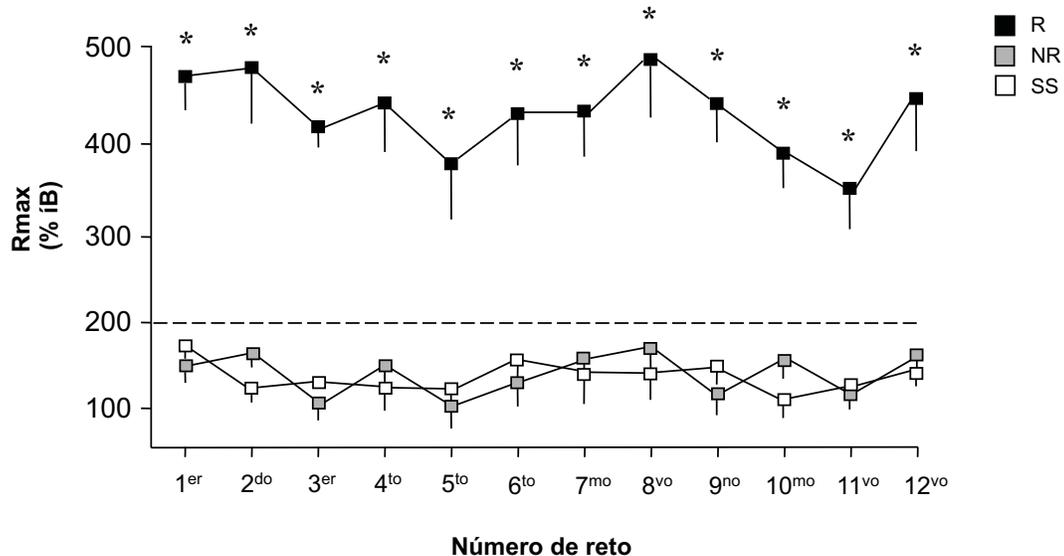
#### 7.4 Modelo de asma crónica en cobayo.

Para evaluar la respuesta bronco-obstruccion, la función pulmonar y los cambios en la estructura de las vías aéreas inducidos por el reto crónico con el alérgeno, los cobayos fueron expuestos a doce retos con OVA. En cada reto se cuantificó la respuesta

bronco-obstruccion inducida por OVA y en el doceavo reto se evaluó la reactividad a histamina y los cambios histológicos en las vías aéreas.

#### 7.4.1 La exposición crónica a OVA induce dos patrones de respuesta bronco-obstruccion.

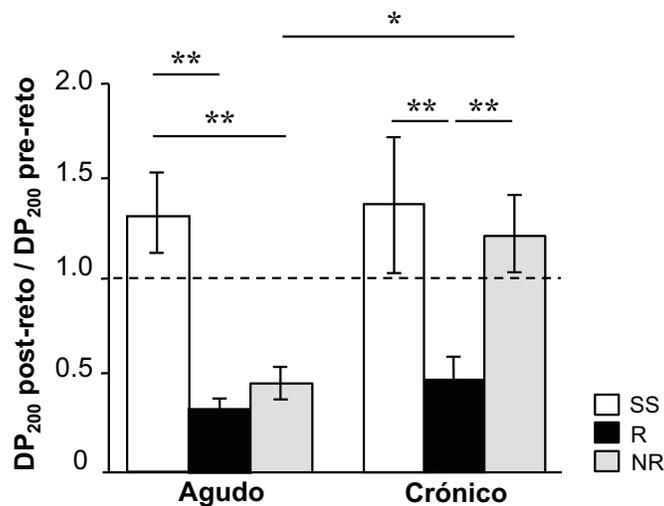
Los valores máximos (Rmax) del índice de bronco-obstruccion (iB) observados en el primer reto con OVA (día 15) fueron similares a los observados en el segundo y hasta el doceavo reto (día 25 hasta día 125; Fig. 14). La Rmax en cada reto fue significativamente mayor en los cobayos del grupo R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.01$ ; Fig. 14). La Rmax fue similar en los grupos SS y NR a lo largo de los retos (Fig. 14).



**Figura 14. Respuesta bronco-obstruccion máxima inducida por el reto con OVA en cobayos sensibilizados.** Los valores fueron obtenidos en cada grupo como la media del índice de bronco-obstruccion (iB) máximo (Rmax) registrado durante la primera hora después del reto con OVA. Los cuadros negros corresponden a cobayos que tuvieron respuestas  $\geq 200\%$  del iB basal (Respondedores, R). Los cuadros grises corresponden a cobayos con respuestas  $< 200\%$  del iB basal (No Respondedores, NR). Los cuadros blancos corresponden a cobayos sin sensibilizar (SS) que únicamente recibieron solución salina fisiológica (SSF) durante los retos. Los símbolos representan las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=8$  cobayos por cada grupo;  $*p < 0.01$ , ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 7.4.2 Los cobayos no respondedores al reto crónico con OVA no desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas.

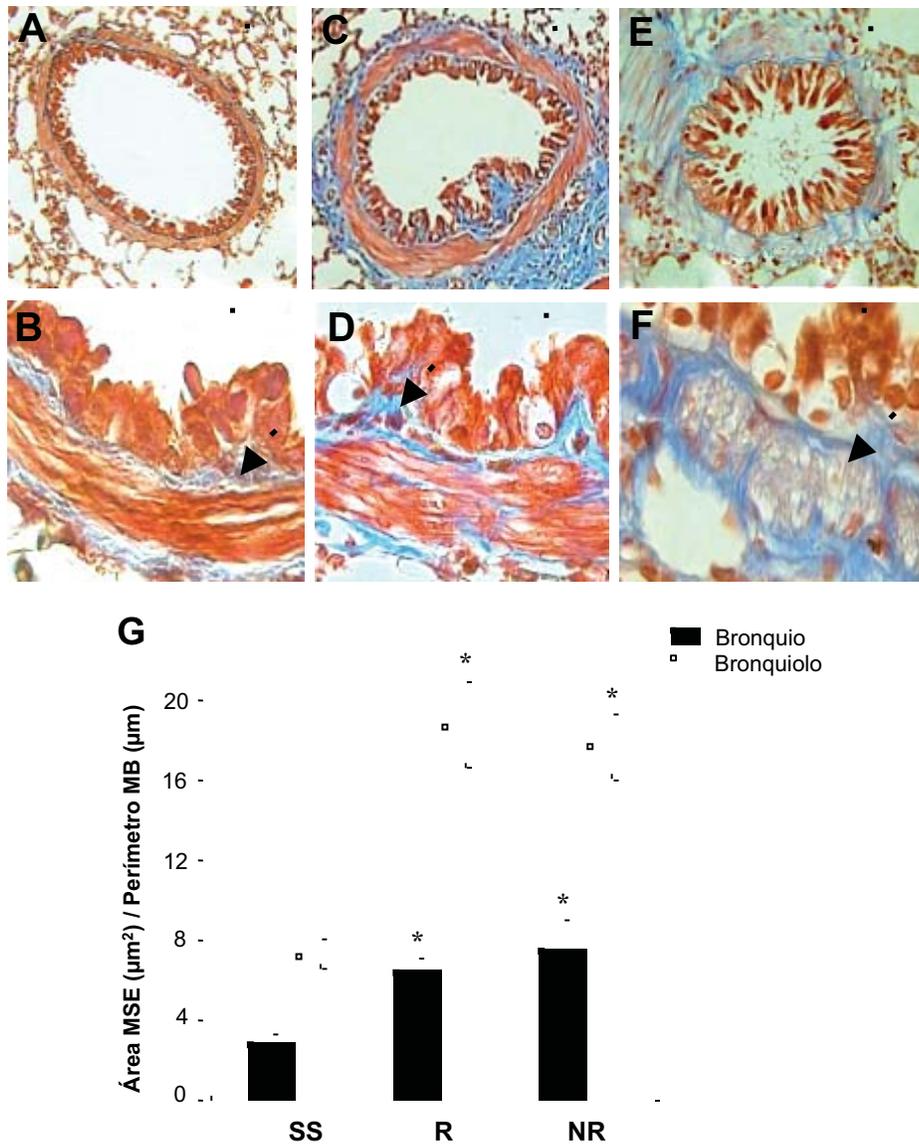
Para determinar si había diferencias en la función pulmonar entre los grupos de cobayos del modelo agudo y del modelo crónico, evaluamos la reactividad de las vías aéreas en el tercer (día 35) y doceavo (día 125) retos con OVA comparando curvas dosis-respuesta a histamina antes y después del reto con OVA. En los grupos SS del modelo agudo (día 35) y del modelo crónico (día 125) la  $DP_{200}$  pre-reto de histamina no fue diferente de la  $DP_{200}$  post-reto. En los grupos R y NR del modelo agudo (día 35) se observó una disminución significativa del cociente de la  $DP_{200}$  en comparación con el grupo SS ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ; Fig. 15), lo que indica que los cobayos R y NR del modelo agudo son hiperreactores. En el modelo crónico (día 125) el cociente de la  $DP_{200}$  fue significativamente menor en el grupo R en comparación con el grupo SS ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ; Fig. 15), mientras que en el grupo NR el cociente de la  $DP_{200}$  no fue diferente del grupo SS (Fig. 15), lo que implica una reducción en la reactividad de las vías aéreas en los cobayos del grupo NR del modelo crónico en comparación con el grupo NR del modelo agudo ( $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ; Fig. 15).



**Figura 15. Reactividad de las vías aéreas a histamina en cobayos del modelo agudo y del modelo crónico.** La gráfica muestra el cociente de la dosis provocativa 200 ( $DP_{200}$ ) de cobayos respondedores (R), no respondedores (NR) y sin sensibilizar (SS). La línea discontinua en el centro de la gráfica señala el límite entre hiporreactividad (valores mayores a 1) e hiperreactividad (valores menores a 1). Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n = 8$  cobayos en cada grupo; \* $p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### **7.4.3 La fibrosis de las vías aéreas puede ocurrir en ausencia de respuesta bronco-obstructiva en cobayos expuestos de manera crónica a OVA.**

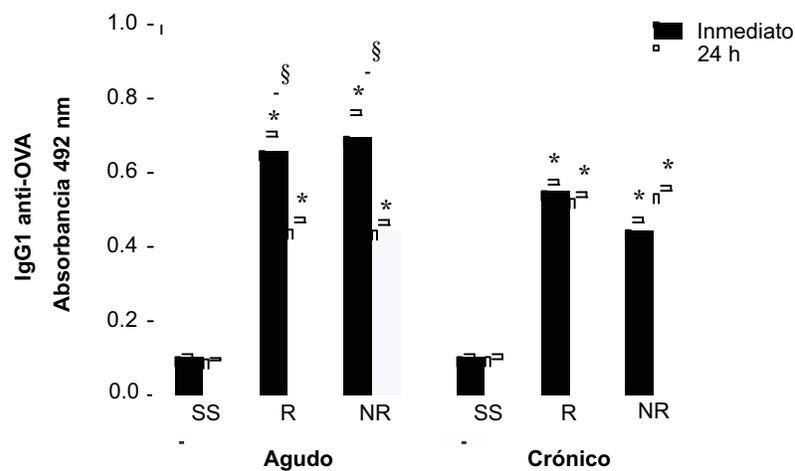
Los cambios en la estructura de las vías aéreas ocurren como resultado de la inflamación crónica durante el desarrollo de asma. Estos cambios incluyen la deposición de proteínas de matriz extracelular en la mucosa subepitelial. En este estudio evaluamos el efecto de la estimulación crónica con OVA (12 retos; modelo crónico) en la estructura de las vías aéreas de cobayos sensibilizados. Las secciones de pulmón fueron teñidas con la tinción tricrómica de Masson para diferenciar las fibras colágena del tejido muscular. En la figura 16 se muestra la acumulación de colágena como bandas continuas en azul, mientras que las capas de músculo liso se muestran en color rojo. En los paneles superiores se muestra una vista panorámica de las vías aéreas y en los paneles inferiores se muestra la magnificación de estos bronquiolos. En los cobayos del grupo SS (Fig. 16A y B) se observó una delgada capa de fibras de colágena en la región subepitelial, mientras que en los cobayos R (Fig. 16C-D) y NR (Fig. 16E-F) se observó una fuerte coloración azul en estructuras subepiteliales, la mucosa subepitelial tenía pocas células y estaba compuesta principalmente por tejido fibroso. Mediante análisis morfométrico automatizado se cuantificaron las áreas positivas para colágena en las secciones de pulmón de los cobayos. En el grupo SS se encontraron áreas similares de colágena en la mucosa subepitelial de bronquios y bronquiolos (Fig. 16G). En los grupos R y NR se observó un incremento estadísticamente significativo de las áreas positivas para colágena en la mucosa subepitelial de los bronquiolos en comparación con el grupo SS ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ; Fig. 16G). Los bronquios no mostraron modificaciones en la mucosa subepitelial.



**Figura 16. Características histológicas representativas de la mucosa subepitelial en cobayos expuestos a doce retos con OVA (modelo crónico).** (A) Sección de pulmón de un cobayo sin sensibilizar (SS) que muestra un bronquiolo teñido mediante la técnica tricrómica de Masson. (B) Magnificación que muestra pequeñas cantidades de fibras de colágena en la capa adventicia (flecha). (C) Sección de pulmón que muestra el bronquiolo de un cobayo respondedor (R). (D) Magnificación que muestra fibrosis en la mucosa subepitelial (flecha). (E) Bronquiolo de un cobayo no respondedor (NR). (F) Magnificación que muestra fibrosis alrededor del bronquiolo y que se extiende hacia el músculo liso (flecha). La escala de las barras corresponde a 50  $\mu\text{m}$  (A y C), 10  $\mu\text{m}$  (B, D, F) y 30  $\mu\text{m}$  (E). (G) Análisis morfométrico automatizado de la mucosa subepitelial de bronquiolos (barras blancas) y bronquios (barras negras). Las áreas con fibrosis se muestran en azul y fueron ajustadas al perímetro de la membrana basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=5$  cobayos por cada grupo;  $*p<0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *MSE*, mucosa subepitelial; *MB*, membrana basal.

## 7.5 Efecto del reto con OVA sobre la producción temporal de IgG1 e IgE específicas en suero de cobayos.

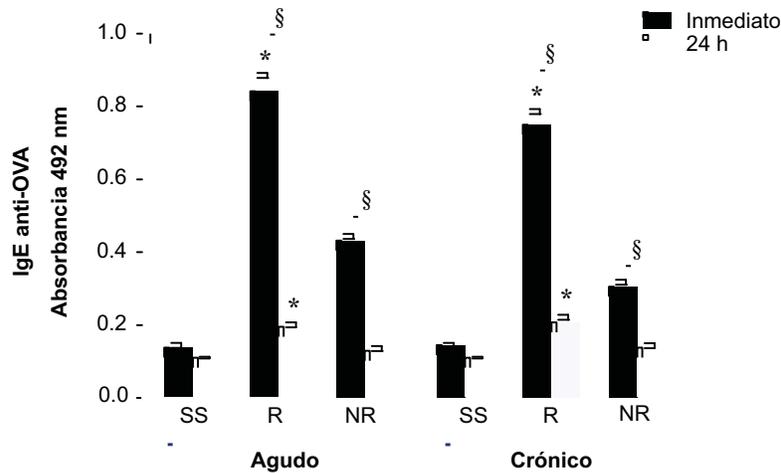
Para determinar si existen diferencias en la persistencia de anticuerpos específicos para OVA en el suero de los cobayos, las muestras fueron obtenidas de manera inmediata y 24 h después del último reto con OVA. Los niveles de IgG1 no fueron diferentes entre los grupos SS (Fig. 17). Los niveles de IgG1 fueron similares en los grupos R y NR y significativamente mayores al grupo SS en el modelo agudo y en el modelo crónico ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$  en los grupos inmediatos y  $n = 8$  en los grupos de 24 h; Fig. 17). Los niveles de IgG1 no fueron diferentes entre los grupos del modelo agudo y del modelo crónico. En los cobayos R y NR del modelo agudo los niveles de IgG1 fueron significativamente mayores en las muestras obtenidas de manera inmediata a reto con OVA en comparación con las muestras obtenidas 24 h después del reto ( $p < 0.05$ ; Fig. 17).



**Figura 17. Análisis del curso temporal de la producción de IgG1 específica para OVA en suero de cobayos.** Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de la concentración de IgG1 específica para OVA expresada como la absorbancia a 492 nm en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR);  $n = 6$  en los grupos inmediatos y  $n = 8$  en los grupos 24 h,  $*p < 0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico); §  $p < 0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.

Los niveles de IgE no fueron diferentes entre los cobayos SS (Fig. 18). Los niveles séricos de IgE específica para OVA se incrementaron de manera significativa en los cobayos del grupo R en comparación con los cobayos de los grupos SS y NR ( $p < 0.01$ ;  $n = 6$  en los grupos inmediatos y  $n = 8$  en los grupos de 24 h; Fig. 18). Los niveles de IgE

no fueron diferentes entre los grupos NR y SS. Los niveles de IgE no fueron diferentes entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 18). Los niveles de IgE fueron significativamente mayores en las muestras obtenidas de manera inmediata al reto con OVA en comparación con las muestras obtenidas 24 h después del reto ( $p < 0.05$ , Fig. 18).



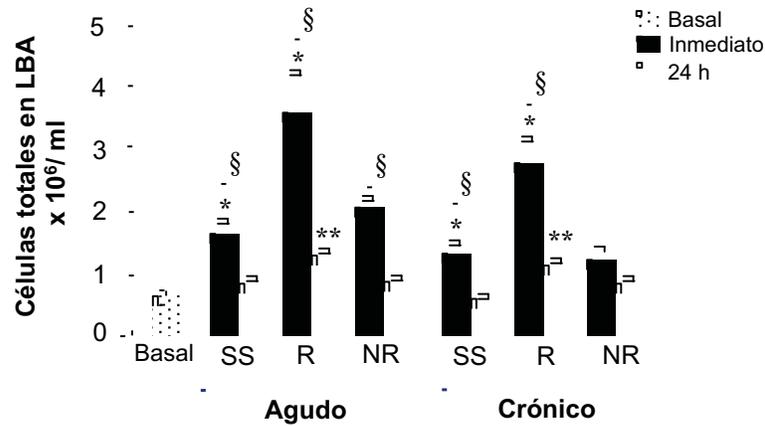
**Figura 18. Análisis del curso temporal de la producción de IgE específica para OVA en suero de cobayos.** Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de la concentración de IgE específica para OVA expresada como la absorbancia a 492 nm en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR);  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico); §  $p < 0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.

## 7.6 Efecto de la administración de OVA sobre el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas de cobayos.

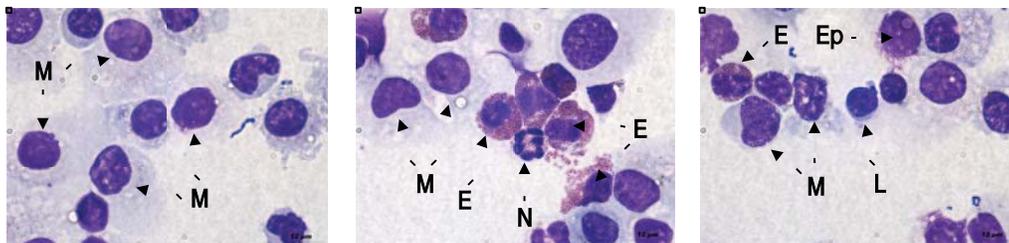
El reclutamiento de leucocitos hacia las vías aéreas es un proceso crítico para el desarrollo de la respuesta alérgica. Para determinar si la hiperreactividad de las vías aéreas se encontraba asociada a cambios en el número de células inflamatorias infiltradas realizamos conteo celular total y diferencial en muestras de LBA. Para evaluar si existen diferencias en el número y tipo de células inflamatorias infiltradas de acuerdo a cada tiempo de toma de las muestras, el LBA se obtuvo de manera inmediata y 24 h después del último reto en los grupos del modelo agudo y del modelo crónico.

El número de células totales infiltradas en el LBA fue significativamente mayor en los grupos R en comparación con sus respectivos grupos SS y NR ( $p < 0.05$  en grupos inmediatos y  $p < 0.01$  en grupos 24 h; Fig. 19). El número de células totales no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y del modelo crónico (Fig. 19). El número de células totales fue significativamente mayor en las muestras obtenidas de manera inmediata al reto con OVA en comparación con las muestras obtenidas 24 h después del reto ( $p < 0.05$ ; Fig. 19), este incremento también se observó en los grupos SS, lo que nos sugiere que la histamina ejerce un efecto quimiotáctico sobre las células. Por ello, un grupo adicional de cobayos SS ( $n=6$ ), al que no se le administró histamina para evaluar la reactividad de las vías aéreas, fue incluido en el estudio. El número de células totales en este grupo se consideró como el valor basal y fue semejante al de los grupos SS cuyas muestras se obtuvieron 24 h después, lo que sugiere que en este tiempo la histamina ya no ejerce un efecto sobre el número de células infiltradas (Fig. 19). El número de células totales fue significativamente mayor en los grupos SS inmediatos en comparación con el valor basal ( $p < 0.05$ ; Fig. 19).

Para el conteo celular diferencial se realizó la caracterización morfológica de las células inflamatorias provenientes del LBA en laminillas con frotis teñidos mediante la técnica Romanowsky. En la tinción Romanowsky los núcleos de las células y los gránulos de neutrófilos se tiñen en púrpura, el citoplasma se tiñe en lila y los gránulos de eosinófilos en rosa-naranja. En la figura 20 se muestran fotomicrografías representativas de las células de LBA con la tinción Romanowsky. En los grupos SS y NR se observaron principalmente macrófagos y algunos linfocitos, mientras que en el grupo R se observaron abundantes granulocitos.



**Figura 19. Conteo celular total en LBA de cobayos del modelo agudo y del modelo crónico.** La gráfica muestra el curso temporal de las células infiltradas en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, el número de células totales en este grupo fue considerado como la basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p<0.05$  y  $**p<0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico) y entre el valor basal y los grupos SS;  $\S p<0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.



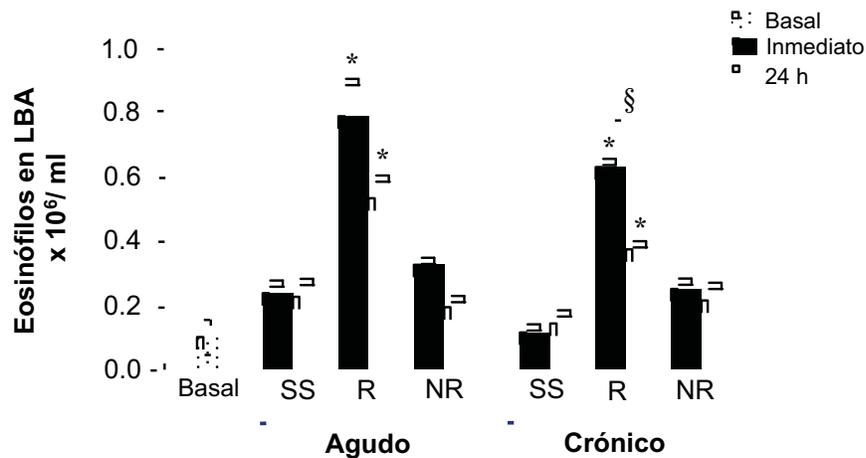
**Figura 20. Poblaciones celulares representativas recuperadas en LBA de cobayos.** En el panel izquierdo se muestra un cobayo sin sensibilizar (SS), en el panel de en medio un cobayo respondedor (R) y en el panel derecho un cobayo no respondedor (NR). Se muestran los botones celulares con la tinción Romanowsky para conteo diferencial. La flecha indica: M, macrófago; E, eosinófilo; N, neutrófilo; L, linfocito; Ep, célula epitelial.

### 7.6.1 El reto con el alérgeno no induce el reclutamiento de eosinófilos pero si de linfocitos en los cobayos no respondedores.

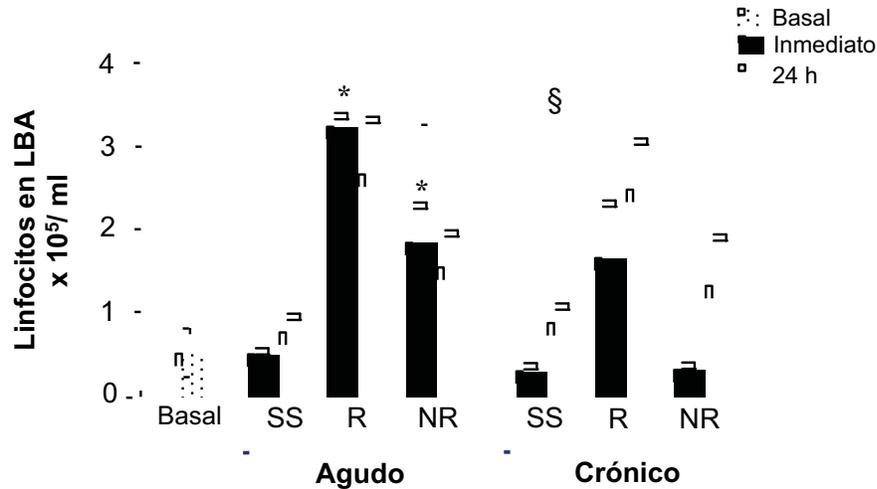
El número de eosinófilos no fue diferente entre los grupos SS y el basal, lo que sugiere que la histamina no induce el reclutamiento selectivo de eosinófilos hacia las vías aéreas (Fig. 21). El número de eosinófilos no fue diferente entre los grupos SS, ni entre

los grupos NR y SS (Fig. 21). El número de eosinófilos se incrementó significativamente en los grupos R en comparación con sus respectivos grupos SS y NR ( $p < 0.01$ ; Fig. 21). No hubo diferencia en el número de eosinófilos entre los grupos del modelo agudo y del modelo crónico (Fig. 21). El número de eosinófilos fue significativamente mayor en el grupo R inmediato del modelo crónico en comparación con el grupo R 24 h ( $p < 0.05$ ; Fig. 21).

El número de linfocitos no fue diferente entre los grupos SS y el basal, lo que sugiere que la histamina no induce el reclutamiento selectivo de esta población (Fig. 22). En el modelo agudo, el número de linfocitos fue mayor en los grupos R y NR en comparación con el grupo SS. Este incremento alcanzó significancia estadística solo en los grupos R y NR inmediatos ( $p < 0.05$ ; Fig. 22). El número de linfocitos fue significativamente mayor en el grupo NR inmediato del modelo agudo en comparación con el grupo NR inmediato del modelo crónico ( $p < 0.05$ ; Fig. 22).



**Figura 21. Análisis de eosinófilos infiltrados en LBA de cobayos.** La gráfica muestra el curso temporal de los eosinófilos infiltrados en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, el número de eosinófilos en este grupo fue considerado como la basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico) y entre el valor basal y los grupos SS; §  $p < 0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.

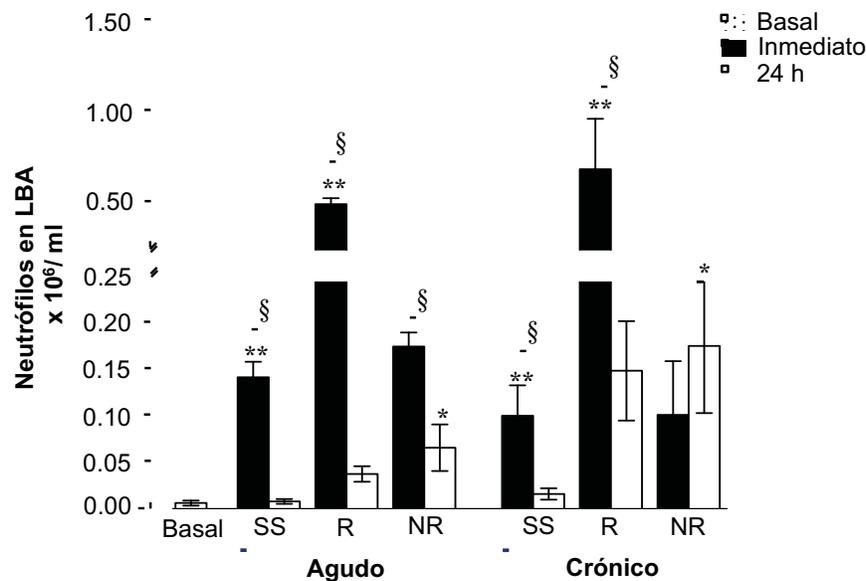


**Figura 22. Análisis de linfocitos infiltrados en LBA de cobayos.** La gráfica muestra el curso temporal de los linfocitos infiltrados en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, el número de linfocitos en este grupo fue considerado como la basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p<0.05$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico) y entre el valor basal y los grupos SS;  $\S p<0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.

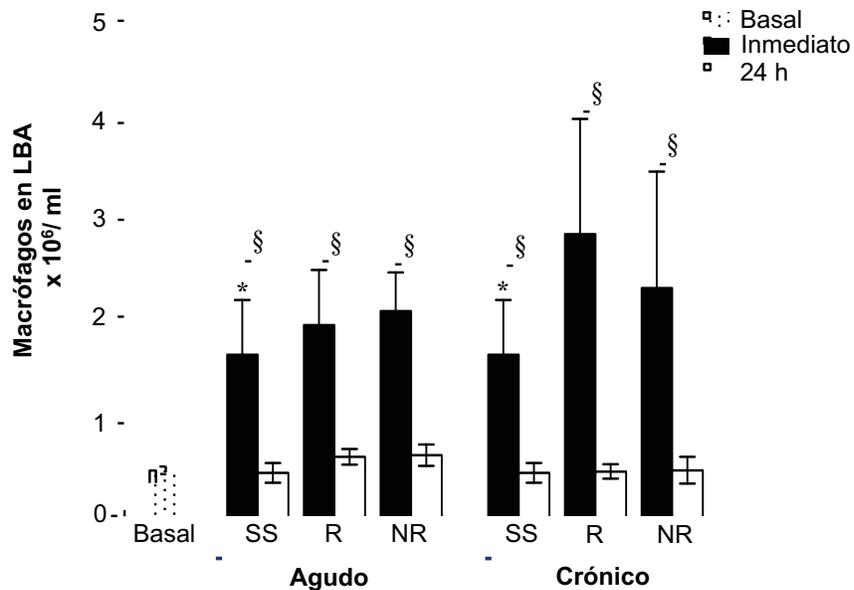
### 7.6.2 La histamina induce la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos hacia las vías aéreas.

El número de neutrófilos fue significativamente mayor en las muestras obtenidas de manera inmediata al reto con OVA en comparación con las muestras obtenidas 24 h después del reto ( $p<0.05$ ; Fig. 23). El número de neutrófilos fue significativamente mayor en los grupos SS inmediatos en comparación con el basal ( $p<0.01$ ; Fig. 23), mientras que el número de neutrófilos no fue diferente entre el basal y los grupos SS 24 h. Estos datos sugieren que la histamina induce el reclutamiento selectivo de neutrófilos hacia las vías aéreas. El número de neutrófilos no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y del modelo crónico (Fig. 23). El número de neutrófilos en los grupos R inmediatos fue significativamente mayor en comparación los grupos SS y NR ( $p<0.01$ ; Fig. 23). El número de neutrófilos en los grupos NR 24 h fue significativamente mayor en comparación con los grupos SS ( $p<0.05$ ; Fig. 23).

El número de macrófagos fue significativamente mayor en las muestras obtenidas de manera inmediata al reto con OVA en comparación con las muestras obtenidas 24 h después del reto ( $p < 0.05$ ; Fig. 24). El número de macrófagos fue significativamente mayor en los grupos SS inmediatos en comparación con el basal ( $p < 0.01$ ; Fig. 24), mientras que el número de macrófagos no fue diferente entre el basal y los grupos SS 24 h. Estos datos sugieren que la histamina induce el reclutamiento selectivo de macrófagos hacia las vías aéreas. El número de macrófagos no fue diferente entre los grupos SS, R y NR ni entre los grupos del modelo agudo y del modelo crónico (Fig. 23).



**Figura 23. Análisis de neutrófilos infiltrados en LBA de cobayos.** La gráfica muestra el curso temporal de los neutrófilos infiltrados en LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, el número de neutrófilos en este grupo fue considerado como la basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p < 0.05$  y  $**p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico) y entre el valor basal y los grupos SS; §  $p < 0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.



**Figura 24. Análisis de macrófagos infiltrados en LBA de cobayos.** La gráfica muestra el curso temporal de los macrófagos infiltrados en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, el número de macrófagos en este grupo fue considerado como la basal. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p<0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y del mismo modelo (agudo y crónico) y entre el valor basal y los grupos SS; §  $p<0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h y entre modelos agudo y crónico.

### 7.7 La ausencia de respuesta bronco-obstructiva está asociada a la disminución de mediadores característicos de la respuesta alérgica.

Para evaluar la respuesta inflamatoria de las vías aéreas y su relación con el desarrollo de obstrucción e hiperreactividad, los niveles de citocinas fueron cuantificados en cobayos del modelo agudo y del modelo crónico mediante ELISA y análisis de citometría de flujo. Adicionalmente, la expresión relativa del ARNm para cada citocina se analizó utilizando PCR en tiempo real. Las citocinas se cuantificaron en 1) sobrenadantes de homogenado pulmonar, 2) lavado bronquioalveolar, 3) citocinas intracelulares en células de LBA y 4) expresión de ARNm en tejido pulmonar.

### **7.7.1 Sobrenadantes de homogenado pulmonar.**

#### **a) Perfil de citocinas Th1/Th2.**

Para evaluar el efecto de la administración de histamina sobre la producción de citocinas se incluyó un grupo de cobayos SS (n=6), al que no se le administró histamina para evaluar la reactividad de las vías aéreas, este grupo fue considerado como la basal para cada citocina. Los niveles de IFN- $\gamma$  no fueron diferentes entre los grupos (Fig. 25A). Los niveles de IL-4 e IL-5 fueron significativamente mayores en los grupos SS inmediatos en comparación con el grupo basal ( $p<0.05$  y  $p<0.01$ , respectivamente; Fig. 25A) y fueron semejantes entre los grupos SS 24 h y el basal. Estos datos sugieren que la histamina induce la producción inmediata de IL-4 e IL-5 en las vías aéreas de los cobayos, pero a las 24 h los niveles de citocinas regresan al nivel basal. No se observaron diferencias en los niveles de IL-4 en las muestras de cobayos SS, R y NR obtenidas de manera inmediata al reto con OVA, mientras que en las muestras obtenidas 24h después, los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con los grupos SS y NR ( $p<0.01$ ; Fig. 25A). Los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en las muestras de cobayos SS y NR obtenidas de manera inmediata al reto en comparación con las muestras obtenidas 24 h después ( $p<0.05$ ; Fig. 25A). Los niveles de IL-4 no fueron diferentes entre los grupos R inmediato y R 24 h (Fig. 25A). Los niveles de IL-5 fueron significativamente mayores en los grupos R inmediatos y 24h en comparación con los grupos SS y NR ( $p<0.01$  y  $p<0.001$ , respectivamente; Fig. 25A). No se observaron diferencias en los niveles de IL-5 entre las muestras obtenidas de manera inmediata al reto en comparación con las muestras obtenidas 24 h después. Los niveles de IL-4 e IL-5 fueron similares entre los grupos SS y NR (Fig. 23A).

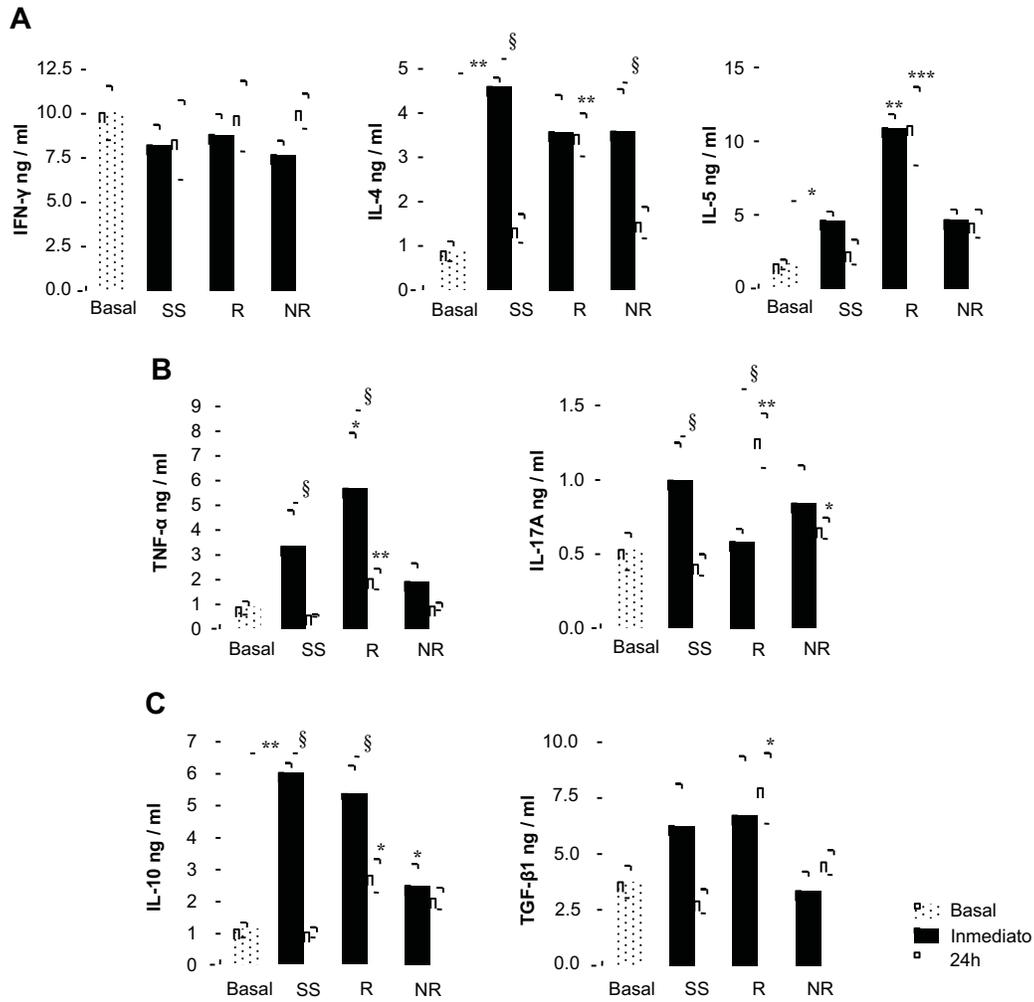
#### **b) Citocinas pro-inflamatorias: TNF- $\alpha$ e IL-17A.**

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-17A en las muestras de cobayos SS, R y NR obtenidas de manera inmediata al reto con OVA, mientras que en las muestras obtenidas 24 h después, los niveles de estas citocinas fueron significativamente mayores en los grupos R en comparación con los grupos SS y NR ( $p<0.01$ ; Fig. 25B). Los niveles de IL-17A fueron significativamente mayores en las muestras obtenidas 24 h después del reto con OVA en el grupo NR en comparación con el grupo SS ( $p<0.05$ ; Fig. 25B). Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-17A fueron significativamente mayores en las muestras de los grupos SS y R obtenidas de manera

inmediata al reto en comparación con las muestras obtenidas 24 h después ( $p < 0.05$ ; Fig. 25B), los niveles de estas citocinas fueron similares entre los grupos NR. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos basal y SS (Fig. 25B).

### **c) Citocinas reguladoras: IL-10 y TGF- $\beta$ 1.**

Los niveles de IL-10 fueron significativamente mayores en los grupos SS inmediatos en comparación con el grupo basal ( $p < 0.01$ ; Fig. 25C) y fueron semejantes entre los grupos SS 24 h y el basal. Estos datos sugieren que la histamina induce la producción inmediata de IL-10 en las vías aéreas de los cobayos, pero a las 24 h los niveles de IL-10 regresan al nivel basal. En las muestras obtenidas de manera inmediata al reto con OVA, los niveles de IL-10 fueron significativamente menores en el grupo NR en comparación con el grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 25C), los niveles de IL-10 fueron similares en los grupos SS y R. En las muestras obtenidas 24 h después del reto con OVA, los niveles de IL-10 fueron mayores en los grupos R y NR en comparación con el grupo SS, éste incremento solo alcanzó significancia estadística en el grupo R ( $p < 0.05$ ; Fig. 25C). Los niveles de TGF- $\beta$ 1 no fueron diferentes en las muestras de los grupos SS, R y NR obtenidas de manera inmediata al reto con OVA, ni entre los valores basales y los grupos SS (Fig. 25C). En las muestras obtenidas 24 h después del reto con OVA, los niveles de TGF- $\beta$ 1 fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con el grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 25C).



**Figura 25. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de homogenado pulmonar de cobayos.**

Las gráficas muestran los niveles de (A) citocinas del perfil Th1/Th2, (B) citocinas pro-inflamatorias y (C) citocinas reguladoras en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Se incluyó un grupo SS al que no se le administró histamina, los niveles de citocinas en este grupo fueron considerados como la basal. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron en nanogramos por mililitro (ng/ml) a partir de curvas patrón con cada citocina recombinante. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar;  $n=6$  en los grupos inmediatos y  $n=8$  en los grupos 24 h,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo tiempo (inmediatos o 24 h) y entre el valor basal y los grupos SS;  $\$ p<0.05$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos inmediatos y 24 h.

### **7.7.2 Citocinas en lavado bronquioalveolar.**

El incremento en los niveles de citocinas en los grupos cuyas muestras se obtuvieron de manera inmediata al reto, en comparación con los valores basales y las muestras obtenidas 24 h después del reto, sugiere que la histamina ejerce un efecto sobre la producción de citocinas. Adicionalmente, ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de citocinas entre los cobayos SS, R y NR en los grupos inmediatos, las figuras que se presentan en los análisis posteriores corresponden a muestras obtenidas 24 h después del último reto con OVA donde la histamina ya no ejerce un efecto sobre los niveles de citocinas. En estos análisis se incluyeron los grupos SS, R y NR del modelo agudo y del modelo crónico.

#### **a) Perfil de citocinas Th1/Th2.**

Los niveles de IFN- $\gamma$  no fueron diferentes entre los grupos (Fig. 26A). En el modelo agudo no se detectó IL-4 en el grupo SS, mientras que en el grupo R los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en comparación con el grupo NR ( $p < 0.05$ ; Fig. 26A). En el modelo crónico los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.001$ ; Fig. 26A). Los niveles de IL-4 no fueron diferentes entre los grupos SS y NR del modelo crónico. Los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en el grupo R del modelo crónico en comparación con el grupo R del modelo agudo ( $p < 0.01$ ; Fig. 26A). Los niveles de IL-5 fueron significativamente mayores en los grupos R en comparación con los grupos SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 26A). Los niveles de IL-4 e IL-5 no fueron diferentes entre los grupos SS y NR (Fig. 26A).

#### **b) Citocinas pro-inflamatorias: IL-17A y TNF- $\alpha$ .**

Los niveles de IL-17A fueron significativamente mayores en los grupos R en comparación con los grupos SS ( $p < 0.05$  en el modelo agudo y  $p < 0.01$  en el modelo crónico; Fig. 26B). Los niveles de TNF- $\alpha$  fueron significativamente mayores en los grupos R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.01$ , en el modelo agudo y  $p < 0.001$ , en el modelo crónico; Fig. 26B). Los niveles de IL-17A y TNF- $\alpha$  no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos SS y NR (Fig. 26B).

### **c) Citocinas reguladoras: IL-10 y TGF- $\beta$ 1.**

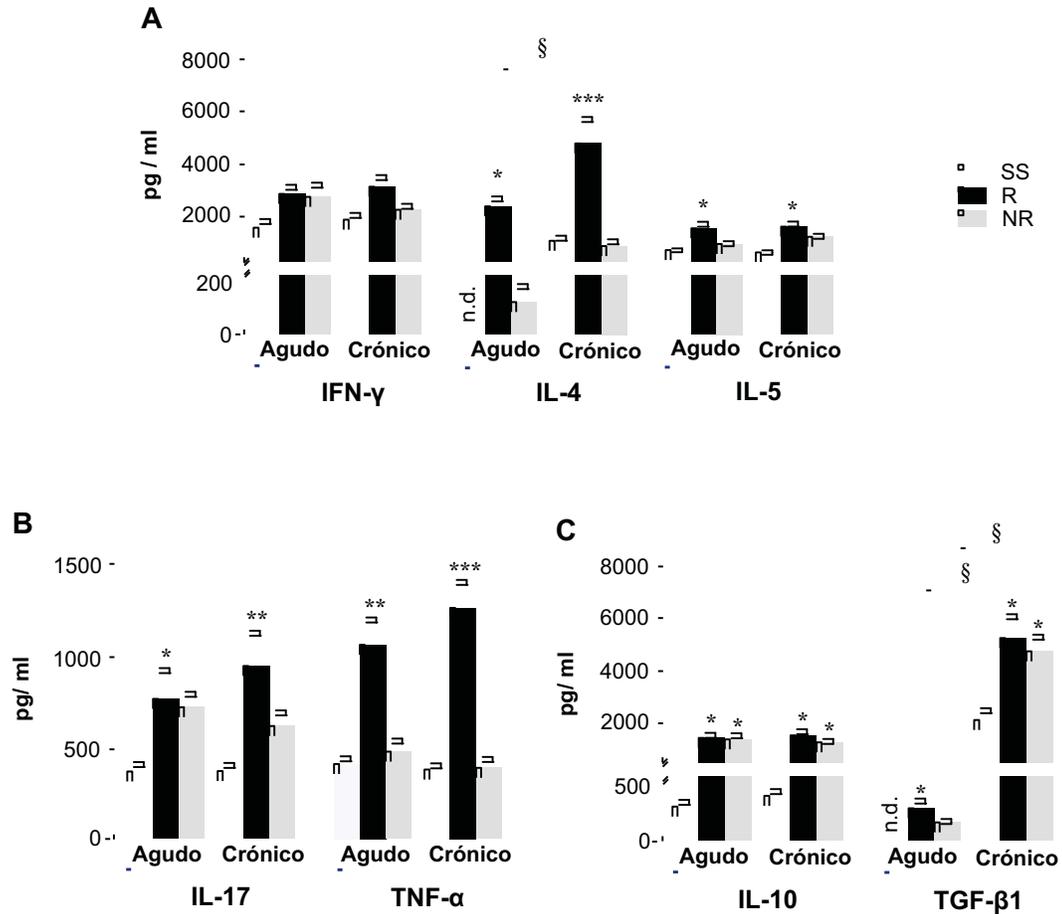
Los niveles de IL-10 fueron significativamente mayores en los grupos R y NR en comparación con los grupos SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 26C). En el modelo agudo no se detectó TGF- $\beta$ 1 en el LBA del grupo SS. Los niveles de TGF- $\beta$ 1 fueron significativamente mayores en el grupo R en comparación con el grupo NR ( $p < 0.05$ ; Fig. 26C). En el modelo crónico los niveles de TGF- $\beta$ 1 fueron significativamente mayores en los grupos R y NR en comparación con el grupo SS ( $p < 0.01$ ; Fig. 26C). Los niveles de TGF- $\beta$ 1 fueron significativamente mayores en los grupos R y NR del modelo crónico en comparación con los grupos del modelo agudo ( $p < 0.01$ ; Fig. 26C).

### **7.7.3 Citocinas intracelulares.**

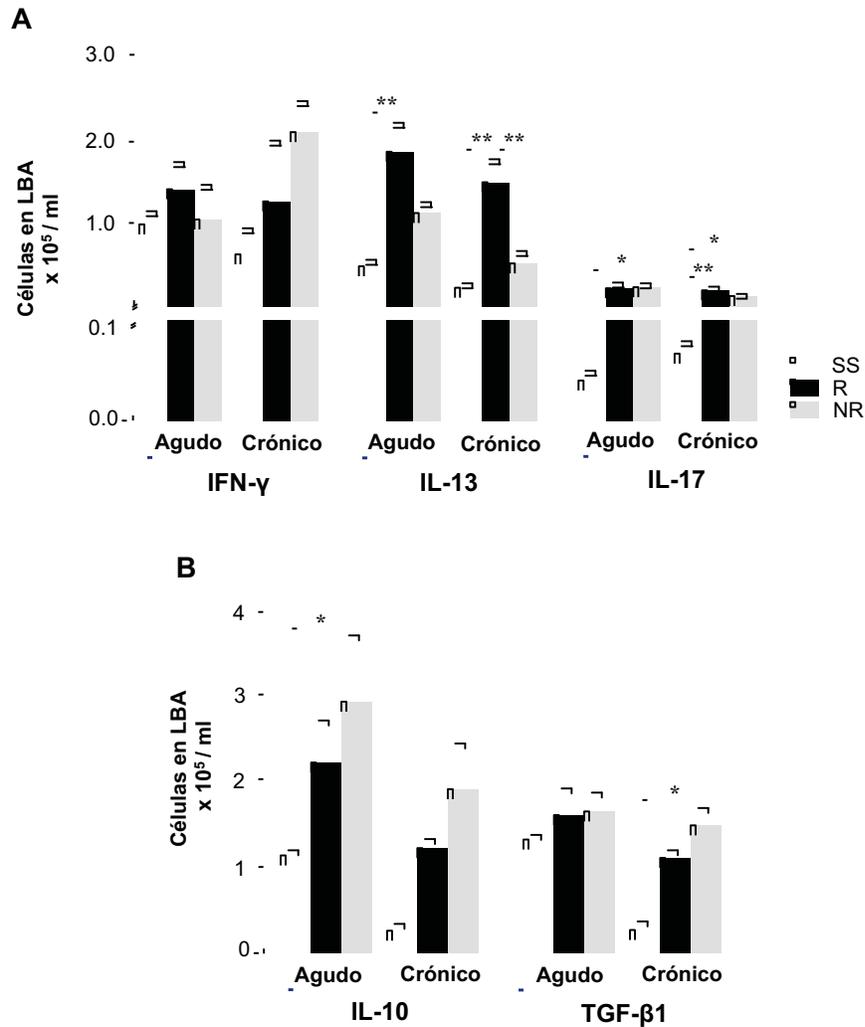
Las células del sistema inmune infiltradas hacia las vías aéreas durante la respuesta alérgica son una fuente importante de mediadores inflamatorios. Para comparar el perfil de citocinas producidas por las células inflamatorias y determinar la contribución de estos mediadores en el desarrollo de obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas en los grupos de cobayos expuestos a OVA, utilizamos citometría de flujo como herramienta de detección de citocinas intracelulares en las células obtenidas del LBA.

El número de células productoras de IFN- $\gamma$  no fue diferente entre los grupos (Fig. 27A). Los niveles de IL-13, una citocina del perfil Th2, fueron significativamente mayores en los grupos R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.01$ ; Fig. 27A). El número de células productoras de IL-13 no fue diferente entre los grupos NR y SS (Fig. 27A). En el modelo agudo, el número de células productoras de IL-17A fue mayor en los grupos R y NR en comparación con el grupo SS, este incremento solo alcanzó significancia estadística en el grupo NR ( $p < 0.05$ ; Fig. 27A). En el modelo crónico, el número de células productoras de IL-17A se incrementó de manera significativa en los grupos R ( $p < 0.01$ ) y NR ( $p < 0.05$ ) en comparación el grupo SS (Fig. 27A). El número de células productoras de citocinas del perfil Th1/Th2 no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 27A). El número de células productoras de IL-10 fue mayor en los grupos NR, este incremento alcanzó significancia estadística únicamente en el grupo NR del modelo agudo en comparación con el grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 27B). El número de células productoras de TGF- $\beta$ 1 no fue diferente entre los grupos del modelo agudo. En el modelo crónico, el número de células productoras de TGF- $\beta$ 1 se incrementó significativamente en el grupo NR en comparación con el

grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 27B). El número de células productoras de citocinas reguladoras no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 27B).



**Figura 26. Cuantificación de citocinas en LBA de cobayos.** Las gráficas muestran los niveles de (A) citocinas del perfil Th1/Th2, (B) citocinas pro-inflamatorias y (C) citocinas reguladoras en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). Las muestras de LBA se obtuvieron 24 horas después del último reto con OVA. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron en picogramos por mililitro (pg/ml) a partir de curvas patrón con cada citocina recombinante. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=8$  cobayos por cada grupo; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre cobayos SS, R y NR del mismo modelo (agudo y crónico); §  $p < 0.01$ , prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos del modelo agudo y del modelo crónico. n.d., no detectado.

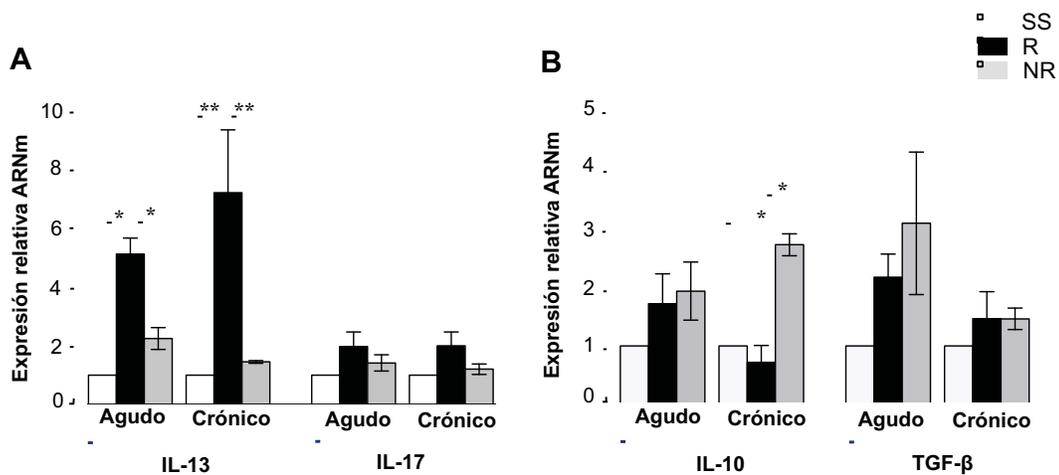


**Figura 27. Tinción intracelular de citocinas en células provenientes de LBA de cobayos.** Las gráficas muestran el número de células productoras de (A) citocinas pro-inflamatorias y (B) citocinas reguladoras en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR) analizadas mediante citometría de flujo. Las muestras de LBA se obtuvieron 24 horas después del último reto con OVA. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por cada grupo; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  y \*\*\* $p<0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

#### 7.7.4 Expresión de ARNm de citocinas en tejido pulmonar.

Para comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de citocinas con su expresión a nivel de ARNm analizamos la expresión del transcrito de las citocinas en las que encontramos cambios significativos. Las citocinas evaluadas fueron IL-13, IL-17A, IL-10 y TGF- $\beta$ 1. Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real se amplificó el ADNc obtenido a partir del ARNm extraído de tejido pulmonar utilizando

oligonucleótidos específicos para cada citocina. Como gen de control interno se utilizó la amplificación de HPRT. En las gráficas de la figura 28 se muestran los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenidos para cada caso y se indican como la expresión relativa del ARNm de la citocina. La expresión del ARNm de IL-13 fue significativamente mayor en los grupos R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.01$  en el modelo agudo y  $p < 0.001$  en el modelo crónico; Fig. 28A). La expresión de IL-13 fue similar en los grupos SS y NR (Fig. 28A). La expresión de IL-17A no fue estadísticamente diferente entre los grupos. La expresión del ARNm de IL-13 e IL-17A no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 28A). En el modelo agudo, la expresión de IL-10 no fue diferente entre los grupos y en el modelo crónico la expresión de IL-10 fue significativamente mayor en el grupo NR en comparación con los grupos R y SS ( $p < 0.01$ ; Fig. 28B). La expresión de TGF- $\beta$ 1 no fue estadísticamente diferente entre los grupos (Fig. 28B). La expresión del ARNm de citocinas reguladoras no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 28B).



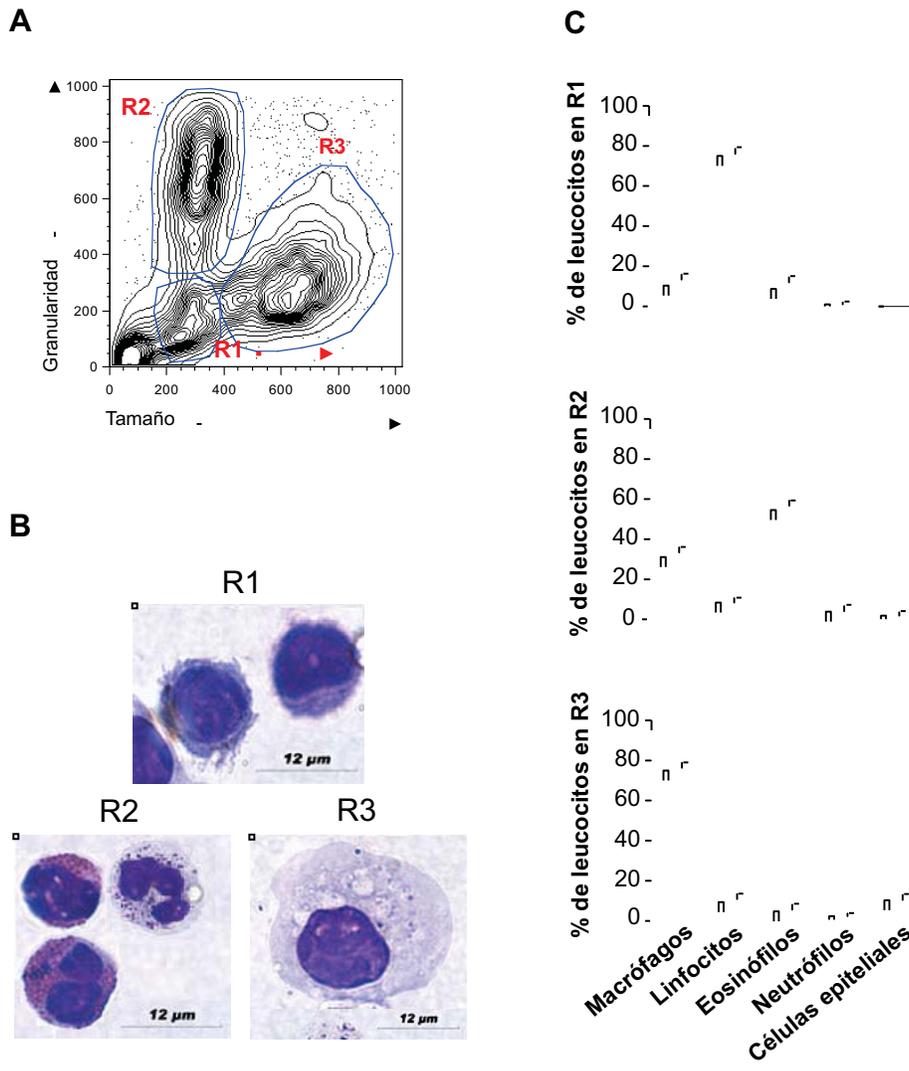
**Figura 28. Análisis de la expresión del ARNm de citocinas en pulmón de cobayos.** Las gráficas muestran la expresión de A) citocinas pro-inflamatorias y B) citocinas reguladoras en cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR) analizadas mediante RT-PCR en tiempo real. Las muestras de pulmón se obtuvieron 24 horas después del último reto con OVA. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se muestran como la expresión relativa del ARNm para cada citocina. La expresión relativa se refiere al valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenido en cada caso. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por cada grupo en el modelo agudo y  $n=4$  cobayos por cada grupo en el modelo crónico; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## 7.8 Caracterización de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos.

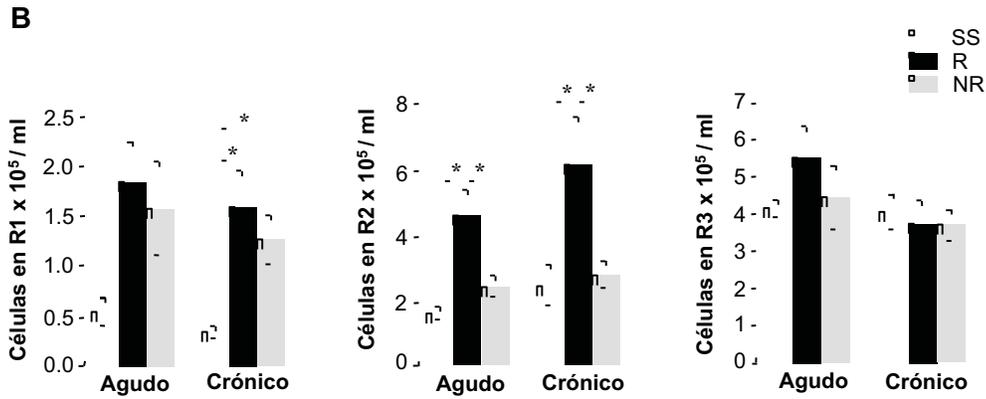
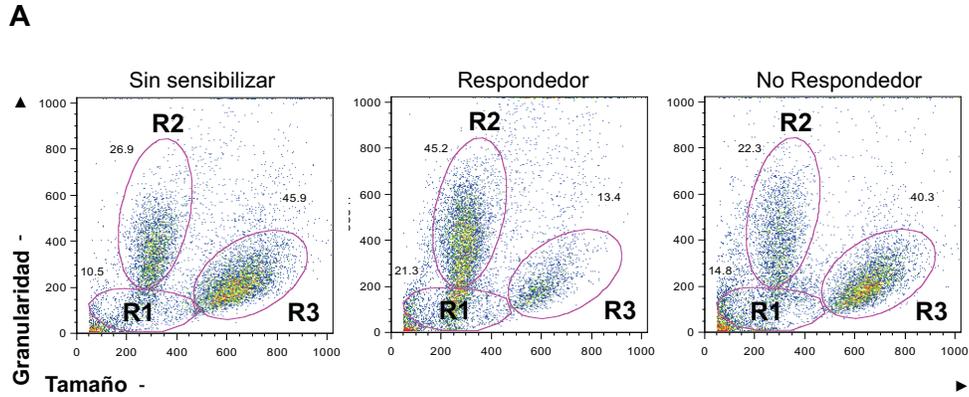
Diversos parámetros inmunológicos siguen siendo poco claros en estudios realizados en cobayos. En algunos estudios se han caracterizado las fracciones de leucocitos en sangre periférica y en tejido linfoide<sup>101, 102</sup>; sin embargo, hasta ahora no existe una caracterización de las fracciones de leucocitos y las subpoblaciones de linfocitos en el LBA de cobayos. Los análisis empleando anticuerpos monoclonales y citometría de flujo han sido ampliamente utilizados en estudios inmunológicos tanto en humanos como en modelos experimentales. En este estudio utilizamos un análisis de citometría de flujo basado en el tamaño y granularidad de las células del LBA y caracterizamos morfológicamente y con anticuerpos comerciales las sub-poblaciones de linfocitos Th.

En la figura 29A se muestra una gráfica de puntos representativa de las poblaciones celulares en LBA de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad. Se encontraron tres regiones que fueron seleccionadas como R1, células pequeñas y de baja granularidad; R2, células con alta granularidad; y R3, células grandes. En base a estos parámetros realizamos la separación física de las células por citometría de flujo o “cell sorting”. Las células obtenidas en cada región fueron citocentrifugadas y los botones celulares obtenidos fueron teñidos con la tinción Romanowsky para caracterizarlas morfológicamente. La figura 29B muestra fotomicrografías representativas de cada región. En la R1 encontramos principalmente linfocitos; en la R2 eosinófilos y neutrófilos; y en la R3 macrófagos. Se realizó el conteo diferencial de las células obtenidas en cada región y se expresó como el porcentaje de cada tipo celular en tres cobayos diferentes (Fig. 29C).

En la Figura 30A se muestran las gráficas de puntos representativas de las poblaciones celulares en el LBA de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad. En los cobayos R y NR el número de células en la R1, que corresponden a linfocitos, fue mayor en comparación con el grupo SS, este incremento alcanzó significancia estadística únicamente en los grupos del modelo crónico ( $p < 0.05$ ; Fig. 30B). Como se observó en las células recuperadas de LBA y teñidas con la tinción Romanowsky para conteo diferencial (Fig. 20 y Fig. 21), en el grupo R encontramos un número significativamente mayor de células en la R2, que corresponde en su mayoría a eosinófilos, en comparación con los grupos NR y SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 30B). El número de células en la R2 no fue diferente entre los grupos NR y SS. El número de macrófagos en la R3 no fue diferente entre los grupos (Fig. 30B). El número de células en cada región no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 30B).



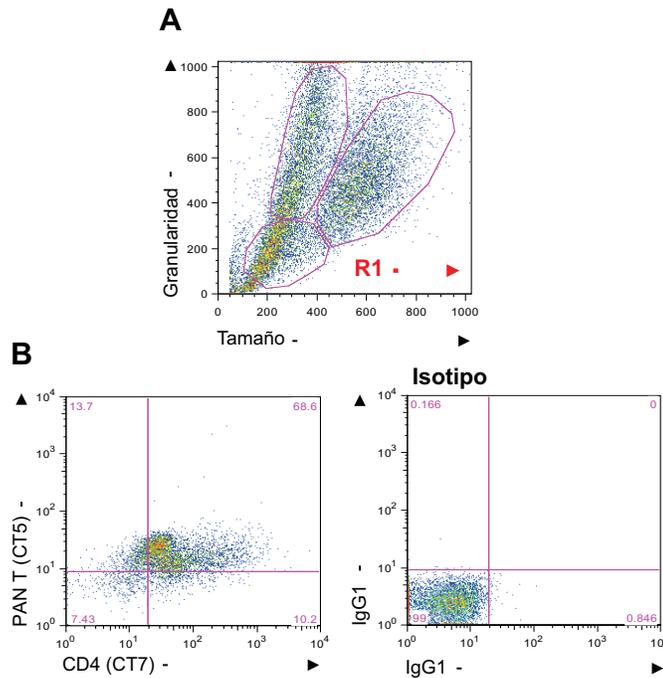
**Figura 29. Caracterización de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos.** Las células del LBA fueron analizadas de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad mediante citometría de flujo y posteriormente fueron recuperadas. (A) Gráfica representativa de las fracciones de leucocitos en LBA. La R1, corresponde a células pequeñas y de baja granularidad; R2, células granulares; y R3, células grandes. (B) Caracterización morfológica de las fracciones de leucocitos en cada región. Las células purificadas fueron teñidas con la tinción Romanowsky y analizadas mediante microscopia de campo claro. Las fotomicrografías muestran linfocitos en R1; granulocitos (eosinófilos y neutrófilos) en R2 y macrófagos en R3. La escala de las barras corresponde a 12  $\mu$ m. (C) Conteo celular diferencial en cada región, las barras corresponden a las medias del porcentaje de células en cada región,  $\pm$  error estándar de n=3 cobayos.



**Figura 30. Análisis de las fracciones de leucocitos en LBA de cobayos.** Las células del LBA fueron analizadas mediante citometría de flujo de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad. (A) Gráficas de puntos representativas de las regiones de leucocitos en cobayos sin sensibilizar (SS) (izquierda), respondedores (R) (en medio) y no respondedores (NR) (derecha). (B) Número de células en cada región. Las fracciones de leucocitos fueron definidas como R1; linfocitos; R2, granulocitos y R3, macrófagos. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por cada grupo. \* $p<0.05$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Después de la caracterización morfológica de las células en cada región utilizamos anticuerpos específicos para caracterizar población de linfocitos Th de la R1. La caracterización de los linfocitos Th en nuestro modelo es importante ya que dentro de esta población se encuentran otras subpoblaciones, como los linfocitos Th2, que orquestan la inflamación alérgica durante el asma. En una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad se seleccionó la región linfoide R1 (Fig. 31) y a partir de esta región se abrió una gráfica de puntos del marcador PAN T (CT5) contra CD4 (CT7). El marcador PAN T nos permite distinguir a los linfocitos T de los linfocitos B de cobayo. La población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> correspondió a más del 60% de las células en la R1

(Fig. 31). Estas regiones fueron utilizadas para los análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

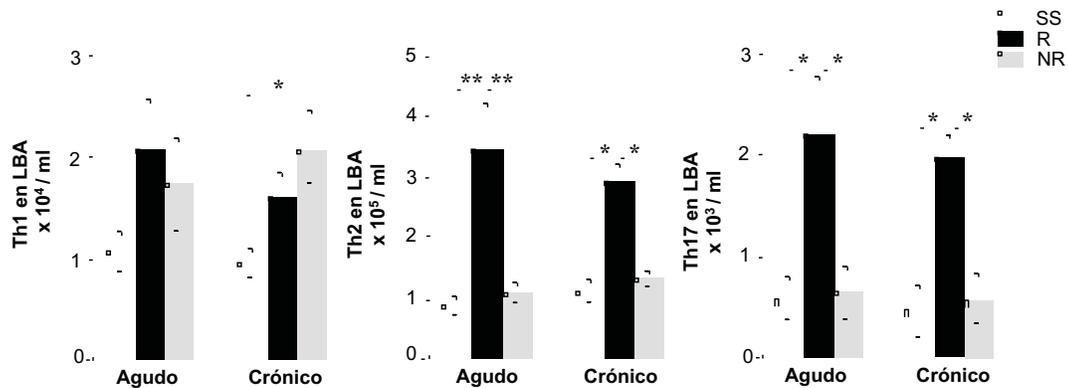


**Figura 31. Análisis de la fracción R1 mediante citometría de flujo en células provenientes del LBA de cobayo.** Las células del LBA fueron analizadas mediante citometría de flujo de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad. A) Gráfica de puntos representativa de la R1 seleccionada para el análisis de linfocitos. B) Gráfica de puntos representativa del porcentaje de células positivas para PAN T y CD4 a partir de la región R1 (izquierda) y el control de isotipo (derecha).

## 7.9 La población de linfocitos Th2 no se incrementa en cobayos no respondedores.

Durante la respuesta inmune los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* se diferencian en subtipos efectores que incluyen linfocitos Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. El asma alérgica se caracteriza por un imbalance en el perfil Th1/Th2 y una elevada secreción de citocinas Th2. Para definir la participación de estas subpoblaciones de linfocitos en el desarrollo de obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas en nuestro modelo, evaluamos el perfil de citocinas intracitoplasmáticas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. El número de linfocitos Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) no fue diferente entre los grupos del modelo agudo, mientras que en el modelo crónico, el número de linfocitos Th1 fue significativamente mayor en el grupo NR con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ; Fig. 32). El número de linfocitos Th1 no fue diferente

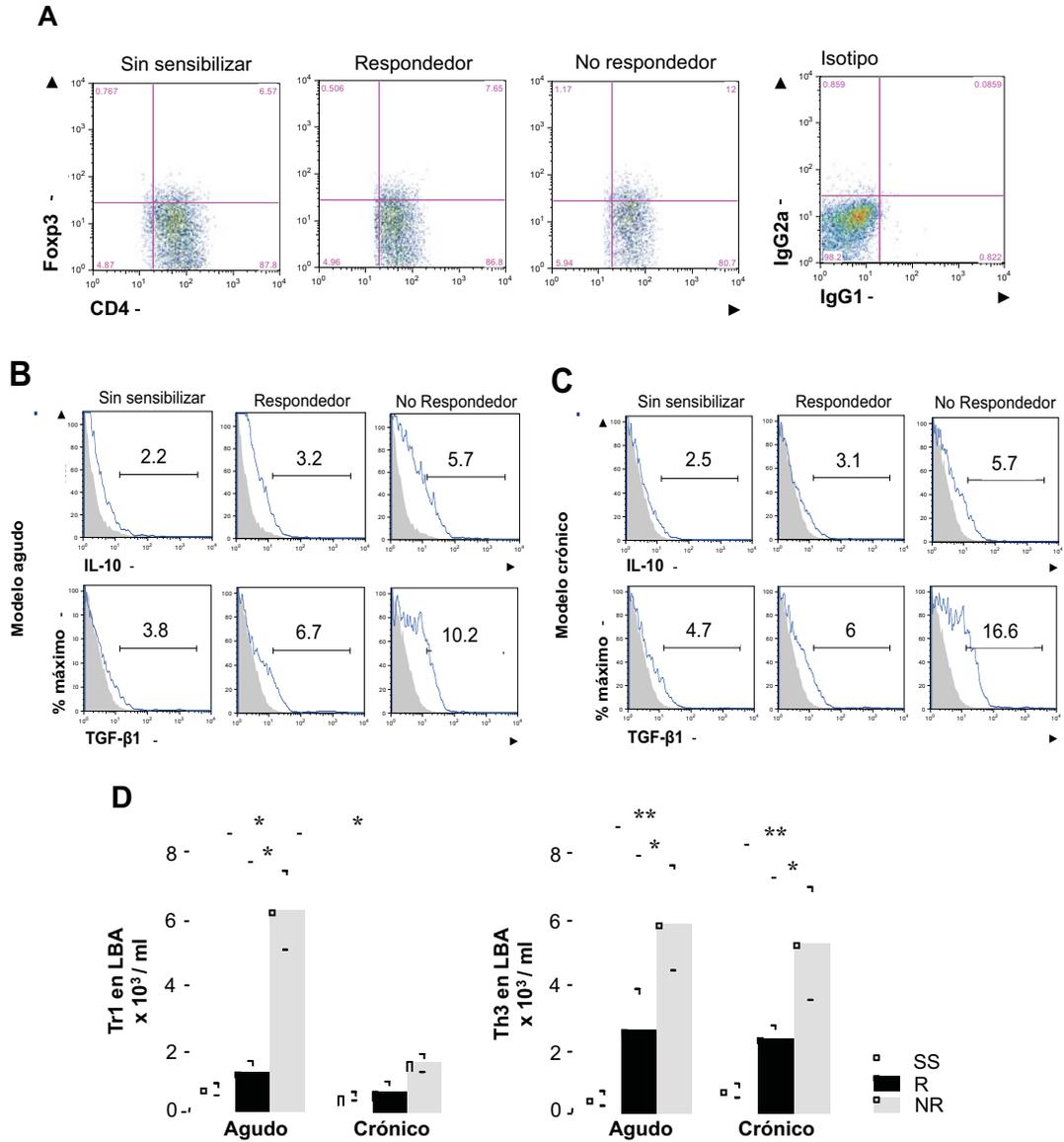
entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 32). El número de linfocitos Th2 ( $CD4^+IL-13^+$ ) fue significativamente mayor en los grupos de cobayos R en comparación con los grupos NR y SS ( $p < 0.01$  en el modelo agudo y  $p < 0.05$  en el modelo crónico; Fig. 32). El número de linfocitos Th2 no fue diferente entre los cobayos de los grupos NR y SS (Fig. 32). El número de linfocitos Th2 no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 32). El número de linfocitos Th17 ( $CD4^+IL-17A^+$ ) fue significativamente mayor en los grupos R en comparación con los grupos SS y NR ( $p < 0.05$ ; Fig. 32). El número de linfocitos Th17 no fue diferente entre los grupos NR y SS ni entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 32). En conjunto, estos resultados sugieren que los cobayos R desarrollan una respuesta inflamatoria del tipo Th2, típica del asma, mientras que los cobayos NR previenen la inflamación alérgica Th2 inducida por el reto con OVA.



**Figura 32. Evaluación del perfil de citocinas intracitoplasmáticas en linfocitos T  $CD4^+$  de LBA de cobayos.** Las gráficas muestran el número de linfocitos efectores Th1, Th2 y Th17 en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). El LBA se obtuvo 24 horas después del último reto con OVA y la producción de  $IFN-\gamma$ , IL-13 e IL-17A por los linfocitos T  $CD4^+$  fue evaluada mediante citometría de flujo. Las células fueron seleccionadas a partir de la R1 y se analizó la expresión de citocinas en la subpoblación  $PAN T^+ CD4^+$ . Th1, representa a la subpoblación  $CD4^+IFN-\gamma^+$ ; Th2 representa a la subpoblación  $CD4^+IL-13^+$  y Th17 representa a la subpoblación  $CD4^+IL-17A^+$ . Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por cada grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### **7.10 Las poblaciones de linfocitos Tr1 y Th3 se incrementan en los cobayos no respondedores.**

Los linfocitos T reguladores (Tregs) son una población importante de linfocitos T que modulan el balance de la respuesta inmune y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Los linfocitos Tregs pueden ser subdivididas en poblaciones que expresan o no el factor de transcripción Foxp3. La cohorte de Tregs que no expresa Foxp3 consiste de células Tr1 que ejercen sus funciones inmunomoduladoras mediante la secreción de IL-10 y las Th3 mediante la secreción de TGF- $\beta$ 1<sup>71</sup>. Utilizando citometría de flujo identificamos estas subpoblaciones de linfocitos Tregs en las células del LBA de los cobayos. De acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad, las células en la R1 fueron seleccionadas y a partir de esta región se realizó una gráfica de puntos en donde se determinó la expresión de CD4 y Foxp3. Las células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> fueron seleccionadas (Figura 33A) y se analizó la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ 1. En la figura 33B se muestran los histogramas representativos de la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> de los cobayos del modelo agudo y en la figura 33C en cobayos del modelo crónico. El número de linfocitos Tr1 fue significativamente mayor en los cobayos NR del modelo agudo en comparación con los grupos control y R ( $p < 0.05$ ; Fig. 33D). En el modelo crónico el número de linfocitos Tr1 no fue diferente entre los grupos (Fig. 33D). El número de linfocitos Tr1 fue significativamente mayor en el grupo NR agudo en comparación con el grupo NR crónico ( $p < 0.05$ ; Fig. 33D). El número de linfocitos Th3 en el grupo NR fue significativamente mayor en comparación con el grupo R ( $p < 0.05$ ; Fig. 33D) y el grupo SS ( $p < 0.01$ ; Fig. 33D). Estos datos sugieren que los linfocitos Tr1 y Th3 podrían estar involucradas en modular la respuesta alérgica mediada por linfocitos Th2 en los cobayos NR mediante la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ 1.

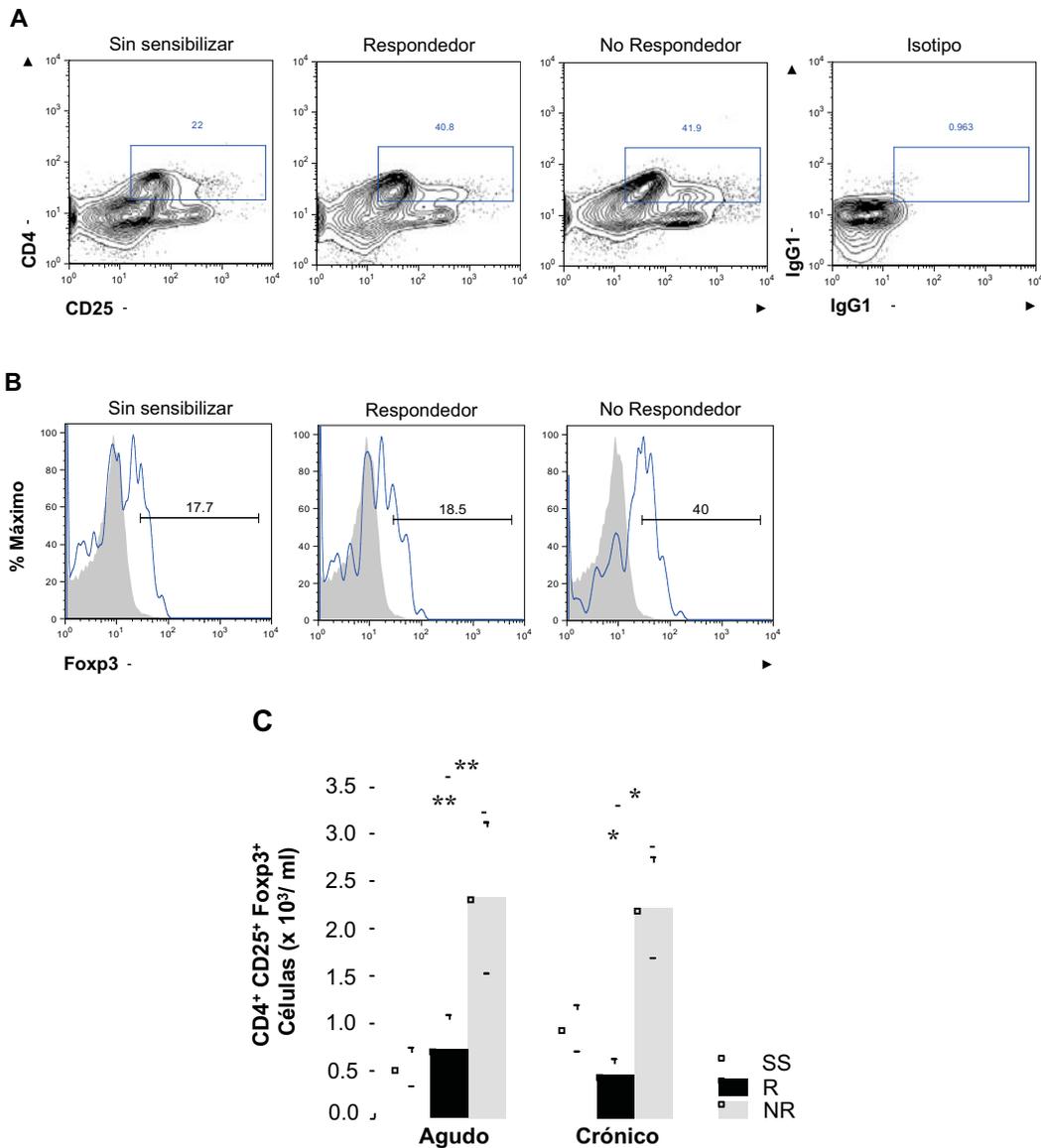


**Figura 33. Linfocitos Tr1 y Th3 en LBA de cobayos.** Las gráficas muestran el número de células en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). El LBA se obtuvo 24 horas después del reto con OVA y la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> Fopx3<sup>-</sup> fue evaluada mediante citometría de flujo. (A) Gráficas de puntos representativas del análisis de CD4 y Fopx3. Histogramas representativos de la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en cobayos del (B) modelo agudo y (C) modelo crónico. El histograma en azul corresponde a la expresión de las citocinas y el histograma gris corresponde al control de isotipo. (D) Número de linfocitos Tr1 y Th3. Las células fueron seleccionadas a partir de la R1 y se analizó la expresión de citocinas en la subpoblación PAN T<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Tr1, representa a la subpoblación CD4<sup>+</sup> Fopx3<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> y Th3 representa a la subpoblación CD4<sup>+</sup> Fopx3<sup>-</sup> TGF- $\beta$ 1<sup>+</sup>. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de n=6 cobayos por cada grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.01, ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

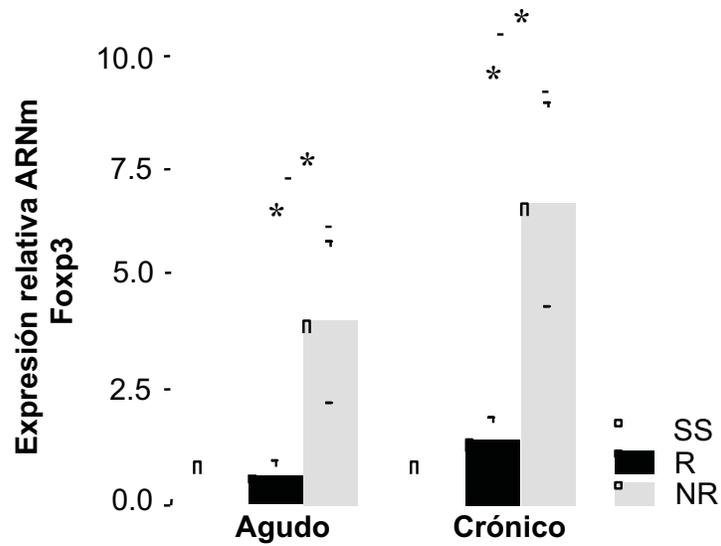
### **7.11 Los linfocitos T Foxp3<sup>+</sup> se incrementan en el pulmón de los cobayos no respondedores.**

Foxp3 es un factor de transcripción indispensable para la función supresora de los linfocitos Tregs. Nuestro siguiente objetivo fue identificar linfocitos Foxp3<sup>+</sup> para determinar si esta población difiere entre los cobayos R y NR. Una de las moléculas asociadas al fenotipo de células Tregs es la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) o CD25. Mediante citometría de flujo analizamos la expresión de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en células del LBA. De acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad las células en la R1 fueron seleccionadas y a partir de esta región se realizó una gráfica en donde se determinó la expresión de CD4 y CD25. Las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fueron seleccionadas (Fig. 34A) y se analizó la expresión de Foxp3 en esta población. En la figura 34B se muestran los histogramas representativos de la expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> fue significativamente mayor en los grupos NR en comparación con los grupos SS y R ( $p < 0.01$  en el modelo agudo y  $p < 0.05$  en el modelo crónico; Fig. 34C). El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no fue diferente entre los grupos SS y R (Figura 34C). El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no fue diferente entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 34C).

Finalmente, el análisis de la expresión del ARNm mostró un incremento significativo en la expresión de Foxp3 en el pulmón de los cobayos NR en comparación con los grupos SS y R ( $p < 0.05$ ; Fig. 35). La expresión de Foxp3 no fue diferente entre los grupos SS y R ni entre los grupos del modelo agudo y los grupos del modelo crónico (Fig. 35). En conjunto, estos datos sugieren que los linfocitos Tregs probablemente suprimen la inflamación alérgica en los cobayos NR y constituyen un mediador de la tolerancia de las vías aéreas a antígenos inhalados en estos cobayos.



**Figura 34. Linfocitos T reguladores Foxp3<sup>+</sup> en LBA de cobayos.** Las gráficas muestran el número de células en el LBA de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR). El LBA se obtuvo 24 horas después del reto con OVA y la población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> fue evaluada mediante citometría de flujo. (A) Gráficas representativas del análisis de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a partir de la R1. (B) Histogramas representativos donde se muestra la expresión de Foxp3. El histograma en azul corresponde a la expresión de Foxp3 y el histograma gris corresponde al control de isotipo. (C) Número de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en el LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de n=6 cobayos por cada grupo. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



**Figura 35. Análisis de la expresión del ARNm de Foxp3 en pulmón de cobayos.** La expresión del ARNm de Foxp3 en tejido pulmonar de cobayos sin sensibilizar (SS), respondedores (R) y no respondedores (NR) fue analizada mediante RT-PCR en tiempo real. Las muestras de pulmón se obtuvieron 24 horas después del último reto con OVA. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se muestran como la expresión relativa del ARNm para cada citocina. La expresión relativa se refiere al valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenido en cada caso. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  error estándar de n=6 cobayos por cada grupo en el modelo agudo y n=4 cobayos por cada grupo en el modelo crónico; \*p<0.05, ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## 8. DISCUSIÓN

La hiperreactividad de las vías aéreas es la principal alteración funcional durante el asma y se manifiesta a través de síntomas respiratorios asociados a la obstrucción del flujo de aire o bronco-obstrucción. En nuestro modelo de asma en cobayo, algunos cobayos no tienen bronco-obstrucción después del reto con el alérgeno (no respondedores, NR), pero desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas de manera similar a los cobayos que sí tienen bronco-obstrucción (respondedores, R). La bronco-obstrucción es un signo característico de la exacerbación asmática. Usualmente, la exposición a los alérgenos se acompaña por una respuesta bronco-obstruccion transitoria e inmediata y horas después por una respuesta tardía de larga duración <sup>103</sup>. En nuestro estudio, los cobayos R solo mostraron una respuesta bronco-obstruccion inmediata. Algunos estudios han descrito que en el cobayo bajas dosis de alérgeno inducen únicamente la respuesta inmediata, mientras que altas dosis inducen la respuesta inmediata y la respuesta tardía <sup>104</sup>, lo que sugiere que la dosis del alérgeno es fundamental en el desarrollo de ambas respuestas en el cobayo. En nuestro estudio, las dosis administradas fueron ajustadas para reducir el choque anafiláctico durante los retos con el alérgeno. Sin embargo, observamos un fenotipo que no corresponde al modelo de asma, los cobayos NR al alérgeno. Inesperadamente, los cobayos NR mostraron hiperreactividad a la histamina. Aunque la hiperreactividad de las vías aéreas es un rasgo común del asma, esta característica suele variar entre los pacientes, lo que contribuye a la heterogeneidad de la enfermedad <sup>46</sup>. Diversos estudios señalan que alrededor del 57% de los individuos con hiperreactividad no padecen de ningún síntoma respiratorio y se ha observado que los cambios en la estructura de las vías aéreas pueden ocurrir antes del desarrollo de los síntomas de asma <sup>105, 106, 107, 108, 109</sup>. Esta condición ha sido referida como hiperreactividad asintomática <sup>110, 111</sup> y su incidencia está relacionada significativamente a la incidencia de asma <sup>108, 112, 113, 114</sup>. La importancia clínica de la hiperreactividad asintomática sigue siendo un tema de debate. Sin embargo se ha sugerido que puede preceder al desarrollo de asma y que representa una condición de transición de la falta de síntomas al fenotipo asmático independientemente del estado atópico <sup>115, 116</sup>. En este contexto, los cobayos NR al alérgeno que desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas pueden ser un buen modelo para estudiar las características de la hiperreactividad asintomática descrita en humano, así como la variabilidad de la respuesta alérgica.

El fenotipo de un paciente con asma puede ser muy variable. Por ejemplo, algunos pacientes solo desarrollan una respuesta asmática inmediata, mientras que otros

desarrollan ambas respuestas <sup>117, 118, 119</sup>. La variabilidad de la respuesta asmática está asociada a factores genéticos y ambientales <sup>29, 120</sup>. En nuestro modelo, no podemos descartar la influencia de los factores genéticos en la respuesta alérgica que da como resultado el fenotipo de cobayos R y NR. La principal cepa de cobayos de laboratorio utilizada en la actualidad es una cepa exogámica que se originó a partir de los trabajos de Dunkin y Hartley <sup>121</sup> y es la cepa que utilizamos en este estudio. Las únicas cepas endogámicas que se conservan de las 24 cepas originales desarrolladas por Wright <sup>122</sup>, no se encuentran disponibles de manera comercial. Entre los factores ambientales asociados a la variabilidad de la respuesta asmática se encuentran el grado de sensibilización y la exposición al alérgeno <sup>120</sup>. En otros modelos de asma en cobayo las dosis del alérgeno son ajustadas hasta obtener una respuesta bronco-obstruccioniva <sup>104, 123, 124</sup> y para prevenir una reacción anafiláctica fatal, los animales son tratados previamente con anti-histaminérgicos y anti-colinérgicos <sup>125, 126</sup>. En nuestro modelo, la respuesta bronco-obstruccioniva no se controló ajustando la dosis de alérgeno ni utilizando pre-tratamientos. Probablemente, los cobayos NR reflejan la variabilidad biológica cuando los cobayos son retados con solo una dosis de alérgeno.

Las inmunoglobulinas secretadas durante la respuesta alérgica son reguladas de manera similar en el humano y en el cobayo; sin embargo, la principal inmunoglobulina secretada durante la respuesta alérgica en el humano es la IgE mientras que en el cobayo es la IgG1 <sup>82, 127</sup>. En nuestro estudio, encontramos bajos niveles de IgE en los cobayos NR; mientras que los niveles de IgG1 no fueron diferentes entre los cobayos R y NR al alérgeno, lo que confirma que la ausencia de respuesta bronco-obstruccioniva en los cobayos NR no se debe al grado de sensibilización al alérgeno. Aunque se ha observado que ambas inmunoglobulinas contribuyen a la bronco-obstruccion en el cobayo, la respuesta obstruccioniva inducida por IgG1 es mas baja en comparación con la respuesta inducida por IgE <sup>128, 129</sup>. En este contexto, nuestros datos sugieren que la producción de IgE podría favorecer la respuesta bronco-obstruccioniva en los cobayos R, mientras que los niveles de IgG1 podrían estar asociados con el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas en ambos grupos. Perini y Mota <sup>99</sup> describieron que en el cobayo hay una producción preferencial de IgE durante la fase primaria de la respuesta inmune al alérgeno y en el curso del tiempo los niveles de IgE disminuyen, mientras que los niveles de IgG1 se incrementan. Una relación similar en el curso de la producción de anticuerpos IgG1 e IgE también se ha observado en otras especies <sup>130, 131</sup>. En contraste con estas observaciones, en nuestro modelo los niveles de IgG1 se incrementan desde la respuesta inmediata y bajan a las 24 h en el modelo agudo, mientras que en el modelo crónico permanecen elevados. Adicionalmente, la

producción de IgE es inmediata y transitoria. Estos datos nos sugieren que la IgG1 puede ejercer un mecanismo de regulación sobre la síntesis de IgE en nuestro modelo. Algunos estudios señalan que la dosis de alérgeno y el tipo de adyuvante inducen la producción preferencial de anticuerpos. Por ejemplo, el uso de *Bordetella pertussis* o lipopolisacárido como adyuvantes, inducen una mayor producción de IgE que el adyuvante de Freud o el hidróxido de aluminio<sup>132, 133, 134</sup>. Probablemente el esquema de sensibilización utilizado en nuestro modelo induce la persistencia de IgG1 y el incremento transitorio de IgE en el suero de los cobayos.

En el cobayo, la sensibilización con bajas dosis de antígeno (10 µg, i.p.) induce la producción de IgG1 e IgE, mientras que altas dosis (100 µg, i.p.) favorecen la producción de IgG1<sup>99, 128</sup>. En nuestro estudio la dosis de OVA utilizada (60 µg, i.p.) se encuentra dentro de un rango intermedio, lo que nos sugiere que la dosis de sensibilización podría ser responsable del desarrollo de los fenotipos R y NR; sin embargo, se requieren más experimentos para demostrar esta hipótesis. Adicionalmente, se ha descrito que la liberación de agonistas contráctiles del músculo liso es mayor en cobayos sensibilizados con dosis que inducen una respuesta mediada por IgG1 e IgE<sup>128, 135</sup>. Una observación interesante en nuestro estudio fue que los niveles de histamina y tromboxano A<sub>2</sub>, pero no de leucotrienos, podrían estar involucrados en la respuesta asmática inmediata en los cobayos R; mientras que en los cobayos NR, ninguno de estos mediadores se encontraron incrementados en el LBA, lo que sugiere que la ausencia de bronco-obstrucción podría asociarse con la ausencia de mediadores contráctiles en este grupo. Adicionalmente, el tratamiento *in vitro* con OVA indujo contracción solo en las tráqueas de los cobayos R, lo que nos sugiere que los dos fenotipos (R y NR) no se originan por una diferencia en como fue administrado el alérgeno durante los retos *in vivo*. En contraste, la histamina, el análogo estable del tromboxano A<sub>2</sub> (U46619) y el leucotrieno D<sub>4</sub>, indujeron una respuesta contráctil similar en las tráqueas de todos los grupos de cobayos. Estos datos nos sugieren que los receptores para estos mediadores contráctiles son funcionalmente iguales entre los grupos y que otros factores están asociados con la variabilidad de la respuesta bronco-obstruccion en nuestro modelo.

Uno de los hallazgos mas significativos en este estudio fue que los cobayos R y NR al reto crónico con el alérgeno desarrollan fibrosis subepitelial en la misma magnitud, pero los cobayos NR al reto crónico no desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas. La disminución de la función pulmonar comúnmente se ha asociado con el engrosamiento de la pared de las vías aéreas como resultado del proceso de

remodelación<sup>136, 137, 138, 139</sup>. Sin embargo, algunos estudios sugieren que el engrosamiento de la pared de las vías aéreas tiene un efecto protector sobre el acortamiento del músculo liso. En modelos en animales la acumulación de proteínas de matriz extracelular después de la exposición al alérgeno se acompaña de la disminución progresiva de la hiperreactividad<sup>140, 141</sup>. En pacientes asmáticos se ha observado que el engrosamiento de la pared de las vías aéreas no contribuye al desarrollo de hiperreactividad<sup>142, 143</sup>. En nuestro estudio, encontramos niveles similares de fibrosis de las vías aéreas entre los cobayos R y NR; sin embargo, la acumulación de colágena se localiza de manera diferencial en los cobayos. Por ejemplo, en los cobayos R la colágena se acumuló principalmente en la lámina propia y hacia la región adventicia, mientras que en los cobayos NR se acumuló en la región subepitelial infiltrándose hacia el músculo liso. Probablemente, en los cobayos NR la acumulación de colágena en el músculo liso es un mecanismo que obstaculiza su capacidad de contracción, lo que atenúa la hiperreactividad de las vías aéreas. Los cambios en la estructura de las vías aéreas como resultado de un proceso anormal de reparación se han asociado con la inflamación crónica. La inflamación de las vías aéreas generalmente es de predominio eosinofílico, aunque también participan linfocitos T, neutrófilos y células cebadas.

El reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de inflamación es un proceso crítico para el desarrollo de la respuesta alérgica<sup>64</sup>. Algunos trabajos han descrito que la histamina controla el tráfico de leucocitos y la respuesta pro-inflamatoria promoviendo la expresión de moléculas de adhesión celular<sup>144, 145, 146, 147, 148</sup>. Un resultado interesante en nuestro estudio fue que la administración de histamina indujo el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de citocinas. En las muestras obtenidas de manera inmediata, el número de macrófagos y neutrófilos fue mayor que a las 24 horas, mientras que el número de eosinófilos y linfocitos no fue diferente en el tiempo. En cobayos retados con OVA se ha descrito que la histamina regula la distribución de células cebadas y eosinófilos en las vías aéreas<sup>149</sup> y en humanos induce el reclutamiento de neutrófilos<sup>150</sup>. En nuestro modelo, probablemente la histamina ejerce un efecto quimiotáctico en poblaciones celulares específicas. Adicionalmente, se ha descrito que la histamina induce la producción de diversas citocinas y quimiocinas, vía el receptor H<sub>4</sub> expresado en células inflamatorias, epitelio bronquial, músculo liso y células endoteliales<sup>151, 152</sup>. En modelos murinos de asma alérgica se ha descrito que la histamina incrementa la producción de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-6, IL-17 y quimiocinas como CCL2<sup>152, 153, 154</sup>. En nuestro estudio encontramos que la histamina induce el incremento transitorio de IL-4, IL-5, IL-10 y TNF- $\alpha$ , mientras que no tuvo

efecto sobre la producción de IL-17, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ . Probablemente, la diferencia entre los estudios en los patrones de citocinas inducidos por histamina se debe a la concentración de histamina administrada y a la especie utilizada para el estudio. En conjunto, estos datos nos sugieren que la cuantificación de células y sus mediadores debe realizarse a las 24 horas ya que la histamina ha sido degradada y no ejerce un efecto adicional a la respuesta inducida por el alérgeno.

La inflamación crónica es un componente clave de la patología del asma que comúnmente se ha asociado al desarrollo de hiperreactividad y remodelación de las vías aéreas<sup>42, 64</sup>. Recientemente se ha prestado atención en la heterogeneidad celular de la respuesta inflamatoria durante el asma<sup>15</sup>. Wezel y colaboradores describieron dos subtipos inflamatorios en pacientes con asma, el fenotipo eosinofílico y el fenotipo neutrofílico<sup>155</sup>. Adicionalmente, se ha propuesto un tercer subtipo en el que no hay un influjo identificable de células inflamatorias, el fenotipo paucigranulocítico<sup>17, 156</sup>. En nuestro estudio, los cobayos NR no mostraron infiltración de células inflamatorias en el LBA. En pacientes con hiperreactividad asintomática se ha descrito que la infiltración de células inflamatorias es similar a la de pacientes con asma moderada<sup>110</sup>; sin embargo, no se ha encontrado una asociación entre la hiperreactividad asintomática y la infiltración de células inflamatorias<sup>157</sup>. A pesar de la importancia de la hiperreactividad en diversas patologías de las vías aéreas, los mecanismos precisos que inducen su desarrollo no han sido completamente entendidos. Estudios clínicos han sugerido que existe una estrecha relación entre el desarrollo de hiperreactividad bronquial y la presencia de células inflamatorias activadas<sup>6</sup>, mientras que en otros no se ha encontrado esta relación<sup>158, 159</sup>. En modelos murinos, el papel de las células inflamatorias en la contribución de la hiperreactividad ha sido controversial<sup>160, 161, 162, 163, 164</sup>. Nuestros resultados sugieren que en el cobayo la hiperreactividad de las vías aéreas puede ocurrir en ausencia de células inflamatorias. Probablemente, no existe un mecanismo único que induzca la hiperreactividad de las vías aéreas, o existen diferentes mecanismos en diferentes fenotipos de asma. Por ello, es importante el hallazgo de una ruta común, a través de la cual estos mecanismos participan en el desarrollo de hiperreactividad, que pueda ser identificada por una prueba clínica simple para facilitar el diagnóstico y monitorear el control de la enfermedad.

El asma es considerada como una enfermedad eosinofílica y comúnmente hay una infiltración de neutrófilos durante la fase inmediata de la respuesta asmática<sup>6, 42</sup>. En los cobayos R observamos una importante infiltración de eosinófilos después del reto con el alérgeno que permaneció a las 24 horas y un incremento transitorio de neutrófilos.

CCL11, IL-5 y los leucotrienos podrían ser los mediadores responsables de la quimiotaxis de eosinófilos en los cobayos R. En contraste, los cobayos NR no mostraron infiltración de eosinófilos y a las 24 horas se observó un incremento en el número de neutrófilos. Probablemente, en los cobayos NR existe un reclutamiento tardío de neutrófilos que podría inducir la hiperreactividad de las vías aéreas. La infiltración de neutrófilos durante el asma contribuye a la hipersecreción de moco, la hiperreactividad y la remodelación de las vías aéreas <sup>165, 166</sup>. IL-17 es una citocina especialmente importante para el reclutamiento de neutrófilos <sup>167</sup> y es expresada en biopsias bronquiales, LBA y esputo de pacientes con asma <sup>168, 169</sup>. En modelos murinos también se ha descrito que la sobreexpresión de IL-17 induce la producción de quimiocinas que reclutan neutrófilos <sup>170, 171</sup>. En nuestro estudio encontramos que en ambos grupos de cobayos, R y NR, hay un incremento en el número de células productoras de IL-17 en el LBA; sin embargo, la población de linfocitos productores de IL-17 se incrementó únicamente en los cobayos R, lo que sugiere que la principal fuente de IL-17 en los cobayos NR son los neutrófilos. Adicionalmente, los niveles de IL-17 solo se encontraron elevados en los cobayos hiperreactores, R y NR del modelo agudo y R del modelo crónico. Estas observaciones sugieren que IL-17 está asociada al desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas en el cobayo. Los neutrófilos contribuyen al proceso de remodelación mediante la secreción de metaloproteinasas, enzimas que causan la remodelación y degradación de la matriz extracelular <sup>139</sup>, es probable que en nuestro modelo los neutrófilos infiltrados en las vías aéreas durante la fase aguda favorezcan la hiperreactividad de las vías aéreas, mientras que en la fase crónica inducen el proceso de remodelación. Algunos estudios han demostrado que IL-17 puede reclutar indirectamente neutrófilos hacia las vías aéreas al inducir la secreción de la quimiocina CXCL8 (IL-8) <sup>172, 173</sup>. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo también han descrito que la principal fuente de CXCL8 es el epitelio y el músculo liso en las vías aéreas de los cobayos R y NR <sup>174</sup>. En conjunto, estos datos nos sugieren que durante el asma el fenotipo inflamatorio puede ser variable y diversos mecanismos pueden conducir a la hiperreactividad de las aéreas.

La acumulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, con un fenotipo Th2, tiene un papel importante en el inicio y mantenimiento de la inflamación <sup>42, 64</sup>. Los linfocitos Th2 ejercen sus efectos a través de diversas citocinas <sup>41, 42</sup>. Recientemente, se ha descrito un linaje distinto de células pro-inflamatorias que participan durante la inflamación alérgica en el asma, los linfocitos Th17 <sup>175</sup>. En nuestro estudio encontramos que la respuesta inflamatoria en los cobayos R se asoció con un perfil Th2 y Th17. En modelos murinos, los protocolos de sensibilización han mostrado discrepancias en la naturaleza de la respuesta

inflamatoria resultante. Los protocolos de sensibilización intraperitoneal con OVA polarizan la respuesta inflamatoria hacia Th2 y eosinofilia, mientras que la sensibilización intranasal conduce a una respuesta Th17 y neutrofilia <sup>176, 177</sup>. Nuestros datos sugieren que en el cobayo, la sensibilización intraperitoneal y el reto con aerosoles de OVA induce ambos perfiles inflamatorios. Adicionalmente, los cobayos NR no mostraron cambios en la respuesta mediada por linfocitos Th2 y Th17. Algunos estudios han descrito que la secreción de IFN- $\gamma$  por linfocitos Th1 puede inducir inflamación de las vías aéreas <sup>178, 179, 180</sup> y en pacientes asmáticos el IFN- $\gamma$  producido durante una infección viral induce hiperreactividad de las vías aéreas <sup>181</sup>. Probablemente, las diferencias entre los modelos de asma y entre los pacientes con asma reflejen el impacto del microambiente pulmonar sobre el desarrollo de la respuesta inmune.

La inflamación crónica es un componente clave en la fisiopatología del asma. Los datos obtenidos en este estudio nos sugieren que los cobayos R desarrollan una respuesta inflamatoria inducida por el alérgeno típica del asma. A través de la secreción de citocinas del perfil Th2, principalmente, pero también otras como TNF- $\alpha$  e IL-17A. Los linfocitos T pueden inducir hiperreactividad y originar los cambios en la estructura de las vías aéreas <sup>164, 182</sup>. Probablemente en los cobayos R, IL-4 promueve la síntesis de IgE específica para OVA e IL-5 recluta eosinófilos desde etapas tempranas de la respuesta inflamatoria contribuyendo al desarrollo de hiperreactividad. Adicionalmente IL-13 puede estar involucrada con el proceso de remodelación ya que induce la hipersecreción de moco y la activación de miofibroblastos. Sorprendentemente, estas características de la respuesta inflamatoria no se asociaron con el desarrollo de hiperreactividad en los cobayos NR del modelo agudo y de remodelación en los cobayos NR del modelo crónico. El papel de la inflamación en el desarrollo de los síntomas de asma y en los cambios resultantes en la estructura de las vías aéreas ha sido bien establecido <sup>51, 52</sup>. En pacientes con hiperreactividad asintomática el papel de la inflamación ha sido controversial <sup>105, 110, 183</sup>. Por ejemplo, Power y colaboradores <sup>184</sup> no encontraron evidencia de inflamación de las vías aéreas mediada por linfocitos T; sin embargo, algunos pacientes desarrollan un incremento progresivo de la hiperreactividad y síntomas de asma. En otros estudios se ha sugerido que existe una relación muy cercana entre la hiperreactividad asintomática, la inflamación, la remodelación de las vías aéreas y el asma <sup>105</sup>. En estos trabajos, la inflamación de las vías aéreas comúnmente se ha asociado con la infiltración de células inflamatorias y no con mediadores inflamatorios. Los pocos estudios en donde se evalúa la expresión de citocinas sugieren que en pacientes asintomáticos hay una

menor producción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-8 y TNF- $\alpha$  en comparación con pacientes con asma o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) <sup>185, 186</sup>. Los datos obtenidos en nuestro estudio nos sugieren que los eventos involucrados en el desarrollo de la hiperreactividad y la fibrosis subepitelial no se asocian con la secreción de los mediadores inflamatorios clásicos de la respuesta alérgica. Probablemente, no existe una progresión lineal entre la exposición inicial al alérgeno que conduce a la inflamación y que a su vez conduce a la hiperreactividad y a la remodelación. Alternativamente, la exposición inicial al alérgeno podría conducir independientemente al desarrollo de hiperreactividad y remodelación de las vías aéreas.

Estudios en modelos animales han descrito que las citocinas pueden tener un papel pleiotrópico en la respuesta alérgica. Particularmente, TGF- $\beta$ 1 tiene múltiples efectos sobre la fisiopatología del asma. Clásicamente, TGF- $\beta$ 1 es un mediador anti-inflamatorio que induce la generación de células Treg <sup>187, 188</sup> y durante el proceso de remodelación es el principal factor pro-fibrótico <sup>189, 190</sup>. El papel de TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo de hiperreactividad de las vías ha sido menos definido. Algunos estudios sugieren que TGF- $\beta$ 1 puede atenuar la hiperreactividad de las vías aéreas <sup>191, 192, 193, 194</sup>, mientras que en otros se ha descrito que incrementa la reactividad de las vías aéreas al inducir la expresión de agonistas que causan la contracción del músculo liso <sup>195, 196</sup>. Adicionalmente, la expresión de TGF- $\beta$ 1 se ha correlacionado con el engrosamiento de la pared de las vías aéreas <sup>197, 198, 199</sup>. En modelos murinos la neutralización de TGF- $\beta$ 1 o la deficiencia de Smads, proteínas importantes en la señalización de TGF- $\beta$ 1, reducen la remodelación de las vías aéreas inducida por OVA <sup>193, 200, 201</sup>. En nuestro modelo de asma crónica, los niveles de TGF- $\beta$ 1 en el LBA fueron similares entre los cobayos independientemente de su respuesta bronco-obstructiva lo que sugiere su participación en el desarrollo de fibrosis de las vías aéreas; sin embargo, TGF- $\beta$ 1 no se relacionó con el desarrollo de hiperreactividad en los cobayos NR. En las vías aéreas TGF- $\beta$ 1 es secretado tanto por células estructurales como por células inflamatorias reclutadas, particularmente macrófagos, eosinófilos y linfocitos T <sup>202, 203</sup>. Además de participar en la inducción de linfocitos Treg, TGF- $\beta$ 1 está asociado con la inducción de linfocitos Th17 <sup>204</sup>. Probablemente el papel de TGF- $\beta$ 1 en la fisiopatología del asma podría ser dependiente de la fuente celular y del microambiente en las vías aéreas. En nuestro estudio, encontramos que TGF- $\beta$ 1 es secretado por linfocitos reguladores Th3 en los cobayos NR, lo que sugiere su participación en la supresión de inflamación de las vías aéreas. Adicional a TGF- $\beta$ 1, IL-10 es una citocina

reguladora que ha sido propuesta para el tratamiento del asma debido a sus propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias<sup>205, 206</sup>. Sin embargo, se ha descrito que IL-10 puede promover el desarrollo de hiperreactividad<sup>207</sup>. En individuos sanos los linfocitos Tr1 representan el subtipo dominante de linfocitos específicos de alérgenos y se ha sugerido que el balance entre linfocitos Tr1 y Th2 es decisivo en el desarrollo de asma alérgica<sup>73, 208</sup>. Una observación interesante en nuestro estudio fue que la población de linfocitos reguladores Tr1 se incrementa principalmente en los cobayos NR del modelo agudo, mientras que la población Th3 se incrementa tanto en el modelo agudo como en el modelo crónico. Probablemente, ambas poblaciones están asociadas con la supresión de la respuesta inflamatoria en los cobayos NR y las citocinas IL-10 y TGF- $\beta$ 1 producidas por estos linfocitos también podrían asociarse con el desarrollo de hiperreactividad y fibrosis subepitelial, respectivamente.

Aunque el asma tiene un origen multifactorial se cree que el proceso inflamatorio es el resultado de respuestas inmunitarias inapropiadas a alérgenos comunes en individuos susceptibles<sup>22</sup>. En este contexto, los linfocitos Treg juegan un papel fundamental en el establecimiento de la tolerancia y en la supresión de respuestas inmunes exacerbadas inducidas por alérgenos<sup>209, 210, 211</sup>. Las mutaciones en el gen de *Foxp3* conducen a la ausencia de linfocitos Treg y causan un desorden autoinmune tanto en humanos como en ratones. Interesantemente, la desregulación de la respuesta inmune en estas patologías está asociada con el incremento en asma y alergias<sup>212</sup> lo que sugiere que los linfocitos Treg *Foxp3*<sup>+</sup> son indispensables en el control de la respuesta alérgica. En nuestro estudio el incremento en la población de linfocitos Treg *Foxp3*<sup>+</sup> podría estar asociado con la supresión de la respuesta inflamatoria Th2 y la eosinofilia en los cobayos NR. En un modelo murino de asma alérgica recientemente se describió que los linfocitos Treg *Foxp3*<sup>+</sup> inhiben la degranulación de células cebadas a través de mecanismos dependientes de contacto celular<sup>213</sup>. Estas observaciones nos sugieren que en los cobayos NR, los linfocitos Treg *Foxp3*<sup>+</sup> podrían modular directamente la fase aguda de la respuesta alérgica afectando la liberación de mediadores, como histamina y tromboxano A<sub>2</sub>, evitando la contracción del músculo liso y en consecuencia, la manifestación de la bronco-obstrucción en respuesta a OVA inhalada. Nuestros datos nos sugieren una correlación inversa entre la actividad de las células Treg *Foxp3*<sup>+</sup> y las manifestaciones de la enfermedad alérgica, como previamente se ha descrito para enfermedades autoinmunes<sup>214</sup>.

Los linfocitos Treg pueden modular la respuesta alérgica en diferentes estadios. En modelos murinos los linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> afectan la producción de IgE, la

respuesta alérgica mediada por linfocitos Th2 y la eosinofilia, pero no suprimen la hiperreactividad de las vías aéreas<sup>215, 216, 217</sup>. En estos estudios los linfocitos Treg se caracterizaron solo por la expresión de CD25 y en algunos se utilizaron sistemas de TCR transgénicos. Por lo tanto, en estas observaciones no puede excluirse la participación de linfocitos Tr1 y Th3. En contraste, en otros estudios se ha descrito que los linfocitos Treg son capaces de inhibir la hiperreactividad de las vías aéreas<sup>68, 218</sup> y la población de linfocitos Tregs Foxp3<sup>+</sup>, en particular, puede atenuar la hiperreactividad de las vías aéreas<sup>219, 220, 221</sup>. Probablemente, los linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup> participan en la supresión de la producción de IgE por células B y disminuyen las citocinas Th2 inhibiendo indirectamente las funciones efectoras de células cebadas y basófilos sobre la respuesta bronco-obstruiva en los cobayos NR. Recientemente se describió en un modelo murino que la administración profiláctica de linfocitos Treg inhibe el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas<sup>222</sup> mientras que la transferencia terapéutica de estas células no revierte la hiperreactividad a pesar de suprimir la eosinofilia y la producción de IL-13<sup>66</sup>. Probablemente, en los cobayos NR del modelo crónico la diferenciación de linfocitos Treg es un evento que ocurre de manera temprana, antes del establecimiento de la hiperreactividad de las vías aéreas. Mientras que en los cobayos NR del modelo agudo, la diferenciación de linfocitos Treg es un evento posterior al establecimiento de la hiperreactividad. En conjunto nuestros datos sugieren que los linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup> son capaces de prevenir la respuesta inflamatoria y mantener la homeostasis inmunológica pulmonar en los cobayos NR, pero no son suficientes para prevenir la hiperreactividad a histamina ni el desarrollo de fibrosis subepitelial en respuesta a OVA inhalada.

## 9. CONCLUSIONES

La respuesta alérgica inmediata en el cobayo probablemente esta asociada a la liberación de histamina y tromboxano  $A_2$  inducida por IgE, mientras que la hiperreactividad de las vías aéreas puede presentarse independientemente de respuesta bronco-obstructiva e inflamatoria. Adicionalmente, la fibrosis subepitelial no contribuye al desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas.

A pesar de que los linfocitos Treg podrían disminuir la progresión hacia la inflamación a través de células efectoras y sus mediadores, no son capaces de prevenir la hiperreactividad a la histamina en el modelo agudo ni el desarrollo de fibrosis subepitelial en el modelo crónico en respuesta a OVA inhalada.

Los linfocitos Treg pueden tener un papel importante en la supresión de la respuesta bronco-obstructiva y probablemente los linfocitos Treg que producen TGF- $\beta$ 1 están involucrados en atenuar la hiperreactividad de las vías aéreas induciendo un fenotipo fibrótico que evita la contracción del músculo liso.

El modelo de cobayos NR al alérgeno que desarrollan hiperreactividad en ausencia de respuesta inflamatoria puede representar una importante herramienta para comprender los mecanismos que inducen la hiperreactividad de las vías aéreas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Geneser F. *Histología. Sobre bases moleculares*, 3 edn. Ed. Médica Panamericana: Madrid, España, 2000.
2. West JB. *Fisiología Respiratoria*, 7 edn. Médica Panamericana: Argentina, 2005.
3. Fishman AP, Elias JA. *Functional design of the human lung for gas change*, 4 edn. Mc Graw Hill: New York, 2008.
4. Jaramillo F. Estructura del aparato respiratorio. *Neumología*. Mc Graw Hill: Colombia, 2000.
5. Global Initiative for Asthma (GINA) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2012 [cited]Available from: <http://www.ginasthma.org>
6. Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. How Much Do We Know about Atopic Asthma: Where Are We Now? *Cellular and Molecular Immunology* 2006, **3**(5): 321-332.
7. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* 2010, **11**(7): 577-584.
8. Shin YS, Takeda K, Gelfand EW. Understanding asthma using animal models. *Allergy, asthma & immunology research* 2009, **1**(1): 10-18.
9. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **161**(5): 1720-1745.
10. Des JT, Balderrama EF. *Enfermedades respiratorias, manifestaciones clínicas*. El manual moderno, 1993.
11. Salud OMDI. [cited 28 de noviembre, 2012]Available from: <http://www.who.int/respiratory/asthma/es>
12. Becerra MHV. Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax* 2009, **68**(S2): S91-S97.
13. Asthma GBo. [cited 29 Marzo, 2013]Available from: <http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINABurdenReport>
14. Informe anual de labores INER, 2001. 2011 [cited]Available from: [http://www.iner.gob.mx/archivos/informe\\_labores/2011.pdf](http://www.iner.gob.mx/archivos/informe_labores/2011.pdf)
15. King CS, Moores LK. Clinical asthma syndromes and important asthma mimics. *Respiratory care* 2008, **53**(5): 568-580; discussion 580-562.
16. Hesselmar B, Enelund AC, Eriksson B, Padyukov L, Hanson LA, Aberg N. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. *Journal of allergy* 2012, **2012**: 163089.

17. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006, **368**(9537): 804-813.
18. Graham LM. Classifying asthma. *Chest* 2006, **130**(1 Suppl): 13S-20S.
19. Hernández JS, Vega MF, Almeida AV. Clasificación del asma. *Neumología y cirugía de tórax* 2009, **68**(S2): S143-S148.
20. Becerra MHV. Patogenia del asma. *Asma. Enfoque integral para Latinoamérica*. McGraw-Hill Interamericana: México, 2005.
21. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, *et al.* The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunology Today* 1999, **20**(11): 528-533.
22. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European journal of immunology* 2010, **40**(5): 1232-1240.
23. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008, **454**(7203): 445-454.
24. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology letters* 2007, **113**(1): 6-18.
25. Behera D. *Bronchial Asthma*, 2 edn. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd: New Delhi, India, 2005.
26. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science* 2012, **337**(6093): 431-435.
27. Kashiwakura JC, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, *et al.* Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(1): 218-228.
28. Fernandes DJ, Mitchell RW, Lakser O, Dowell M, Stewart AG, Solway J. Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? *Journal of applied physiology* 2003, **95**(2): 844-853.
29. Puebla MJA. Determinants of Allergen-Induced Late Bronchial Responses in Mild Asthmatics. *Chest* 2001.
30. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, *et al.* Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and experimental immunology* 2001, **125**(2): 177-183.
31. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 2002, **94**(3): 185-211.
32. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation research* 2010, **690**(1-2): 24-39.

33. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology: Principles and Practice*, 3 edn. Mosby Elsevier, 1991.
34. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, *et al.* Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003, **123**(3 Suppl): 417S-422S.
35. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(11): 3546-3556.
36. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999, **54**(9): 825-857.
37. Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **161**(3 Pt 2): S176-181.
38. Pease JE. Asthma, allergy and chemokines. *Current drug targets* 2006, **7**(1): 3-12.
39. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2005, **5**(2): 161-166.
40. Kips JC. Cytokines in asthma. *The European respiratory journal Supplement* 2001, **34**: 24s-33s.
41. Finiasz M, Otero C, Bezrodnik L, Fink S. The role of cytokines in atopic asthma. *Current medicinal chemistry* 2011, **18**(10): 1476-1487.
42. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews* 2011, **242**(1): 31-50.
43. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010, **138**(2 Suppl): 4S-10S.
44. Postma DS, Kerstjens HA. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **158**(5 Pt 3): S187-192.
45. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest* 2003, **123**(3 Suppl): 411S-416S.
46. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006, **118**(3): 551-559; quiz 560-551.
47. Becerra MHV. Fisiopatología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax* 2009, **68**(S2): S111-S115.
48. Cockcroft DW. Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010, **138**(2 Suppl): 18S-24S.
49. Burgel PR, de Blic J, Chanez P, Delacourt C, Devillier P, Didier A, *et al.* Update on the roles of distal airways in asthma. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2009, **18**(112): 80-95.

50. Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2007, **56**(4): 321-329.
51. Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2007, **29**(2): 379-389.
52. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008, **121**(3): 560-570; quiz 571-562.
53. Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Current opinion in immunology* 2003, **15**(6): 690-696.
54. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunological reviews* 2005, **204**: 195-207.
55. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews* 2001, **182**: 18-32.
56. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009, **30**(5): 626-635.
57. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological reviews* 2011, **241**(1): 260-268.
58. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009, **30**(5): 636-645.
59. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(8): 1757-1764.
60. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *Journal of immunology* 2004, **173**(12): 7259-7268.
61. Wong J, Obst R, Correia-Neves M, Losyev G, Mathis D, Benoist C. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *Journal of immunology* 2007, **178**(11): 7032-7041.
62. Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, *et al.* A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 2011, **35**(1): 109-122.
63. Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology* 2008, **125**(4): 450-458.
64. Agrawal DK. Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation. 2010.

65. Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(2): 142-152.
66. Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008, **122**(3): 617-624 e616.
67. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(11): 1459-1463.
68. Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *Journal of immunology* 2007, **178**(3): 1433-1442.
69. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006, **117**(4): 433-442.
70. Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A, Yagi T. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2008, **38**(5): 812-821.
71. van Oosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2005, **26**(5): 918-932.
72. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001, **2**(8): 725-731.
73. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, *et al.* Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(11): 1567-1575.
74. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008, **63**(11): 1455-1463.
75. Jaffar Z, Ferrini ME, Girtsman TA, Roberts K. Antigen-specific Treg regulate Th17-mediated lung neutrophilic inflammation, B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. *European journal of immunology* 2009, **39**(12): 3307-3314.
76. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1994, **7**(3): 555-568.
77. Wegmann M. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets. *Journal of occupational medicine and toxicology* 2008, **3 Suppl 1**: S4.

78. Wegmann M, Renz H. Animal models of experimental asthma. *Ernst Schering Research Foundation workshop* 2005(50): 69-87.
79. Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *International archives of allergy and immunology* 2004, **133**(1): 84-100.
80. Wills-Karp M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology* 2000, **48**(3): 263-268.
81. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, *et al.* Murine models of asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2003, **22**(2): 374-382.
82. Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma. *Current drug targets* 2008, **9**(6): 452-465.
83. Pretolani M, Vargaftig BB. Role of eosinophil mobilization and activation in experimental airway inflammation and bronchopulmonary hyperreactivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996, **796**: 72-81.
84. Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Vargas MH, Martinez-Cordero E, Ramos-Ramirez P, Alvarez-Santos M, *et al.* Beta1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009, **39**(5): 740-751.
85. Moreno-Alvarez P, Sanchez-Guerrero E, Martinez-Cordero E, Hernandez-Pando R, Campos MG, Cetina L, *et al.* Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung* 2010, **188**(2): 97-105.
86. Lawrence TE, Millecchia LL, Frazer DG, Fedan JS. Pulmonary dendritic cell distribution and prevalence in guinea pig airways: effect of ovalbumin sensitization and challenge. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997, **282**(2): 995-1004.
87. Arts JH, Mommers C, de Heer C. Dose-response relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy. *Critical reviews in toxicology* 2006, **36**(3): 219-251.
88. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**(1): L32-42.
89. Burdon JG, Juniper EF, Killian KJ, Hargreave FE, Campbell EJ. The perception of breathlessness in asthma. *The American review of respiratory disease* 1982, **126**(5): 825-828.
90. Ottanelli R, Rosi E, Romagnoli I, Ronchi MC, Lanini B, Grazzini M, *et al.* Perception of bronchoconstriction and bronchial hyper-responsiveness in asthma. *Clinical science* 2000, **98**(6): 681-687.
91. Roisman GL, Peiffer C, Lacronique JG, Le Cae A, Dusser DJ. Perception of bronchial obstruction in asthmatic patients. Relationship with bronchial

eosinophilic inflammation and epithelial damage and effect of corticosteroid treatment. *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(1): 12-21.

92. Veen JC, Smits HH, Ravensberg AJ, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Impaired perception of dyspnea in patients with severe asthma. Relation to sputum eosinophils. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **158**(4): 1134-1141.
93. Barbaro MP, Lacedonia D, Palladino GP, Bergantino L, Ruggeri C, Martinelli D, *et al.* Dyspnea perception in asthma: role of airways inflammation, age and emotional status. *Respiratory medicine* 2011, **105**(2): 195-203.
94. Campos MG, Toxqui E, Tortoriello J, Oropeza MV, Ponce H, Vargas MH, *et al.* Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD(4)-induced contraction in guinea pig airways. *Journal of ethnopharmacology* 2001, **74**(1): 7-15.
95. Bazan-Perkins B, Vargas MH, Sanchez-Guerrero E, Chavez J, Montano LM. Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental physiology* 2004, **89**(5): 623-628.
96. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **156**(3 Pt 1): 766-775.
97. Sommer B, Vargas MH, Chavez J, Carbajal V, Segura P, Montano LM. Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O(3)-induced hyperresponsiveness. *Journal of applied physiology* 2001, **91**(6): 2595-2601.
98. Zamora R, Barclay D, Vodovotz Y. Diferencias en la activación del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) por el ácido y el calor. *Revista Médica* 2007, **15**(2): 177-179.
99. Perini A, Mota I. The production of IgE and IgG1 antibodies in guinea-pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology* 1973, **25**(2): 297-305.
100. van Amsterdam RG, Brouwer F, Zaagsma J. Analysis of the beta-adrenoceptor mediated inhibition of IgG1 and IgE dependent guinea-pig anaphylactic tracheal smooth muscle contraction. *Agents and actions* 1989, **26**(1-2): 48-51.
101. Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 2004, **53**(4): 321-329.
102. Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, *et al.* Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *Journal of immunological methods* 2006, **311**(1-2): 47-56.
103. Picado C. Early and late-phase asthmatic reactions: a hypothesis. *Allergy* 1992, **47**(4 Pt 1): 331-333.

104. Smith N, Broadley KJ. Optimisation of the sensitisation conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *International immunopharmacology* 2007, **7**(2): 183-190.
105. Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1999, **14**(1): 63-73.
106. Zhong NS, Chen RC, Yang MO, Wu ZY, Zheng JP, Li YF. Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? A two-year follow-up of young students with bronchial hyperresponsiveness. *Chest* 1992, **102**(4): 1104-1109.
107. Kolnaar BG, Folgering H, van den Hoogen HJ, van Weel C. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in adolescents and young adults. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1997, **10**(1): 44-50.
108. Laprise C, Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a three-year follow-up. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **156**(2 Pt 1): 403-409.
109. Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Greene JM, Herbison GP, *et al.* Outcome in adulthood of asymptomatic airway hyperresponsiveness in childhood: a longitudinal population study. *Pediatric pulmonology* 2002, **34**(3): 164-171.
110. Boulet LP, Prince P, Turcotte H, Lemiere C, Olivenstein R, Laprise C, *et al.* Clinical features and airway inflammation in mild asthma versus asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Respiratory medicine* 2006, **100**(2): 292-299.
111. van den Nieuwenhof L, Schermer T, Heijdra Y, Bottema B, Akkermans R, Folgering H, *et al.* Are asymptomatic airway hyperresponsiveness and allergy risk factors for asthma? A longitudinal study. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2008, **32**(1): 70-76.
112. Boutet K, Malo JL, Ghezzi H, Gautrin D. Airway hyperresponsiveness and risk of chest symptoms in an occupational model. *Thorax* 2007, **62**(3): 260-264.
113. Gerritsen J. Follow-up studies of asthma from childhood to adulthood. *Paediatric respiratory reviews* 2002, **3**(3): 184-192.
114. Scichilone N, Messina M, Battaglia S, Catalano F, Bellia V. Airway hyperresponsiveness in the elderly: prevalence and clinical implications. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2005, **25**(2): 364-375.
115. Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: what does it mean? *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2008, **32**(4): 1118-1119.

116. Sohn SW, Chang YS, Lee HS, Chung DH, Lee CT, Kim YH, *et al.* Atopy may be an important determinant of subepithelial fibrosis in subjects with asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Journal of Korean medical science* 2008, **23**(3): 390-396.
117. Beier J, Beeh KM, Semmler D, Buhl R. Sputum levels of reduced glutathione increase 24 hours after allergen challenge in isolated early, but not dual asthmatic responders. *International archives of allergy and immunology* 2004, **135**(1): 30-35.
118. Ihre E, Axelsson IG, Zetterstrom O. Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen. *Clinical allergy* 1988, **18**(6): 557-567.
119. Custovic A, Murray CS. The effect of allergen exposure in early childhood on the development of atopy. *Current allergy and asthma reports* 2002, **2**(5): 417-423.
120. Holgate ST, Church MK, Howarth PH, Morton EN, Frew AJ, Djukanovic R. Genetic and environmental influences on airway inflammation in asthma. *International archives of allergy and immunology* 1995, **107**(1-3): 29-33.
121. Dunkin GW, Hartley P, Lewis E, Russel T. A comparative biometric study of albino and coloured guinea-pigs from the point of view of the suitability for experimental use. *Journal of hygiene* 1930, **30**(3): 311-330.
122. Shevach EM. The Guinea Pig I-Region. A Functional Analysis of Ia-Ir Associations. *Springer Seminars in Immunopathol* 1978, **1**(1): 207-234.
123. 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. *Journal of applied physiology* 2006, **100**(5): 1610-1616.
124. Pare PD, Michoud MC, Boucher RC, Hogg JC. Pulmonary effects of acute and chronic antigen exposure of immunized guinea pigs. *Journal of applied physiology* 1979, **46**(2): 346-353.
125. 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. *Japanese journal of pharmacology* 1997, **75**(1): 65-75.
126. 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. *The Journal of experimental medicine* 1997, **186**(4): 601-612.
127. Watson JW, Conklyn M, Showell HJ. IgG1-mediated acute pulmonary hypersensitivity response in the guinea pig. Involvement of specific lipid mediators. *The American review of respiratory disease* 1990, **142**(5): 1093-1098.
128. Andersson P. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. Pattern of response in relation to immunization regimen. *Allergy* 1980, **35**(1): 65-71.

129. Arimura A, Asanuma F, Kurosawa A, Harada M. Contribution of thromboxane A<sub>2</sub> to the antigen-induced immediate asthmatic response mediated by IgG1 antibody by augmentation of bronchial responsiveness in guinea-pigs. *British journal of pharmacology* 1994, **111**(1): 339-345.
130. Mota I, Peixoto JM. A skin-sensitizing and thermolabile antibody in the mouse. *Life sciences* 1966, **5**(18): 1723-1728.
131. Kravis TC, Zvaifler NJ. Characterization of a rabbit homocytotropic antibody responsible for passive cutaneous anaphylactic reactions with a short (4-hour) latent period. *International archives of allergy and applied immunology* 1974, **46**(1): 60-71.
132. Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life sciences Pt 2: Biochemistry, general and molecular biology* 1970, **9**(16): 923-930.
133. Levine Bernard B CHaVNM. The Production of Hapten-Specific Reaginic Antibodies in the Guinea Pig. *The Journal of Immunology* 1971, **106**: 29-33.
134. Perini A, Mota I. Heterogeneity of guinea-pig homocytotropic antibodies. *Immunology* 1972, **22**(5): 915-923.
135. Andersson P, Bergstrand H. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs: effect of long-term treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. *British journal of pharmacology* 1981, **74**(3): 601-609.
136. Tomkowicz A, Kraus-Filarska M, Bar J, Rabczynski J, Jelen M, Piesiak P, *et al.* Bronchial hyper-responsiveness, subepithelial fibrosis, and transforming growth factor-beta(1) expression in patients with long-standing and recently diagnosed asthma. *Archivum immunologiae et therapiiae experimentalis* 2008, **56**(6): 401-408.
137. Delacourt C, Benoist MR, Le Bourgeois M, Waernessyckle S, Rufin P, Brouard JJ, *et al.* Relationship between bronchial hyperresponsiveness and impaired lung function after infantile asthma. *PloS one* 2007, **2**(11): e1180.
138. Boulet L, Belanger M, Carrier G. Airway responsiveness and bronchial-wall thickness in asthma with or without fixed airflow obstruction. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995, **152**(3): 865-871.
139. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011, **128**(3): 451-462; quiz 463-454.
140. Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **161**(2 Pt 1): 627-635.
141. Vanacker NJ, Palmans E, Pauwels RA, Kips JC. Fluticasone inhibits the progression of allergen-induced structural airway changes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2002, **32**(6): 914-920.
142. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma.

- American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, **168**(8): 983-988.
143. Kermodé JA, Brown NJ, Hardaker KM, Farah CS, Berend N, King GG, *et al.* The effect of airway remodelling on airway hyper-responsiveness in asthma. *Respiratory medicine* 2011, **105**(12): 1798-1804.
  144. O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, *et al.* Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. *Journal of receptor and signal transduction research* 2002, **22**(1-4): 431-448.
  145. Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. *British journal of pharmacology* 2003, **140**(6): 1117-1127.
  146. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, *et al.* Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British journal of pharmacology* 2004, **142**(1): 161-171.
  147. Barnard R, Barnard A, Salmon G, Liu W, Sreckovic S. Histamine-induced actin polymerization in human eosinophils: an imaging approach for histamine H4 receptor. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2008, **73**(4): 299-304.
  148. Zampeli E, Tiligada E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *British journal of pharmacology* 2009, **157**(1): 24-33.
  149. Yu S, Stahl E, Li Q, Ouyang A. Antigen inhalation induces mast cells and eosinophils infiltration in the guinea pig esophageal epithelium involving histamine-mediated pathway. *Life sciences* 2008, **82**(5-6): 324-330.
  150. Sun WY, Abeynaïke LD, Escarbe S, Smith CD, Pitson SM, Hickey MJ, *et al.* Rapid histamine-induced neutrophil recruitment is sphingosine kinase-1 dependent. *The American journal of pathology* 2012, **180**(4): 1740-1750.
  151. Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB. Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002, **303**(1): 300-307.
  152. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *Journal of immunology* 2006, **176**(11): 7062-7070.
  153. Morgan RK, McAllister B, Cross L, Green DS, Kornfeld H, Center DM, *et al.* Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *Journal of immunology* 2007, **178**(12): 8081-8089.
  154. Dijkstra D, Leurs R, Chazot P, Shenton FC, Stark H, Werfel T, *et al.* Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H4 receptor. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007, **120**(2): 300-307.

155. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, *et al.* Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999, **160**(3): 1001-1008.
156. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006, **11**(1): 54-61.
157. Nomura N, Yoshikawa T, Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, Fujimoto S. Induced sputum analysis in asymptomatic young adults with bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Respirology* 2007, **12**(4): 516-522.
158. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **157**(1): 4-9.
159. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, *et al.* Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000, **356**(9248): 2144-2148.
160. Wilder JA, Collie DD, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR, Lipscomb MF. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1999, **20**(6): 1326-1334.
161. Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Larsen GL, Gleich G, Lee J, *et al.* Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **155**(3): 819-825.
162. Nagai H, Yamaguchi S, Maeda Y, Tanaka H. Role of mast cells, eosinophils and IL-5 in the development of airway hyperresponsiveness in sensitized mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1996, **26**(6): 642-647.
163. Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, *et al.* Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *The Journal of experimental medicine* 1996, **183**(1): 109-117.
164. Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(3 Pt 1): 721-730.
165. Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, *et al.* Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001, **108**(5): 753-758.

166. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999, **160**(5 Pt 1): 1532-1539.
167. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004, **21**(4): 467-476.
168. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001, **108**(3): 430-438.
169. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory medicine* 2003, **97**(6): 726-733.
170. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, *et al.* Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003, **28**(1): 42-50.
171. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005, **6**(11): 1133-1141.
172. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, *et al.* Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of immunology* 1999, **162**(4): 2347-2352.
173. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001, **119**(5): 1329-1336.
174. Téllez Jiménez Olivia. Detección de quimiocinas y su relación con el infiltrado celular en cobayos expuestos a ovoalbúmina. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2012.
175. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, *et al.* IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respiratory research* 2006, **7**: 135.
176. Kung TT, Jones H, Adams GK, 3rd, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, *et al.* Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *International archives of allergy and immunology* 1994, **105**(1): 83-90.
177. Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009, **180**(8): 720-730.
178. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *The Journal of clinical investigation* 1999, **103**(2): 175-183.

179. Tryuen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, *et al.* Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 2006, **61**(3): 202-208.
180. Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS, Thakker P, Pelker JW, Declercq C, *et al.* TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005, **115**(2): 309-315.
181. Schneider D, Hong JY, Popova AP, Bowman ER, Linn MJ, McLean AM, *et al.* Neonatal rhinovirus infection induces mucous metaplasia and airways hyperresponsiveness. *Journal of immunology* 2012, **188**(6): 2894-2904.
182. De Sanctis GT, Itoh A, Green FH, Qin S, Kimura T, Grobholz JK, *et al.* T-lymphocytes regulate genetically determined airway hyperresponsiveness in mice. *Nature medicine* 1997, **3**(4): 460-462.
183. Pin I, Radford S, Kolendowicz R, Jennings B, Denburg JA, Hargreave FE, *et al.* Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine hyperresponsiveness. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1993, **6**(9): 1249-1256.
184. Power C, Sreenan S, Hurson B, Burke C, Poulter LW. Distribution of immunocompetent cells in the bronchial wall of clinically healthy subjects showing bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 1993, **48**(11): 1125-1129.
185. Ackerman V, Marini M, Vittori E, Bellini A, Vassali G, Mattoli S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994, **105**(3): 687-696.
186. Betz R, Kohlhaufl M, Kassner G, Mullinger B, Maier K, Brand P, *et al.* Increased sputum IL-8 and IL-5 in asymptomatic nonspecific airway hyperresponsiveness. *Lung* 2001, **179**(2): 119-133.
187. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(12): 1875-1886.
188. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of immunology* 2004, **172**(9): 5149-5153.
189. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 2011, **208**(7): 1339-1350.
190. Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2006, **27**(1): 208-229.

191. Scherf W, Burdach S, Hansen G. Reduced expression of transforming growth factor beta 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. *European journal of immunology* 2005, **35**(1): 198-206.
192. Schramm C, Herz U, Podlech J, Protschka M, Finotto S, Reddehase MJ, *et al.* TGF-beta regulates airway responses via T cells. *Journal of immunology* 2003, **170**(3): 1313-1319.
193. Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF, van Loon M, Bates JH, Janssen-Heininger YM, *et al.* Transforming growth factor-beta1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007, **176**(10): 974-982.
194. Nakao A, Miike S, Hatano M, Okumura K, Tokuhisa T, Ra C, *et al.* Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(2): 151-158.
195. Nogami M, Romberger DJ, Rennard SI, Toews ML. TGF-beta 1 modulates beta-adrenergic receptor number and function in cultured human tracheal smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 1994, **266**(2 Pt 1): L187-191.
196. Kim JH, Jain D, Tliba O, Yang B, Jester WF, Jr., Panettieri RA, Jr., *et al.* TGF-beta potentiates airway smooth muscle responsiveness to bradykinin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**(4): L511-520.
197. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, *et al.* Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **156**(2 Pt 1): 591-599.
198. Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **156**(2 Pt 1): 642-647.
199. Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Hirano T, *et al.* Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006, **118**(1): 84-90.
200. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *Journal of immunology* 2005, **174**(9): 5774-5780.
201. Le AV, Cho JY, Miller M, McElwain S, Golgotiu K, Broide DH. Inhibition of allergen-induced airway remodeling in Smad 3-deficient mice. *Journal of immunology* 2007, **178**(11): 7310-7316.
202. Howell JE, McAnulty RJ. TGF-beta: its role in asthma and therapeutic potential. *Current drug targets* 2006, **7**(5): 547-565.
203. Bosse Y, Rola-Pleszczynski M. Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma. *Respiratory research* 2007, **8**: 66.

204. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006, **441**(7090): 235-238.
205. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* 1998, **102**(1): 98-106.
206. Stampfli MR, Cwiartka M, Gajewska BU, Alvarez D, Ritz SA, Inman MD, *et al.* Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1999, **21**(5): 586-596.
207. Makela MJ, Kanehiro A, Borish L, Dakhama A, Loader J, Joetham A, *et al.* IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(11): 6007-6012.
208. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *Journal of immunology* 2000, **165**(9): 4848-4853.
209. Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, *et al.* CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(1): 61-70.
210. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells in allergic asthma. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2012, **14**(3): 180-183.
211. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 2012, **482**(7385): 395-399.
212. Patel DD. Escape from tolerance in the human X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome and the Scurfy mouse. *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(2): 155-157.
213. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008, **29**(5): 771-781.
214. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* 2004, **22**: 531-562.
215. Suto A, Nakajima H, Kagami SI, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **164**(4): 680-687.
216. Hadeiba H, Locksley RM. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *Journal of immunology* 2003, **170**(11): 5502-5510.

217. Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *Journal of immunology* 2004, **172**(6): 3842-3849.
218. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, *et al.* Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 2002, **8**(9): 1024-1032.
219. Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004, **5**(11): 1149-1156.
220. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, Subrata LS, Thomas JA, Turner DJ, *et al.* Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(12): 2649-2660.
221. Burchell JT, Wikstrom ME, Stumbles PA, Sly PD, Turner DJ. Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009, **296**(3): L307-319.
222. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(11): 1539-1547.

# Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs

Patricia Ramos-Ramírez,<sup>1,2</sup> María G. Campos,<sup>3</sup> Erasmo Martínez-Cordero,<sup>4</sup>  
Blanca Bazán-Perkins,<sup>1,\*</sup> and Eduardo García-Zepeda<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan, México DF, México

<sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Insurgentes Sur, México DF, México

<sup>3</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México

<sup>4</sup>Departamento de Autoinmunidad, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan, México DF, México

## ABSTRACT

**Background:** Airway obstruction after antigen challenge is not always observed in patients with allergic asthma, even if they develop hyperresponsiveness. A similar event is observed in our guinea pig model of allergic asthma. Our aim was to study this phenomenon. **Methods:** Sensitized guinea pigs were challenged with ovalbumin (OVA) 3 times every 10 days. Animals were divided into 2 groups: (1) Guinea pigs exhibiting airway obstruction after antigen challenge (R = responders), and (2) guinea pigs lacking airway obstruction response (NR = nonresponders). After the third antigen challenge, antigen-induced airway hyperresponsiveness (AI-AHR), serum OVA-specific immunoglobulins, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) inflammatory cells, histamine, cysteinyl leukotrienes and thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) BALF levels, and in vitro tracheal contraction induced by contractile mediators and OVA were evaluated. **Results:** R group consistently displayed a transient antigen-induced airway obstruction (AI-AO) as well as AI-AHR, high TxA<sub>2</sub>, histamine, OVA-IgG1, OVA-IgE and OVA-IgA levels, and intense granulocyte infiltration. NR group displayed no AI-AO and no changes in BALF measurements; nevertheless, AI-AHR and elevated OVA-IgG1 and OVA-IgA levels were observed. In all groups, histamine, TxA<sub>2</sub> and leukotriene D<sub>4</sub> induced a similar contraction. Tracheal OVA-induced contraction was observed only in R group. AI-AHR magnitude showed a direct association with OVA-IgG1 and OVA-IgA levels. The extent of AI-AO correlated directly with OVA-IgE and inversely with OVA-IgA levels. **Conclusions:** Our data suggest that TxA<sub>2</sub> and histamine participate in AI-AO likely through an IgE mechanism. AI-AHR might occur independently of AI-AO, contractile mediators release, and airway inflammatory cell infiltration, but IgA and IgG1 seem to be involved.

**KEYWORDS** airway hyperresponsiveness, asthma model, airway inflammation, airway obstruction, histamine, IgA, IgE, IgG1, leukotriene D<sub>4</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>

## INTRODUCTION

Asthma is a complex, heterogeneous, and variable airway disorder characterized by persistent inflamma-

tion, episodes of airflow obstruction and respiratory symptoms. Asthma exacerbations may include either immediate or late airway obstructive responses, and can be triggered by identifiable allergens in atopic or extrinsic asthma or by nonidentifiable allergens in nonatopic or intrinsic asthma [1, 2]. Nevertheless, allergen exposure in atopic individuals can also attenuate asthmatic responses and even induce tolerance [3]. Different factors have been associated to the great variability of asthmatic responses such as genetics, allergen dose, and degree of exposure or sensitization

Received 20 July 2012; accepted 19 February 2013

\*These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Blanca Bazán-Perkins, Departamento de Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, CP 14080, México DF, México. E-mail: perkins@unam.mx

[4]. For instance, in humans, a single high-dose of a potential allergen protects against allergen sensitization, whereas asthma symptom attenuation may be induced by frequent challenges of low antigen doses [5, 6]. In mice, high allergen doses can induce allergic responses, but prolonged allergen exposure eventually generates long-lasting immune tolerance [7]. Guinea pigs are able to show strong airway obstructive responses after antigen challenge; this response makes them an excellent model for studying acute and chronic allergic asthma [7–10]. In addition, many pharmacological studies designed to evaluate the effect of drugs in asthma have been conducted in guinea pigs as they display structural and functional airway features similar to humans [11, 12]. However, guinea pig asthma models show variability and heterogeneity [10, 11]. In our asthma model, most guinea pigs develop an intense immediate airway obstructive response, as well as airway hyperresponsiveness and inflammatory granulocyte infiltration and remodeling [13–15]. Nevertheless, approximately 20% of the total number of guinea pigs ( $n = 200$ ; data not shown) do not develop airway obstructive response following one or various antigen challenges. Similar observations have been described by other authors in guinea pigs [16, 17], mice [18, 19], and humans [18, 20]. Unresponsiveness to antigen challenge might be an exclusion criterion for participating in asthma clinical trials, but unfortunately unresponsive individuals are poorly studied. The present study evaluates functional, pharmacological inflammatory and immunological features of guinea pigs with no airway obstructive response to antigen challenge.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male, outbred guinea pigs (350–400 g), purchased from Harlan Mexico (strain HsdPoc:DH) and housed at our institutional laboratory animal facilities, were used. The animals were maintained in filtered air-conditioned, 12/12-hour light/dark cycles, at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  and 50%–70% humidity, fed with sterilized pellets (2040 Harlan Teklad Guinea Pig Diet), and water ad libitum. All animals were handled accordingly to protocols approved by the Scientific and Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### Sensitization Procedure

On day one, guinea pigs received a mixture of  $60 \mu\text{g/mL}$  ovalbumin (OVA) with aluminum hydroxide (1 mg/mL) dispersed in saline solution via

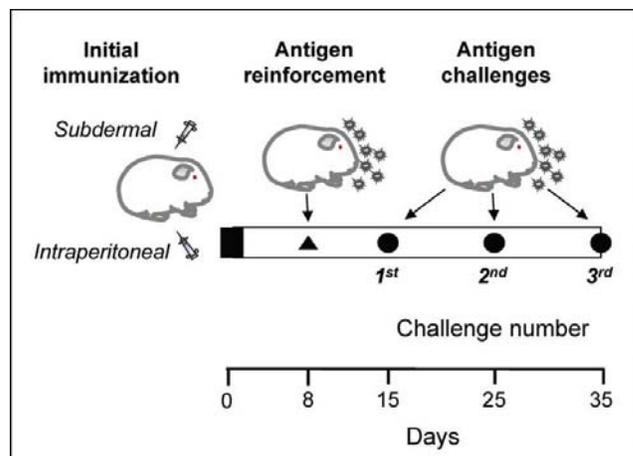


FIGURE 1. Sensitization and antigen-challenge procedures. After initial sensitization and reinforcement, guinea pigs received 3 consecutive antigen challenges every 10 days. Animals were sacrificed at day 35 (third challenge) after evaluation of antigen-induced airway responsiveness.

both intraperitoneal (0.5 mg/mL) and subdermal (0.5 mg/mL) injections (Figure 1). Antigen sensitization was reinforced 8 days later with OVA aerosol (3 mg/mL saline) delivered over 5 minutes (Figure 1). Aerosols were produced by a US-1 Bennett nebulizer (flow, 2 mL/minute; Multistage liquid impinger, Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Hertfordshire, UK), releasing mixed particles whose size was  $<4 \mu\text{m}$  (44%),  $4\text{--}10 \mu\text{m}$  (38%), and  $>10 \mu\text{m}$  (18%). From day 15 onward, 6 guinea pigs that developed immediate airway obstruction following antigen challenge, named the responder group (R), and other 6 animals with no broncho-obstructive response, named the nonresponder group (NR), were challenged over 1 minute with OVA aerosol every 10 days (1 mg/mL in the first challenge, and 0.5 mg/mL in the subsequent challenges) (Figure 1). This response pattern has been observed recurrently after adjusting the doses to reduce anaphylactic shock (data not shown). Two additional control groups of nonsensitized guinea pigs were included. Control group 1 received 3 challenges with vehicle (saline solution). Control group 2 received 2 challenges with vehicle. At third challenge, when hyperresponsiveness was evaluated, between histamine challenges, animals received OVA to demonstrate that the observed airway hyperresponsiveness is specific to OVA challenge. This procedure does not induce an evident late airway response in any group, either R or NR guinea pigs [13–15].

### Barometric Plethysmography

Inhalation challenges were carried out by using a barometric plethysmograph to record acute airway

obstructive response to the antigen immediately after OVA delivery. We used whole-body single-chamber plethysmography for freely moving animals (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) to evaluate pulmonary function according to principles previously described [21].

### Antigen-induced Airway Responsiveness

To evaluate airway responsiveness at day 35, corresponding to the third OVA challenge, animals were exposed to increased noncumulative doses of histamine (0.01 to 0.32 mg/mL) aerosols after an initial Penh baseline acquisition before and after OVA administration. Each histamine dose was delivered over 1 minute, and the average Penh value over the following 5 minutes was obtained. The interval between doses was 10 minutes. The dose-response curve finished when Penh reached 3 times its baseline level [13]. Once Penh returned to the initial baseline value (<50% increment) [22], the OVA challenge was administered. The second curve was performed 3 hours later.

### Bronchoalveolar Lavage Fluid Cell Count

One hour after finishing the second histamine curve, animals received an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg) and the trachea was cannulated to obtain the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Trypan blue stain was used to assess total cell number in a Neubauer hemocytometer, whereas Romanowsky stain was used for differential cell counting. Cell counts were expressed as number of cells per mL of BALF. All smears were coded and cells were counted blindly.

### In Vitro Organ Bath Studies

After obtained BALF, the tracheae were dissected and connective tissue removed. The tracheal rings (~5 mm) were placed in an organ bath containing warmed (37°C) Krebs solution (pH 7.4) composed by (mM): NaCl 120, KCl 4.77, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, and glucose 11, which was gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Indomethacin (1 μM) was added to inhibit endogen prostaglandin production. Tissues were attached to an isometric force transducer (Grass model FT03; Grass Instruments, CA, USA) and suspended under an initial tension of 1.0 g to equilibrate for at least 1 hour. To measure contractility of the tracheal rings, OVA was added at 3.74 μg/mL for 20 minutes. After washout, tissues were stimulated with 10 μM histamine, 10 nM U46619 (thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)

agonist) and 1 μM leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) for 20 minutes.

### Immunoglobulin Levels in Serum

Serum OVA-specific IgG1, IgE, and IgA antibodies were measured by enzyme-linked immunolabeling sorbent assay as previously described [23]. Blood samples were obtained by intracardiac puncture and OVA-specific immunoglobulins were detected with biotinylated specific antibodies: anti-guinea pig IgG1 IgA and IgE (ICN ImmunoBiologicals, USA). Data were expressed as absorbance (A<sub>492</sub>).

### Histamine, TxA<sub>2</sub> and Cysteinyl Leukotrienes Levels in BALF

BALF samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C and histamine, TxA<sub>2</sub> (measured as thromboxane B<sub>2</sub>) and cysteinyl leukotrienes levels in BALF supernatant were measured by using enzyme immunoassay kits (Cayman Chemical Company, MI, USA).

### Drugs and Reagents

Ovalbumin (chicken egg albumin) grade II, histamine dihydrochloride, Tween 20, orthophenylenediamine, sulphuric acid, LTD<sub>4</sub>, reagents for Krebs and phosphate buffers and staining solutions for microscopy were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). U46619 was purchased from Tocris (Bristol, UK). Ovalbumin, U46619, LTD<sub>4</sub>, and histamine were dissolved in saline solution. Aluminum hydroxide was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Pentobarbital sodium was acquired from Pfizer (Toluca, Mexico). Hydrogen peroxide was purchased from Merck (Merck, Darmstadt, Germany).

### Statistical Analysis

Airway responsiveness to histamine was evaluated by means of the interpolated histamine dose that caused a 3-fold increase of basal Penh, i.e., the provocative dose 200% (PD<sub>200</sub>). The PD<sub>200</sub> ratio corresponds to the PD<sub>200</sub> value observed after OVA challenge divided by the PD<sub>200</sub> value before challenge. One- or 2-way ANOVA followed by Tukey's test were applied for multiple comparisons. Associations between lung function parameters and either immunoglobulins were assessed through Pearson correlation coefficient. Statistical significance was set at 2-tailed *P* < .05. Data in the text and figures represent mean ± SE.

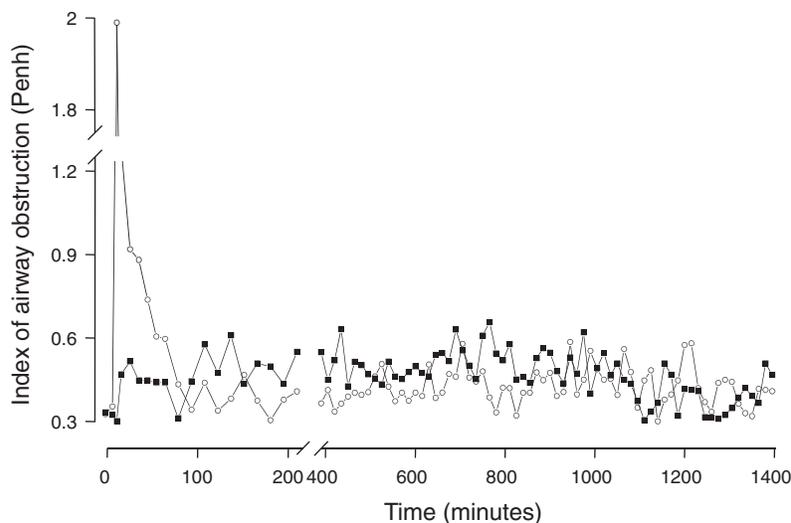


FIGURE 2. Temporal course of antigen responses during the first ovalbumin challenge in sensitized guinea pigs. Recordings show a typical transient airway obstructive response (open circles) and the absence of this response (closed squares) in 2 different guinea pigs, after the first antigen challenge (day 15).

## RESULTS

### Airway Obstructive Responses Induced by Antigen Challenge

Guinea pigs were selected in accordance with 1 of the 2 patterns of response to the first antigen challenge ( $n = 6$  each; Figure 2), either the transient airway obstructive response typical of asthma model (R) [13–15] in which maximum value Penh ( $R_{max}$ ) was  $>200\%$  baseline, or the nonnoticeable obstructive response, (NR) in which  $R_{max}$  did not exceed  $200\%$  basal Penh.

$R_{max}$  values observed at the first antigen challenge (day 15) in R and NR guinea pigs were similar to those observed at the second and third challenges (days 25 and 35; Figure 3).  $R_{max}$  values in each challenge were significantly different ( $P < .05$ ;  $n = 6$  each group) between R and NR guinea pig groups, and between R and control group ( $P < .05$ , respectively;  $n = 6$  each group; Figure 3). Maximum Penh values between control and NR groups were similar.

### Antigen-Induced Airway Responsiveness

$PD_{200}$  to aerosolized histamine was not different from  $PD_{200}$  obtained after saline challenge in the control groups (Figure 4). In both groups, R and NR, a significant decrease in histamine  $PD_{200}$  was observed after OVA challenge in comparison with both control groups ( $P < .01$ , respectively; Figure 4). Basal  $PD_{200}$  values among all groups were not significantly different.

### Tissue Bath Studies

OVA induced tracheal contraction in R group in a manner significantly higher than the contraction

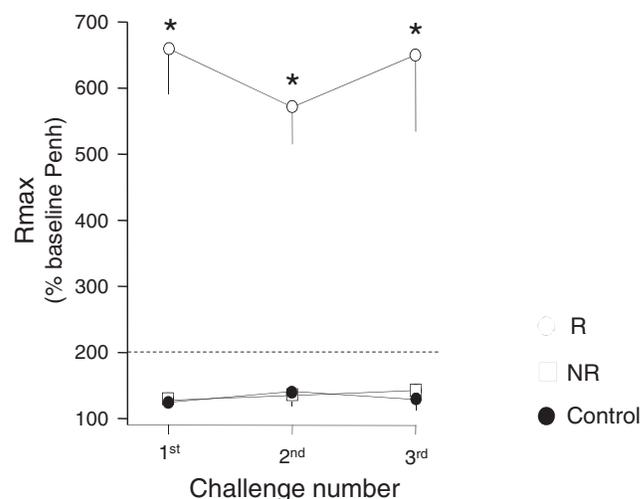


FIGURE 3. Maximum airway obstructive responses induced by ovalbumin challenges in sensitized guinea pigs. Values correspond to saline (closed circles, control 1 group) and OVA (open squares and circles) challenged guinea pigs, and were obtained as average of maximum Penh ( $R_{max}$ ) reached at the first hour. Open circles correspond to guinea pigs showing responses over  $200\%$  basal Penh (R group), whereas open squares illustrate guinea pigs with no airway obstruction response after antigen challenge (NR group).  $*P < .05$ , R group compared with both control and NR groups (2-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test). Symbols represent the mean  $\pm$  SE of  $n = 6$  animals for each group. Penh = index of airway obstruction.

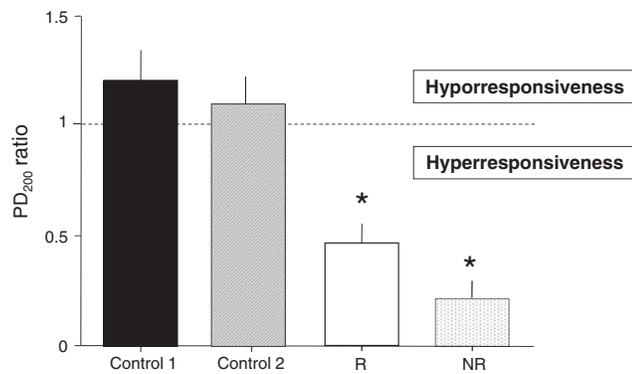


FIGURE 4. Airway responsiveness to histamine before and after ovalbumin challenge in sensitized guinea pigs.  $PD_{200}$  ratio, i.e., the  $PD_{200}$  value observed after OVA challenge divided by  $PD_{200}$  value before challenge for: control 1 (nonsensitized and vehicle-challenged guinea pigs), control 2 (nonsensitized and OVA-challenged (day 35) guinea pigs), airway obstruction responder (R), and nonresponder (NR) groups. Bars represent the mean  $\pm$  SE of  $n = 6$  animals for each group. \* $P < .01$  compared with both control groups (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

induced by OVA in control and NR guinea pigs ( $P < .05$ ; Table 1). Histamine, LTD<sub>4</sub>, and U46619 (a stable analog of TxA<sub>2</sub>) administration induced a similar tracheal contraction in all groups (Table 1).

### Specific anti-OVA IgG, anti-OVA IgA, and anti-OVA IgE in Serum

Serum anti-OVA IgG1 levels were similar in R and NR groups and significantly higher than control group ( $P < .001$ ;  $n = 6$  each group, respectively; Figure 5). Serum OVA-IgE levels only increased in R group in comparison with control group ( $P < .001$ ;  $n = 6$  each group; Figure 5). The serum levels of OVA-IgA increased in both R ( $P < .05$ ;  $n = 6$ ) and NR groups ( $P < .001$ ;  $n = 6$ ) in comparison with control group ( $n = 5$ ; Figure 5).

In Table 2, it can be observed that the maximal Penh values were correlated directly with anti-OVA IgE levels and indirectly with anti-OVA IgA levels but were unrelated to OVA-IgG1 levels. Likewise,

TABLE 2. Pearson Correlation Coefficients of Lung Function and OVA-specific Immunoglobulins

	Lung function	
	Rmax	$PD^{200}$ ratio
Serum immunoglobulins		
IgE	0.39 <sup>a</sup>	0.11
IgG1	-0.02	-0.58 <sup>b</sup>
IgA	-0.40 <sup>a</sup>	-0.39 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < .05$ , <sup>b</sup> $P < .001$ ,  $n = 17-18$

Rmax, maximum value Penh;  $PD^{200}$  ratio, change of  $PD^{200}$  after antigen challenge as compared with basal (pre-challenge)  $PD^{200}$  value; OVA, ovalbumin.

$PD_{200}$  ratio had an inverse correlation with OVA-IgG1 and OVA-IgA levels implying that the greater the OVA-IgG1 and OVA-IgA levels, the higher the airway hyperresponsiveness. However, this association of  $PD_{200}$  ratio was not apparent for OVA-IgE. Since values of OVA-specific immunoglobulins among control groups (1 and 2) were not different statistically (data not shown), control group 1 was considered representative as control group.

### Cell Counts in BALF

The number of total cells, macrophages, lymphocytes, eosinophils, and neutrophils in BALF from NR group was not significantly different compared to control group. Neutrophil and eosinophil counts in BALF from R group were significantly higher than control and NR groups ( $P < .01$ ;  $n = 6$  each group; Figure 6). Since cell counts among control groups were similar (data not show), control group 1 was considered the representative control group.

### Histamine, TxA<sub>2</sub> and Cysteinyl Leukotrienes Levels in BALF

As shown in Figure 7, BALF levels of histamine and TxA<sub>2</sub> were increased significantly in R group in comparison with control and NR groups ( $P < .01$  and  $.05$ , respectively). The levels of cysteinyl leukotrienes in all groups were similar.

TABLE 1. In vitro Maximal Response (g) to Ovalbumin, Histamine, U46619, and LTD<sub>4</sub> of Tracheae from Responder and Non-Responder Guinea Pigs

	OVA (3.74 $\mu$ g/mL)	Histamine (10 $\mu$ M)	U46619 (10 nM)	LTD4 (1 $\mu$ M)
Controls	0.12 $\pm$ 0.04 ( $n = 7$ )	1.1 $\pm$ 0.4 ( $n = 7$ )	1.06 $\pm$ 0.19 ( $n = 6$ )	0.56 $\pm$ 0.08 ( $n = 6$ )
Responders	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> ( $n = 10$ )	1.9 $\pm$ 0.5 ( $n = 10$ )	0.98 $\pm$ 0.05 ( $n = 3$ )	0.53 $\pm$ 0.05 ( $n = 6$ )
Nonresponders	0.15 $\pm$ 0.08 ( $n = 7$ )	1.4 $\pm$ 0.6 ( $n = 7$ )	1.34 $\pm$ 0.28 ( $n = 6$ )	0.56 $\pm$ 0.07 ( $n = 6$ )

<sup>a</sup> $P < .05$ , Unpaired *T*-Student test

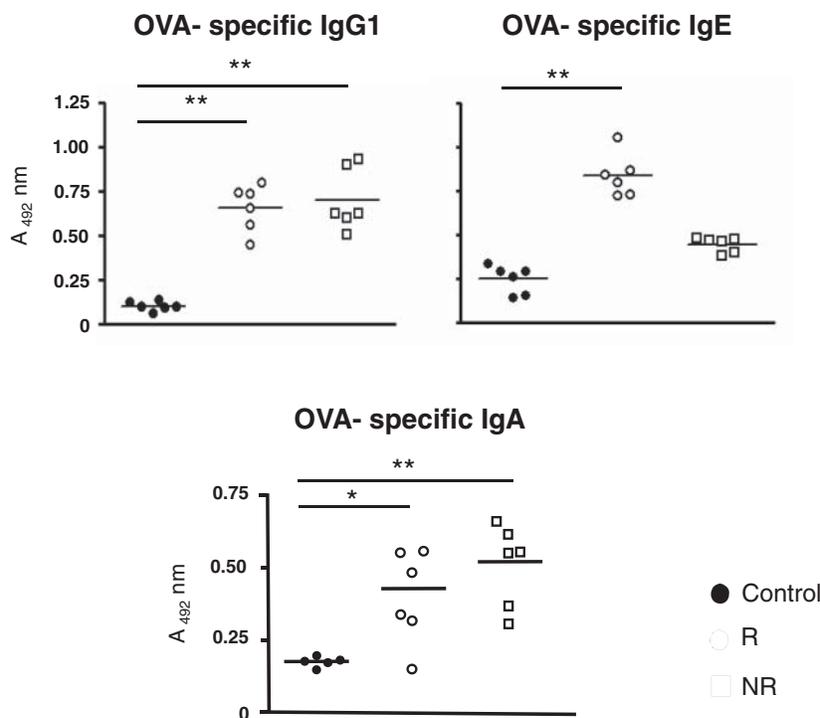


FIGURE 5. Scatter plots of specific immunoglobulins from challenged guinea pigs. Values for serum OVA-specific IgG1, IgE, and IgA antibodies for control, airway obstruction responder (R) and nonresponder (NR) guinea pig groups. \* $P < .05$  and \*\* $P < .001$  compared with control group (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).  $A_{492}$  nm: absorbance, OVA: ovalbumin.

## DISCUSSION

We have observed that guinea pigs that do not display airway obstruction after antigen challenge (NR group) are able to develop hyperresponsiveness in a similar way to guinea pigs which did develop airway obstruction (R). Airway obstruction is a central symptom of asthma exacerbation. Exposure to the antigen usually is followed by an immediate and transient early broncho-obstruction and, some hours later, by a late long lasting response [23]. Nevertheless, in some asthmatic patients only an isolated either early or late airway obstructive response has been observed [1–3]. Only early airway obstructive responses are observed in the guinea pig asthma model used in this study, such animals composed the R group. In a previously published guinea pig model, low antigen doses during challenges induced only early responses, while higher doses induced both, early and late responses [10]. Therefore, a provocative antigen dose is fundamental in the development of both responses in guinea pig. The doses used in this asthma model were adjusted to reduce anaphylactic shock during challenges (data not shown). Nevertheless, a nonasthma phenotype, i.e., guinea pigs Non-Responsive to in-

haled antigen challenge, was observed in this study. Unexpectedly, NR guinea pigs did display hyperresponsiveness to histamine. Although airway hyperresponsiveness is a hallmark of asthma, it is a variable feature among individuals [24], contributing to asthma heterogeneity. Furthermore, a significant proportion of healthy subjects also present airway hyperresponsiveness [25]. The proportion of asymptomatic subjects with airway hyperresponsiveness ranges from 20% to 60% [25–29]. Although the clinical significance of asymptomatic airway hyperresponsiveness remains a matter of debate, this phenomenon could precede the occurrence of asthma, representing a transition from the lack of symptoms to the asthmatic phenotype irrespectively of atopic status [25, 28].

The design of animal models of antigen-induced airway hyperresponsiveness without development of inflammatory cell infiltration and broncho-obstruction is essential to understand the pathophysiological mechanisms of this condition. An interesting observation in this study was that the treatment with OVA induced contraction only in tracheae from R guinea pigs, whereas histamine, the stable analog of  $TxA_2$  (U46619), and  $LTD_4$  produced similar contractile responses in bath tissues

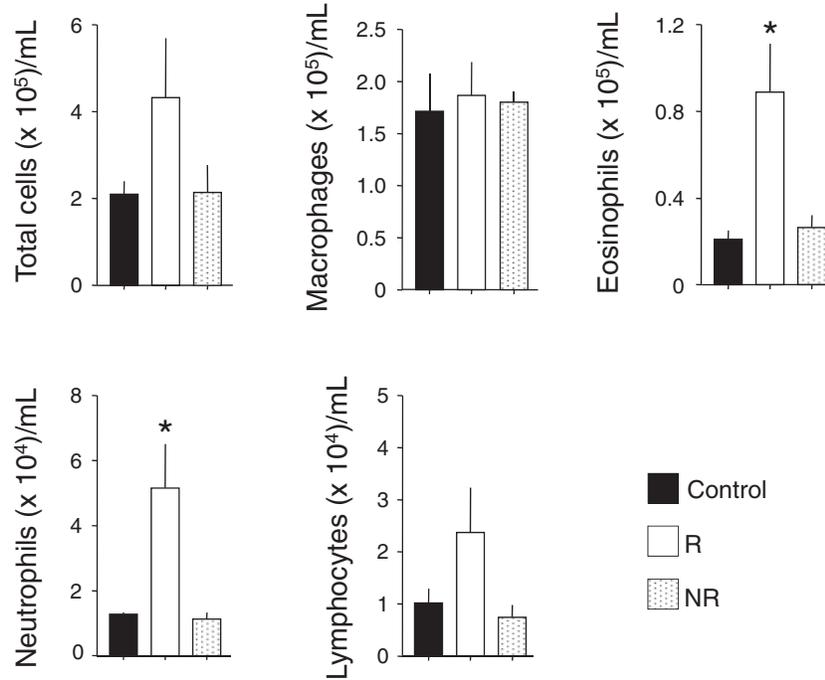


FIGURE 6. Total and differential cell counts in BALF from ovalbumin-challenged guinea pigs. Cell numbers recovered in bronchoalveolar lavage fluid are shown for each group. R group corresponds to guinea pigs with airway obstructive response; NR group corresponds to nonresponder guinea pigs after antigen challenge. Bars represent the mean  $\pm$  SE of  $n = 6$  guinea pigs in each group. \* $P < .01$  compared with control and NR groups (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

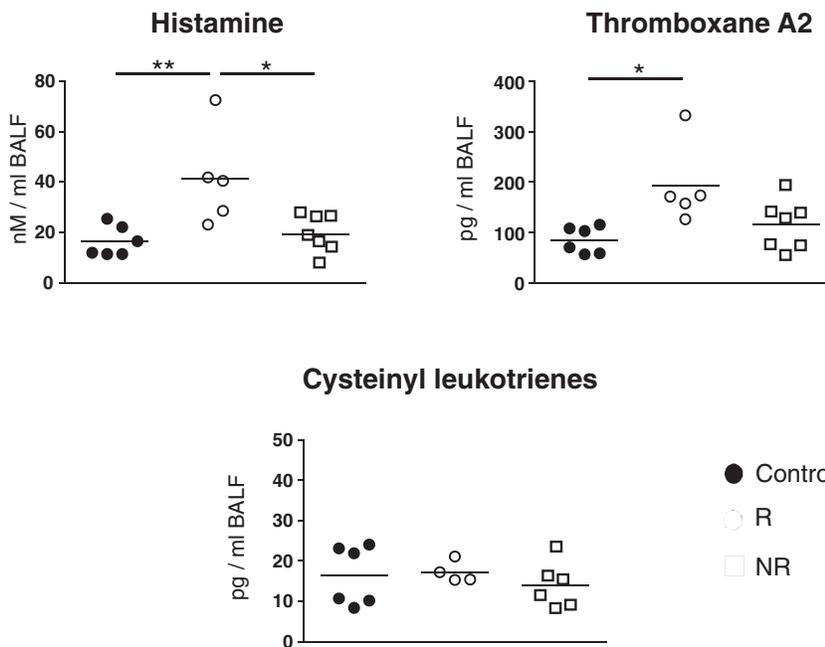


FIGURE 7. Scatter plots of histamine, thromboxane A2 and cysteinyl leukotrienes levels in BALF from challenged guinea pigs. Values for histamine, thromboxane A2, and cysteinyl leukotriene for control, airway obstruction responder (R) and nonresponder (NR) guinea pig groups. \* $P < .05$  and \*\* $P < .001$  compared with control group (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

Exp Lung Res Downloaded from informahealthcare.com by 201.124.151.146 on 03/25/13 For personal use only.

from all groups. This suggests that the smooth muscle receptors for these contractile mediators are functionally alike between guinea pig groups. Furthermore, since there is no response to OVA in both in vivo and in vitro models, it may be concluded that the response of an individual animal is not due to how effectively the antigen was delivered during the challenges.

In this study, we have observed that the BALF levels of contractile agonists of guinea pig airway smooth muscle such as histamine and TxA<sub>2</sub> suggest that these mediators, but not LTD<sub>4</sub>, might be involved in the immediate or early asthmatic reaction in R group. None of these mediators were found in NR guinea pig BALF suggesting that the absence of contractile mediators after antigenic challenge might be the cause of the absence of airway obstruction in NR guinea pigs.

Human and guinea pig immunoglobulin classes during allergic responses are similarly regulated; nevertheless, the main immunoglobulin in guinea pig model of allergy is IgG1, while in human is IgE. Although it has been observed that both immunoglobulins contribute to broncho-constriction in guinea pigs, the obstructive response induced by IgG1 is very low in comparison with the strong response induced by IgE [30, 31]. Our results show that IgE production and broncho-obstruction extent are correlated, suggesting that IgE is essential in the development of obstructive responses induced by antigen in our model in guinea pig. High OVA-specific IgG1 production was observed in both groups, R and NR guinea pigs, confirming that NR guinea pigs are atopic. The role of IgG1 in the guinea pig includes participation in immediate hypersensitivity, pulmonary eosinophilia [32], and development of airway hyperresponsiveness evaluated in vitro [33] and in vivo [31]. In addition, the release of histamine in lung is greater in guinea pigs sensitized with IgG1 antibody than with IgE [34, 35], and it is known that histamine response is potentiated by TxA<sub>2</sub> in the IgG1- but not IgE-mediated anaphylactic airway obstruction [31]. In this context, anti-OVA IgG1 levels in our model were directly associated to the extent of airway hyperresponsiveness. This observation corroborates that IgG1 production may be crucial in the development of airway hyperresponsiveness induced by antigen in the guinea pig. Guinea pig IgE or IgG1 production depends on the antigen dose used during antigen sensitization. For example, low doses of antigen (OVA) during sensitization (10 µg i.p.) induced IgE and IgG1, while high doses of antigen (100 µg i.p.) favored IgG1 production [30, 36]. The dose of antigen used in our study, i.e., 60 µg/mL, is in the range with the doses that produce IgG1 or both immunoglobulins, and it is

closer to the threshold production of the different immunoglobulin patterns. Then, it is likely that the antigen sensitizing dose used in this study is responsible for the development of R and NR phenotypes; however, more experiments are needed to demonstrate this hypothesis. IgA has been described as a noninflammatory antibody isotype that maintains homeostatic balance in mucosa. In humans, allergy has been observed associated with OVA-IgA and OVA-IgG [37]. In addition, mouse pulmonary OVA-IgA levels vary with OVA doses [38]. In guinea pig, the magnitude of broncho-obstruction is inversely associated with serum OVA-IgA levels; therefore, IgA seems not to be a fundamental factor in the development of allergic responses in guinea pig. In contrast, serum OVA-IgA and airway hyperresponsiveness magnitude are directly associated, pointing out the putative role of IgA in the mechanisms inducing hyperresponsiveness in the guinea pig. In this context, it has been reported that atopic patients and healthy individuals have an allergic response characterized by specific IgA [38]. Particularly, IgA can induce eosinophil degranulation, causing airway hyperresponsiveness via an indirect effect on airway smooth muscle [39–42]. Schneider and collaborators have shown that sensitization of mice with limiting doses of OVA can induce airway hyperresponsiveness accompanied by pulmonary IgA, but not allergic lung disease [38]. Then, our data suggest that antigen specific-IgA may play a dual role, this is, as the classical marker capable of offering protective effects on the allergen response, and it may also be involved in airway hyperresponsiveness.

In addition to broncho-obstruction, airway hyperresponsiveness, as well as IgA, IgE, and IgG1 production, responder guinea pigs showed an immediate increase of neutrophil and eosinophil in BALF. Asthma is considered an eosinophilic disease, and neutrophils are common during the acute phase of asthma [43]. The NR guinea pigs did not show infiltration of inflammatory cells in BALF, nor even neutrophils that are the earliest cells appearing in tissues after injury. Hyperresponsiveness observed in asymptomatic patients has been associated to inflammatory cell infiltration in a similar level than that found in mild asthma patients [44]. In addition, no association has been observed between asymptomatic hyperresponsiveness and inflammatory cell infiltration [45]. Antigen challenge in NR guinea pigs may not modify airways up to the point to induce injury and inflammation, but it does induce airway hyperresponsiveness and production of IgG1.

The precise mechanisms involved in the development of airway hyperresponsiveness are unknown,

but airway inflammation and remodeling have been suggested [24]; nevertheless, some studies suggest that airway hyperresponsiveness may occur even in the absence of inflammatory cells in the airway lumen or mucosa [46–49]. Our results confirm that this phenomenon occurs in guinea pig. Thus, other factors such as changes within the smooth muscle itself, airway remodeling or inflammatory mediators might be involved in airway hyperresponsiveness development.

Nowadays there are no syngeneic strains of guinea pigs; therefore genetic and epigenetic factors might be associated to the variability of allergic responses in our asthma model. To avoid variability in different guinea pig models, antigen doses are adjusted up to obtain an airway response [10, 50, 51]; to prevent a fatal anaphylactic reaction, airway obstructive responses were diminished by antihistaminergic [9, 52] and anticholinergic [52] pretreatments. It is noteworthy that in our asthma model the antigen-induced obstruction is not controlled by adjusting allergen doses or by drug pretreatments. Therefore, NR animals are likely revealing the biological variability of guinea pigs when are challenged with the same antigen dose.

In summary, our data suggest that the immediate asthmatic reaction in guinea pig might be associated to the release of T<sub>H</sub>2 and histamine through the action of IgE, whereas airway hyperresponsiveness can be observed independently of airway allergic responses after antigen challenge, and it depends on IgA and IgG1 expression. Furthermore, our results point it out that the sole determination of airway hyperresponsiveness or immunoglobulins is not enough to validate an asthma model. The putative guinea pig model of antigen-induced airway hyperresponsiveness (NR group) in absence of airway obstruction and inflammatory cell infiltration might represent an important tool to further understand the mechanisms underlying airway hyperresponsiveness. Finally, it is important to improve the method of sensitization to induce responder or asthma model guinea pigs.

**Declaration of interests:** Patricia Ramos-Ramírez was recipient of a Ph.D. scholarship from CONACyT (#256077) and is a doctoral student of Posgrado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

[1] Beier J, Beeh KM, Semmler D, Buhl R: Sputum levels of reduced glutathione increase 24 hours after allergen challenge in

- isolated early, but not dual asthmatic responders. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;135:30–35.
- [2] Ihre E, Axelsson IG, Zetterstrom O: Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen. *Clin Allergy.* 1988;18:557–567.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Palmqvist M, Cui ZH, Sjostrand M, Linden A, Lotvall J: Reduced late asthmatic response by repeated low-dose allergen exposure. *Eur Respir J.* 2001;17:872–880.
- [6] Riedl MA, Landaw EM, Saxon A, Diaz-Sanchez D: Initial high-dose nasal allergen exposure prevents allergic sensitization to a neoantigen. *J Immunol.* 2005;174:7440–7445.
- [7] Van Hove CL, Maes T, Joos GF, Tournoy KG: Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36:573–584.
- [8] Campos MG, Church MK: How useful are guinea-pig models of asthma? *Clin Exp Allergy.* 1992;22:665–666.
- [9] Nabe T, Shinoda N, Yamada M, Sekioka T, Saeki Y, Yamamura H, Kohno S: Repeated antigen inhalation-induced reproducible early and late asthma in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol.* 1997;75:65–75.
- [10] Smith N, Broadley KJ: Optimisation of the sensitisation conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:183–190.
- [11] Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G: The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets.* 2008;9:452–465.
- [12] Zosky GR, Sly PD: Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:973–988.
- [13] Bazan-Perkins B, Campos MG, Sanchez-Guerrero E: Polymerized type I collagen reverts airway hyperresponsiveness and fibrosis in a guinea pig asthma model. In: Khatami M, ed. *Inflammatory Diseases – Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases.* Rijeka: InTech 2012:319–332.
- [14] Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Vargas MH, Martinez-Cordero E, Ramos-Ramirez P, Alvarez-Santos M, Hiriath G, Gaxiola M, Hernández-Pando R: Beta1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:740–751.
- [15] Moreno-Alvarez P, Sanchez-Guerrero E, Martinez-Cordero E, Hernandez-Pando R, Campos MG, Cetina L, Bazán-Perkins B: Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung.* 2010;188:97–105.
- [16] Kim J, Shim JJ, Lee SY, Kwon YH, Lee SR, Cho JY, In KH, Yoo SH, Kang KH: Early bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Tuberc Respir Dis.* 1998;45:99–106.
- [17] Lawrence TE, Millecchia LL, Frazer DG, Fedan JS: Pulmonary dendritic cell distribution and prevalence in guinea pig airways: effect of ovalbumin sensitization and challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282:995–1004.
- [18] Arts JH, Mommers C, de Heer C: Dose-response relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36:219–251.
- [19] Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA: Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L32–L42.
- [20] Metzger WJ, Richerson HB, Worden K, Monick M, Hunninghake GW: Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic

- patients following allergen bronchoprovocation. *Chest*. 1986;89:477–483.
- [21] Drorbaugh JE, Fenn WO: A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*. 1955;16:81–87.
- [22] Bazan-Perkins B, Vargas MH, Sanchez-Guerrero E, Chavez J, Montano LM: Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Exp Physiol*. 2004;89:623–628.
- [23] Picado C: Early and late-phase asthmatic reactions: a hypothesis. *Allergy*. 1992;47:331–333.
- [24] Cockcroft DW, Davis BE: Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:551–559.
- [25] Boulet LP: Asymptomatic airway hyperresponsiveness: what does it mean? *Eur Respir J*. 2008;32:1118–1119.
- [26] Aubier M, Cockcroft DW: Bronchial hyperreactivity other than that seen in asthma. *Rev Mal Respir*. 1994;11:179–187.
- [27] Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP: Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. *Eur Respir J*. 1999;14:63–73.
- [28] Sohn SW, Chang YS, Lee HS, Chung DH, Lee CT, Kim YH, Kim YK, Min KU, Kim YY, Cho SH: Atopy may be an important determinant of subepithelial fibrosis in subjects with asymptomatic airway hyperresponsiveness. *J Korean Med Sci*. 2008;23:390–396.
- [29] van den Nieuwenhof L, Schermer T, Heijdra Y, Bottema B, Akkermans R, Folgering H, van Weel C: Are asymptomatic airway hyperresponsiveness and allergy risk factors for asthma? A longitudinal study. *Eur Respir J*. 2008;32:70–76.
- [30] Andersson P: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. Pattern of response in relation to immunization regimen. *Allergy*. 1980;35:65–71.
- [31] Arimura A, Asanuma F, Kurosawa A, Harada M: Contribution of thromboxane A2 to the antigen-induced immediate asthmatic response mediated by IgG1 antibody by augmentation of bronchial responsiveness in guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. 1994;111:339–345.
- [32] Griffiths-Johnson D, Jin R, Karol MH: Role of purified IgG1 in pulmonary hypersensitivity responses of the guinea pig. *J Toxicol Environ Health*. 1993;40:117–127.
- [33] Bidon JC, Vu AT, Blin M, Gogny M, Souilem O, Jondet A: Effect of guinea-pig purified immunoglobulin G1 on the responsiveness of tracheal, aortic, vas deferens and ileum smooth muscles. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:1246–1253.
- [34] Ro JY, Buckner CK, Brendel JK, Fishleder RI, Graziano FM: Influence of indomethacin and L-cysteine on histamine and peptidoleukotriene release from superfused tracheas taken from guinea pigs passively sensitized with IgG1 and IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:1150–1160.
- [35] Udem BJ, Buckner CK, Harley P, Graziano FM: Smooth muscle contraction and release of histamine and slow-reacting substance of anaphylaxis in pulmonary tissues isolated from guinea pigs passively sensitized with IgG1 or IgE antibodies. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131:260–266.
- [36] Perini A, Mota I: The production of IgE and IgG1 antibodies in guinea-pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology*. 1973;25:297–305.
- [37] Kukkonen AK, Savilahti EM, Haahtela T, Savilahti E, Kuitunen M: Ovalbumin-specific immunoglobulins A and G levels at age 2 years are associated with the occurrence of atopic disorders. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:1414–1421.
- [38] Schneider AM, Li F, Zhang X, Gordon JR: Induction of pulmonary allergen-specific IgA responses or airway hyperresponsiveness in the absence of allergic lung disease following sensitization with limiting doses of ovalbumin-alum. *Cell Immunol*. 2001;212:101–109.
- [39] Keen C, Johansson S, Reinholdt J, Benson M, Wennergren G: Bet v 1-specific IgA increases during the pollen season but not after a single allergen challenge in children with birch pollen-induced intermittent allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:209–216.
- [40] Nahm DH, Kim HY, Park HS: Elevation of specific immunoglobulin A antibodies to both allergen and bacterial antigen in induced sputum from asthmatics. *Eur Respir J*. 1998;12:540–545.
- [41] Peebles RS, Jr., Liu MC, Adkinson NF, Jr., Lichtenstein LM, Hamilton RG: Ragweed-specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluids and serum before and after segmental lung challenge: IgE and IgA associated with eosinophil degranulation. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101:265–273.
- [42] Pleass RJ, Lang ML, Kerr MA, Woof JM: IgA is a more potent inducer of NADPH oxidase activation and degranulation in blood eosinophils than IgE. *Mol Immunol*. 2007;44:1401–1408.
- [43] Nakagome K, Nagata M: Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:555–563.
- [44] Boulet LP, Prince P, Turcotte H, Lemiere C, Olivenstein R, Laprise C, Larivée P, Bégin P, Laviolette M: Clinical features and airway inflammation in mild asthma versus asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Respir Med*. 2006;100:292–299.
- [45] Nomura N, Yoshikawa T, Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, Fujimoto S: Induced sputum analysis in asymptomatic young adults with bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Respirology*. 2007;12:516–522.
- [46] Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, Warrington SJ, Renzetti L, Rames A, Bock JA, Boyce MJ, Hansel TT, Holgate ST, Barnes PJ: Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000;356:2149–2153.
- [47] Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V: Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:4–9.
- [48] Holloway JW, Beghe B, Holgate ST: The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1023–1032.
- [49] Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000;356:2144–2148.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] Humbles AA, Conroy DM, Marleau S, Rankin SM, Palframan RT, Proudfoot AE, Wells TN, Li D, Jeffery PK, Griffiths-Johnson DA, Williams TJ, Jose PJ: 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.