



ARCHIVOS DE BRONCONEUMOLOGIA

www.archbronconeumol.org



Original

Desarrollo de un modelo murino de inflamación y remodelación de vías respiratorias en asma experimental

Rebeca Fraga-Iriso, Laura Núñez-Naveira, Nadia S. Brienza, Alberto Centeno-Cortés, Eduardo López-Peláez, Héctor Vereá y David Ramos-Barbón *

Unidad de Investigación Respiratoria, Servicio de Neumología, Complejo Hospitalario Universitario, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), A Coruña, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de julio de 2008

Aceptado el 21 de enero de 2009

Palabras clave:

Asma
Modelos animales de enfermedad
Inflamación
Células caliciformes
Eosinófilos
Linfocitos
Mastocitos
Músculo liso
Matriz extracelular

RESUMEN

Introducción: La investigación de los mecanismos de enfermedad del asma y la identificación de nuevas dianas terapéuticas requieren modelos animales experimentales. En este trabajo presentamos los datos del desarrollo de un modelo murino de asma experimental que permite valorar de forma conjunta parámetros de inflamación y remodelación de las vías respiratorias mediante morfología cuantitativa.

Material y métodos: Se sensibilizó a ovoalbúmina a ratones Balb/c y se les realizó broncoprovocación con ovoalbúmina o excipiente 3 veces por semana durante 12 semanas.

Resultados: En el lavado broncoalveolar, los ratones del grupo de ovoalbúmina presentaron un incremento significativo de leucocitos totales, con una mediana (cuartiles 25–75) de $670,0 \text{ células/ml} \cdot 10^3$ (376,2–952,5), frente a $40,0 \text{ células/ml} \cdot 10^3$ (60,0–85,0) en controles ($p = 0,001$), y de las fracciones eosinófila y linfocitaria en recuento diferencial. En secciones sagitales de los pulmones inflados a presión estandarizada, estos ratones mostraron hiperplasia de células caliciformes en el epitelio respiratorio —reacción de ácido peryódico de Schiff: $53,89$ (36,26–62,84) frente a $0,66$ (0,00–1,06) células/mm² ($p < 0,001$)—, densa infiltración inflamatoria mononuclear y eosinófila —hematoxilina-eosina: $32,87$ (27,34–37,13) frente a $0,06$ (0,00–0,20) eosinófilos/mm² ($p = 0,002$)—, infiltración subepitelial por mastocitos —azul de toluidina: $2,88$ (2,00–3,28) frente a $0,28$ (0,15–0,35) mastocitos/mm² ($p < 0,001$)—, incremento de la masa de tejido contráctil —immunofluorescencia para alfaactina de músculo liso: $2,60$ (2,28–2,98) frente a $1,08$ (0,93–1,16), adimensional ($p < 0,001$)— e incremento del depósito de matriz extracelular (trícromico de Masson: $2,18$ (1,85–2,80) frente a $0,50$ (0,37–0,65), adimensional ($p < 0,001$)—.

Conclusiones: Los datos aportados configuran un modelo de asma experimental inducida por exposición alérgica prolongada, con desarrollo y evaluación integrada de inflamación y remodelación de vías respiratorias.

© 2008 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Development of a Murine Model of Airway Inflammation and Remodeling in Experimental Asthma

ABSTRACT

Keywords:

Asthma
Animal disease models
Inflammation
Goblet cells
Eosinophils
Lymphocytes
Mast cells
Smooth muscle
Extracellular matrix

Background and Objective: Experimental animal models are necessary for studying asthma disease mechanisms and for identifying new therapeutic targets. We present a murine model of experimental asthma that allows integrated, quantitative assessment of airway inflammation and remodeling.

Material and Methods: BALB/c mice were sensitized to ovalbumin (OVA) and challenged with OVA or vehicle 3 times per week for 12 weeks.

Results: On bronchoalveolar lavage, the OVA-sensitized mice had significantly higher total leukocyte counts, with a median (Q25–Q75) of $670.0 \text{ cells/mL} \times 10^3$ (376.2, 952.5) in comparison with $40.0 \text{ cells/mL} \times 10^3$ (60.0–85.0) in controls ($P = .001$), and higher eosinophil and differential lymphocyte counts. In sagittal sections of lungs inflated to a standard pressure, the OVA-sensitized animals showed goblet cell hyperplasia in the respiratory epithelium (periodic acid-Schiff staining, 53.89 [36.26–62.84] cells/mm² vs 0.66 [0.00–1.06] cells/mm², $P < .001$), dense mononuclear and eosinophilic inflammatory infiltrates (hematoxylin-eosin, 32.87 [27.34–37.13] eosinophils/mm² vs 0.06 [0.00–0.20] eosinophils/mm², $P = .002$), subepithelial infiltration by mast cells (toluidine blue, 2.88 [2.00–3.28] mast cells/mm² vs 0.28 [0.15–0.35] mast cells/mm², $P < .001$), increased contractile tissue mass (immunofluorescence analysis for α -smooth-muscle actin, 2.60 [2.28–2.98] vs 1.08 [0.93–1.16], dimensionless, $P < .001$) and enhanced

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: David.Ramos.Barbon@sergas.es (D. Ramos-Barbón).

extracellular matrix deposition (Masson's trichrome, 2.18 [1.85–2.80] vs 0.50 [0.37–0.65], dimensionless, $P < .001$).

Conclusions: Our dataset describes an experimental model of asthma which is driven by prolonged allergen exposure and in which airway inflammation and remodeling develop and are assessed together.

© 2008 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El asma es un problema creciente debido al aumento sostenido de su prevalencia durante las décadas más recientes y a la morbilidad, mortalidad y carga económica que comporta¹, por lo que existe unanimidad en que la dimensión de este problema ha aumentado. A pesar de los tratamientos actualmente disponibles, sigue habiendo una proporción de casos de asma grave y de difícil manejo. Por estas razones, hay un frente activo de investigación para mejorar el conocimiento de sus mecanismos patogénicos e identificar dianas terapéuticas o preventivas que puedan aportar nuevas estrategias al manejo de la enfermedad².

Los modelos animales representan un recurso esencial para la generación de nuevo conocimiento sobre mecanismos de enfermedad y constituyen parte imprescindible del puente traslacional entre la investigación básica y su proyección clínica. El conocimiento así conseguido revierte en nuevos abordajes terapéuticos, que pasan nuevamente por los modelos animales de enfermedad en su fase de desarrollo preclínico. En el asma, la mayoría de los datos en modelos animales se han generado en el ratón y la rata, con ciertas ventajas y limitaciones en cada especie^{3–5}. El diseño de los protocolos de estudio tiene gran variabilidad y los aspectos de la enfermedad que convenga investigar en cada caso pueden ser diferentes. En el caso del ratón, se ha aprovechado en parte la versatilidad de esta especie para la generación de animales transgénicos, pero en general se ha estudiado el efecto de estas modificaciones genéticas sin inducir respuestas inmunitarias que sirvan de soporte al modelo de la enfermedad⁴. A pesar de la tecnología disponible, son aún escasas las publicaciones en que se presentan mediciones cuantitativas de variables que valoren conjuntamente los fenómenos de inflamación y remodelación de las vías respiratorias. En este artículo presentamos los datos de la creación en nuestro laboratorio de un modelo murino de asma experimental basado en la exposición antigénica repetida a largo plazo, como modelo de cronicidad y gravedad, con desarrollo de inflamación y remodelación de las vías respiratorias, efectos que pueden medirse de forma cuantitativa. Este modelo general puede trasladarse a la investigación de objetivos

específicos en estudios futuros y adaptarse a la utilización de cepas transgénicas.

Material y métodos

Animales, sensibilización, broncoprovocación y procesamiento de pulmones

El diseño experimental se resume en la [figura 1](#). En los días 0 y 7 de cada experimento se sensibilizó a ratones Balb/c hembras (Harlan Interfauna Ibérica, SL, Sant Feliu de Codines, Barcelona, España) mediante la inyección intraperitoneal de 10 µg de ovoalbúmina (grado VI, Sigma-Aldrich, Madrid, España) adsorbida en suspensión de hidróxido de aluminio (Pierce Immunochemicals, Cultek SLU, Madrid, España) en suero salino tamponado con amortiguador fosfato salino (PBS). A partir del día 14 se les realizó una broncoprovocación mediante la instilación intranasal de 100 µg de ovoalbúmina diluida en PBS (grupo OVA; $n = 8$) o PBS (grupo control; $n = 8$). Se administraron 25 µl de solución en cada fosa nasal bajo anestesia ligera con sevoflurano (Sevorane[®], Abbott Laboratories SA, Madrid, España) 3 veces a la semana durante 12 semanas. A las 48 h de la última broncoprovocación, los ratones recibieron anestesia profunda con sevoflurano para efectuarles una traqueostomía e intubarlos con una sonda flexible Fistar de polipropileno de calibre 20 (Dotest SL, Barcelona, España). Se realizó un lavado broncoalveolar con 5 ml de PBS en fracciones de 1 ml y se separó la fracción celular para recuentos de leucocitos totales en hemocitómetro y recuento leucocitario diferencial en muestras citocentrifugadas, fijadas con metanol y teñidas con colorante de Wright-Giemsa. Tras recoger el lavado broncoalveolar, se perfundió el circuito vascular pulmonar a través del ventrículo derecho con ácido edético 2 mM en PBS y seguidamente se extrajo el bloque cardiopulmonar. Para su fijación los pulmones se inflaron por la cánula traqueal con formaldehído al 4%, a presión estándar de 25 cmH₂O, que se mantenía constante mediante una bomba y sistema de recirculación, durante 24 h. Seguidamente se seccionaron los pulmones

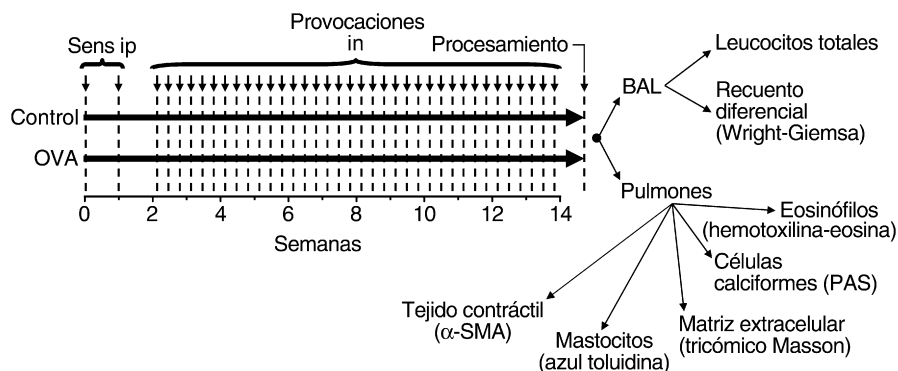


Figura 1. Diagrama del diseño experimental. Se sensibilizó a los ratones por vía intraperitoneal (Sens ip) con ovoalbúmina en los días 0 y 7. A partir del día 14, se les realizó una broncoprovocación por vía intranasal (in) con excipiente (grupo control) u ovoalbúmina (grupo OVA), 3 veces por semana durante 12 semanas. Posteriormente (48 h después de la última provocación) se obtuvo el lavado broncoalveolar (BAL) para el recuento leucocitario total y diferencial, y se fijaron los pulmones inflados a presión estandarizada. Se procesaron secciones pulmonares para distintas determinaciones, según se indica, y se realizó morfología cuantitativa. α -SMA: alfaactina de músculo liso, detectada mediante inmunofluorescencia; PAS: reacción del ácido peryódico de Schiff.

en porciones hiliar y periférica mediante un corte sagital medio y se incluyeron en parafina para estudio posterior. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Xunta de Galicia por cumplir con la Directiva 86/609 de la Unión Europea y los subsiguientes Real Decreto 1201/2005 y Orde de 15 de septiembre de 2006.

Determinaciones histopatológicas

Se tiñeron con hematoxilina-eosina secciones pulmonares de 4 μ m de grosor para valoración histopatológica cualitativa. Además se aplicaron las siguientes tinciones: reacción de ácido peryódico de Schiff, para la detección y recuento de células caliciformes productoras de moco; hematoxilina-eosina, para la identificación de eosinófilos; azul de toluidina, para mastocitos, y tricrómico de Masson, para la matriz extracelular. El tejido contráctil de las vías respiratorias (músculo liso y miofibroblastos) se detectó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra la alfaactina del músculo liso (α -SMA, clon 1A4, Sigma-Aldrich). Para este procedimiento, las preparaciones se desparafinaron, se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,2% y se bloquearon con Image-IT Signal Enhancer (Molecular Probes, Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, España). El anticuerpo 1A4 se combinó con una f(ab)' antiinmunoglobulina IgG2a de ratón marcada con el fluorocromo Alexa-488 (Zenon[®], Molecular Probes, Invitrogen) y se incubó 30 min sobre las preparaciones a una concentración de 2 μ g/ml. Seguidamente se procedió a la contratinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen), fijación en paraformaldehído al 4% y montaje de las preparaciones con ProLong[®] Gold (Molecular Probes, Invitrogen).

Morfología cuantitativa

En las preparaciones pulmonares se analizaron las vías respiratorias seccionadas transversalmente, de acuerdo con criterios de muestreo y normalización establecidos⁶. Se midieron en total una media ($\pm$ error estándar) de $13,8 \pm 1,4$ vías respiratorias por animal. Los recuentos celulares (células caliciformes, eosinófilos y mastocitos) se normalizaron dividiendo por el cuadrado del perímetro de la membrana basal (P_{BM}^2) de la vía respiratoria y se expresan como células/mm². El P_{BM}^2 se utiliza para la estandarización por tamaño de datos morfológicos en las vías respiratorias por considerarse la dimensión más constante de la vía respiratoria, independientemente de su grado de constricción o relajación⁶. Para su medición se captaron imágenes digitales calibradas de las vías respiratorias y se trazó el perímetro de la membrana basal utilizando una tableta digital y el programa de análisis de imagen AnalISIS[®] (Soft Imaging System GmbH, Olympus España SAU, Barcelona, España). Para la determinación cuantitativa del componente de matriz extracelular en las preparaciones teñidas con tricrómico de Masson, se construyó un algoritmo de extracción de color en el programa AnalISIS[®] y se procedió a la detección y medición de la superficie de las partículas resultantes en la pared de la vía respiratoria, mediante el mismo programa. En cada vía respiratoria, el sumatorio de la superficie de las partículas se normalizó dividiendo por P_{BM}^2 ; este índice se denominó "masa de matriz extracelular" (M_{MEX}). Para la medición estandarizada del tejido contráctil se extrajo digitalmente su señal inmunofluorescente y se procedió asimismo a la detección y medición de la superficie de las partículas resultantes, así como a la normalización del sumatorio de superficies por P_{BM}^2 . Aunque este parámetro se ha venido denominando "masa de músculo liso", optamos por la propuesta de algunos autores de denominarlo "masa de tejido contráctil" de la vía respiratoria

(M_{TC}), debido a que el anticuerpo 1A1, además de las células musculares lisas, detecta miofibroblastos que expresen la isoforma muscular de alfaactina. Los parámetros M_{MEX} y M_{TC} son índices adimensionales.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como mediana, cuartiles 25–75 y percentiles 10–90. Las comparaciones entre distribuciones de los grupos control y OVA se realizaron mediante la prueba de la t de Student para muestras independientes. Para la categorización de las vías respiratorias según su tamaño en pequeñas, medianas y grandes, se tomaron los valores de 0,8 y 1,5 mm como puntos de corte de la longitud del perímetro de la membrana basal. El análisis de los datos según la categoría de tamaño de las vías respiratorias se efectuó mediante análisis de la varianza de una vía, seguido de prueba post-ANOVA de la diferencia mínima significativa de Fisher. El tamaño del gradiente diferencial a lo largo de las vías respiratorias de distintos tamaños se estimó mediante el intervalo de confianza del 95% de la diferencia media (ΔIC del 95%). Donde correspondía, la fuerza de asociación entre variables se evaluó mediante el coeficiente de correlación r de Pearson. Se consideran estadísticamente significativas las diferencias o asociaciones con un grado de significación $p < 0,05$. Se

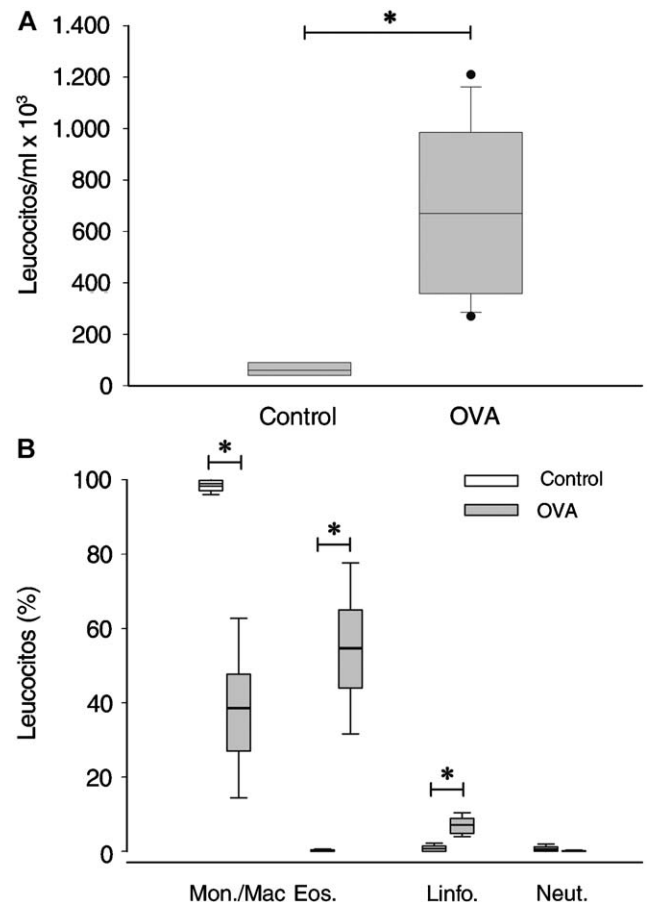


Figura 2. Recuentos celulares en lavado broncoalveolar. A: recuento leucocitario total en hemocitómetro. B: recuento diferencial basado en la tinción de Wright-Giemsa (monocitos/macrófagos, eosinófilos, linfocitos y neutrófilos). Los diagramas de cajas indican la mediana, los percentiles 25 y 75 (extremos de la caja) y los percentiles 10 y 90 (barras de error). OVA: ratones provocados con ovoalbumina. $p < 0,05$.

utilizaron los programas SPSS versión 15.0 y SigmaPlot versión 2000.

Resultados

Inflamación de las vías respiratorias

La celularidad total en el lavado broncoalveolar de los animales del grupo OVA fue 10,6 veces superior a la del grupo control, y el recuento leucocitario diferencial mostró que el infiltrado era eosinófilo y linfocitario (fig. 2). En las secciones de tejido, los animales del grupo OVA presentaron infiltración inflamatoria mononuclear y eosinófila, de localización principal en la lámina propia y adventicia de la pared de las vías respiratorias, y en los puentes de tejido conjuntivo entre vías respiratorias y vasos adyacentes de la circulación pulmonar (figs. 3A–C). Cuantitativamente (figs. 4A–B), los ratones del grupo OVA presentaron un incremento de eosinófilos en todas estas localizaciones, y de mastocitos en localización preferentemente subepitelial (fig. 3D).

Remodelación estructural

La remodelación estructural de las vías respiratorias (figs. 3E–P) se evaluó mediante el recuento normalizado de células caliciformes positivas para la reacción del ácido peryódico de Schiff en el epitelio bronquial, y mediante los índices M_{TC} y M_{MEX} , que reflejan, respectivamente, los componentes de crecimiento del músculo liso y fibrogénico de la remodelación. En los animales del grupo OVA se observó hiperplasia de células caliciformes, las cuales mostraron morfología indicativa de un estado funcional hipersecretor (figs. 3E–H y 4C). En comparación con el grupo control, los animales del grupo OVA mostraron asimismo un incremento significativo de los índices M_{TC} y M_{MEX} (figs. 3I–P y 5). En condiciones basales (grupo control), se observó a lo largo del árbol bronquial una progresión hacia una M_{TC} ligeramente superior cuanto menor era el tamaño de las vías respiratorias (ΔIC del 95% en las vías grandes frente a las pequeñas, $-1,14$ a $-0,77$; correlación de M_{TC} frente a P_{BM} : $r = -0,27$, $p = 0,012$) (fig. 6A). El incremento de M_{TC} en el grupo OVA, significativo en todas las categorías de tamaño de las vías respiratorias, fue globalmente de 2,56 veces la M_{TC} del grupo

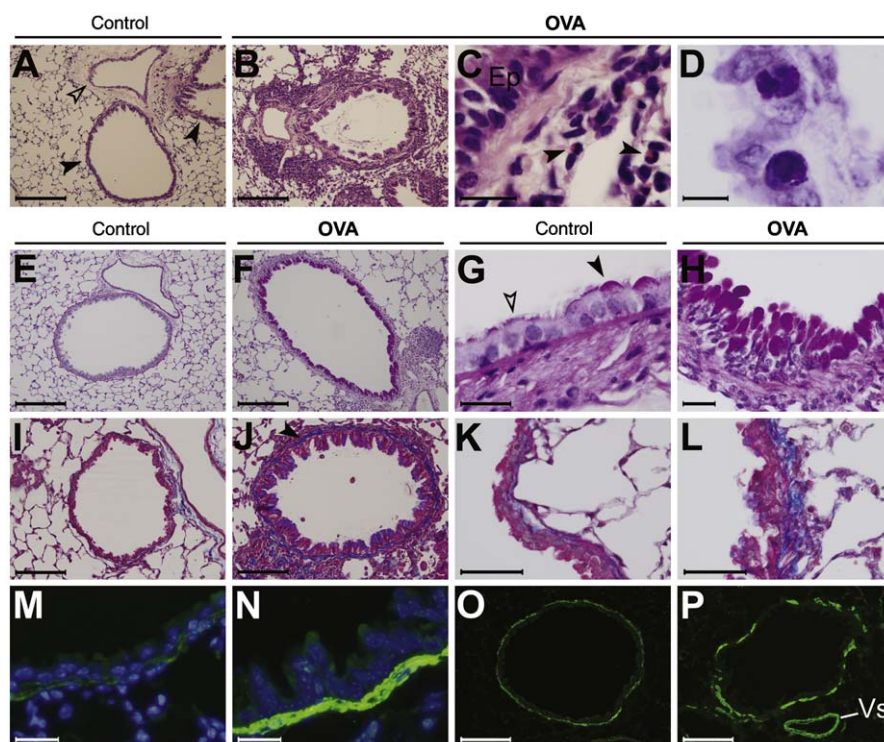


Figura 3. Microscopia. A–C: hematoxilina-eosina. A: imagen correspondiente a un ratón del grupo control, donde se muestran las vías respiratorias (puntas de flecha negras) y una arteria acompañante (punta de flecha transparente). B: vía respiratoria y vaso acompañante en ratón del grupo broncoprovocado con ovoalbúmina (OVA). Se observa un denso infiltrado inflamatorio en la vía respiratoria y perivascular. La pared de la vía respiratoria está engrosada y el lumen contiene restos de moco y detritus celulares. C: detalle que muestra el infiltrado inflamatorio mononuclear y eosinófilo (puntas de flecha). Ep: epitelio respiratorio. D: azul de toluidina. Se muestran 2 mastocitos en estrecha relación con el epitelio respiratorio, en animal OVA. En su citoplasma se aprecia contenido granular metacromático característico. E–H: reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS). E y F muestran, respectivamente, animales control y OVA; en este último se aprecia el abundante contenido epitelial con positividad PAS. G: detalle del epitelio respiratorio de un animal control. Los gránulos de material mucoso que son positivos a PAS se concentran en el polo apical de las células caliciformes (punta de flecha negra). El material secretado pasa a formar parte del fluido de superficie de las vías respiratorias, pudiendo apreciarse sobre las células ciliadas (punta de flecha transparente). H: en los animales OVA, se observa hiperplasia de células caliciformes con material acumulado positivo a PAS, lo que refleja un estado hipersecretor. I–L: tricrómico de Masson. El depósito de matriz extracelular fibrilar en el tejido conjuntivo se aprecia en color azul. I: ratón del grupo control; se observa matriz de densidad normal. J: ratón del grupo OVA, en el que se observa fibrosis subepitelial (punta de flecha). K y L: detalles de ratones de los grupos control y OVA; en estos últimos se aprecia el depósito incrementado de matriz extracelular. M–P: inmunofluorescencia para alfaactina de músculo liso (α -SMA; verde) y contratinción nuclear (azul). M y N: ratones de los grupos control y OVA respectivamente; en el último se observa el engrosamiento de la capa de músculo liso. O y P: extracción de la señal de α -SMA para la medición de la masa de tejido contráctil; ratones de los grupos control y OVA, respectivamente. P: se muestra también músculo liso vascular (Vs), que se excluye de las mediciones. Barras de escala: 200 μ m en A, B, E y F; 100 μ m en I, J, O y P; 50 μ m en K y L; 25 μ m en H, M y N; 20 μ m en C y G, y 10 μ m en D.

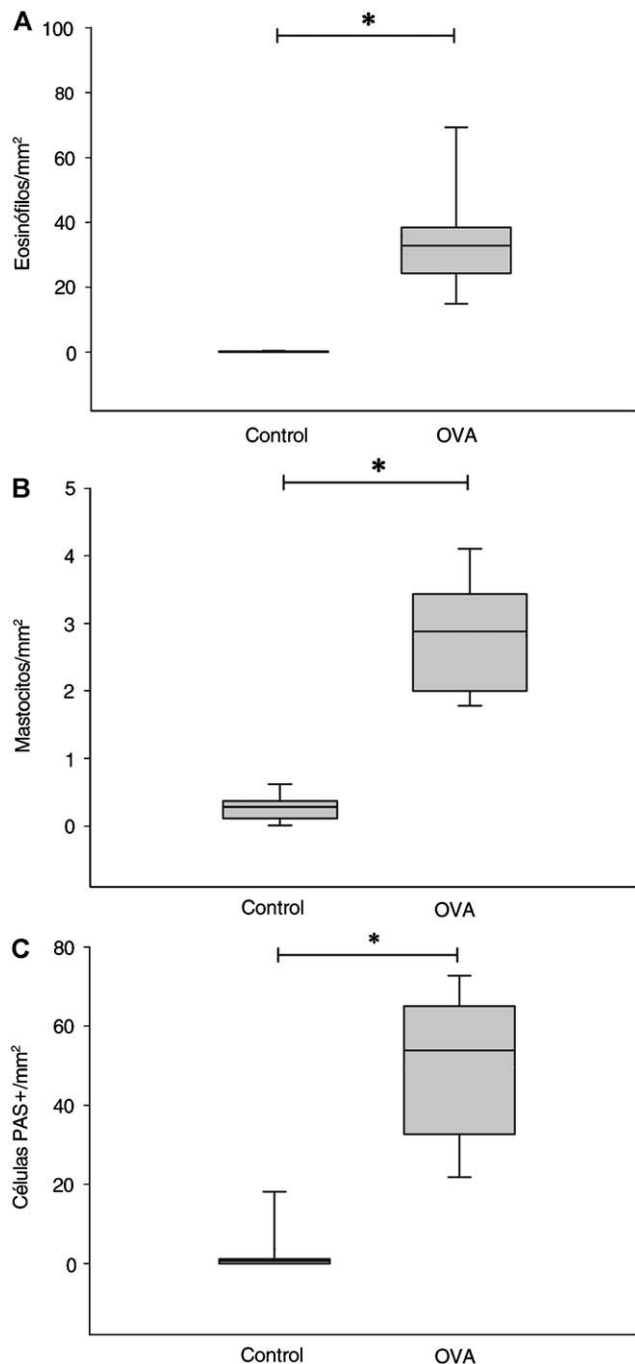


Figura 4. Eosinófilos (A), mastocitos (B) y células caliciformes positivas a la reacción del ácido peryódico de Schiff (C) en la pared de las vías respiratorias. Recuentos celulares normalizados por el cuadrado del perímetro de la membrana basal. Los diagramas de cajas indican en cada grupo del estudio la mediana, los cuartiles 25 y 75 (extremos de la caja) y los percentiles 10 y 90 (barras de error). OVA: grupo provocado con ovoalbúmina. * $p < 0,001$.

control, y se distribuyó de forma aproximadamente homogénea a lo largo del árbol bronquial ($p = 0,215$, ANOVA entre categorías de tamaño de vías respiratorias). En el grupo control, la M_{MEX} fue significativamente mayor en las vías respiratorias grandes y medianas que en las vías pequeñas (ΔIC del 95% en vías grandes frente a pequeñas, 0,35 a 1,02; correlación de M_{MEX} frente a P_{BM} : $r = 0,42$, $p = 0,002$) (fig. 6B), lo que indica que en condiciones fisiológicas el depósito relativo de matriz extracelular es superior en las vías respiratorias de mayor tamaño. El incremento de la

M_{MEX} en el grupo OVA fue 4,16 veces la M_{MEX} del grupo control y, al igual que el incremento de la M_{TC} , fue significativo en todas las categorías de tamaño de las vías respiratorias y se distribuyó homogéneamente a lo largo del árbol bronquial ($p = 0,051$ entre categorías de tamaño de vías respiratorias).

Discusión

De entre las diversas especies con que se han creado modelos de asma experimental, el ratón es la más utilizada por su coste-efectividad y su versatilidad⁵. Entre las necesidades actuales en el desarrollo de estos modelos, cabe mencionar la combinación de las tecnologías de modificación genética de organismos con modelos de asma creados a través de mecanismos inmunitarios que reflejen los de la enfermedad humana, y el análisis integrado de inflamación y remodelación, así como de los distintos componentes de la remodelación, con especial atención al músculo liso de las vías respiratorias. En este trabajo presentamos los datos de la creación de un modelo murino con inflamación y remodelación mediante la sensibilización intraperitoneal a ovoalbúmina seguida de provocación intranasal. El modelo dio lugar a una intensa infiltración inflamatoria mononuclear y eosinófila, a un aumento del número de mastocitos y a remodelación con incremento del número de células caliciformes productoras de moco, fibrosis subepitelial, incremento de la M_{TC} y un aumento global del grosor de la pared de las vías respiratorias a expensas de todas sus capas.

La ovoalbúmina es el antígeno más utilizado para inducir asma experimental alérgica. Sin embargo, se ha criticado su empleo sistemático por no ser un aeroalérgeno que produzca enfermedad humana por vía inhalada. Por esta razón, se han desarrollado modelos alternativos utilizando alérgenos tales como ácaros del polvo^{7,8} y polen⁹. En el modelo de Johnson et al⁸, se expuso a los animales a extracto de ácaros por vía intranasal exclusivamente durante un período de 7 semanas, sin sensibilización sistémica previa, con lo cual se reflejaba de manera bastante fiel el proceso de sensibilización a aeroalérgenos en humanos. No obstante, una ventaja especial de la ovoalbúmina es la disponibilidad actual de una cepa de ratones transgénicos (DO11.10) que expresan el receptor de células T específico para este antígeno¹⁰ en todos sus linfocitos T $CD4^+$, lo que proporciona una utilísima herramienta para el análisis de los mecanismos inmunológicos específicos de antígeno de las células T en el asma, mediante experimentos de transferencia adoptiva que explotan el modelo aquí presentado. Ésta es la razón fundamental que nos ha conducido a utilizar ovoalbúmina en nuestro modelo, aun asumiendo sus limitaciones.

Los protocolos de los distintos modelos varían según las hipótesis que convenga estudiar. Una simple broncoprovocación tras sensibilización sistémica puede inducir inflamación de las vías respiratorias, y de hecho la mayoría de los modelos desarrollados han sido de corta duración y se han centrado en el aspecto inflamatorio de la enfermedad. Sin embargo, el desarrollo de la remodelación requiere una exposición más prolongada, aspecto este que no se ha abordado en la mayoría de los modelos. En diversos estudios la exposición prolongada a ovoalbúmina dio lugar a un declive de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias, pero se trataba de protocolos basados en exposición primaria inhalada, sin sensibilización parenteral previa¹¹⁻¹³. Temelkovski et al¹⁴, por su parte, compararon la broncoprovocación prolongada mediante ovoalbúmina con o sin sensibilización intraperitoneal previa. La exposición primaria en el aparato respiratorio ocasionó un declive de la respuesta, resultado que coincidía con lo observado en los estudios anteriores. Sin embargo, la broncoprovocación prolongada tras la sensibilización intraperitoneal condujo a una inflamación sostenida y a cambios

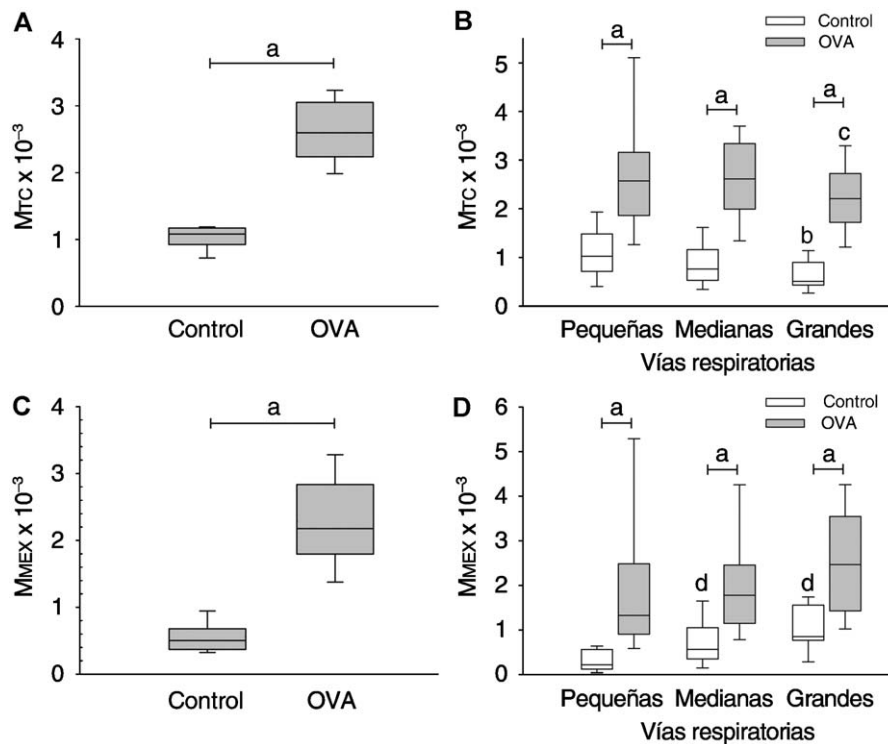


Figura 5. Incremento de masa de tejido contráctil (M_{TC}) y masa de matriz extracelular (M_{MEX}) en la remodelación de las vías respiratorias. A y C: M_{TC} y M_{MEX} , respectivamente, en los grupos del estudio. B y D: distribución de M_{TC} y M_{MEX} , respectivamente, según la categoría de tamaño de las vías respiratorias en cada grupo. Los diagramas de cajas indican la mediana, los percentiles 25 y 75 (extremos de la caja) y los percentiles 10 y 90 (barras de error). OVA: grupo provocado con ovoalbúmina. ^a $p < 0,001$.

^b $p = 0,005$ frente a vías respiratorias pequeñas en el grupo control.

^cDiferencia intermedia frente a vías respiratorias pequeñas en el grupo OVA.

^d $p < 0,001$ frente a vías respiratorias pequeñas en el grupo control.

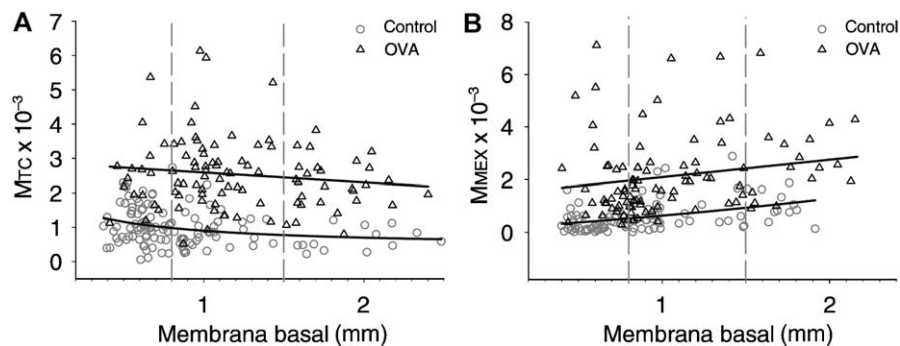


Figura 6. Nubes de dispersión de los valores de masa de tejido contráctil (M_{TC} , A) y masa de matriz extracelular (M_{MEX} , B) en las vías respiratorias, según su tamaño, medido por el perímetro de la membrana basal. Las líneas verticales discontinuas indican los puntos de corte de las categorías de tamaño pequeño, mediano y grande de las vías respiratorias. Las líneas de regresión corresponden, respectivamente, a los grupos control (inferior) y broncoprovocado con ovoalbúmina (OVA; superior) en cada panel.

estructurales. En esta misma línea, McMillan y Lloyd¹⁵ observaron inflamación persistente y remodelación tras un protocolo de sensibilización intraperitoneal y broncoprovocación repetida hasta una duración total de 55 días. Este conjunto de trabajos indica que la exposición primaria a ovoalbúmina en el aparato respiratorio induce tolerancia inmunológica, mientras que la broncoprovocación prolongada tras sensibilización intraperitoneal conduce a enfermedad alérgica con inflamación persistente y remodelación. En nuestro estudio hemos utilizado la sensibilización intraperitoneal y establecido el protocolo de broncoprovocación repetida más prolongado de que tenemos conocimiento, con la finalidad de simular en el ratón la cronicidad de la enfermedad humana y estimar los efectos máximos en un modelo de asma

grave. En contraste con el desarrollo de tolerancia observado tras la exposición primaria en tracto respiratorio a ovoalbúmina es interesante que, en el modelo de Johnson et al⁸, donde se utilizó extracto de ácaro en esta modalidad, se desarrolló inflamación y remodelación. Un aspecto deficiente en todos estos modelos es el estudio integrado de la respuesta alérgica en la vía aérea superior y los pulmones. Algunos autores han subrayado la importancia de desarrollar modelos que permitan analizar la interrelación y evolución conjunta de la rinitis alérgica y el asma, y han creado en este sentido sus propios modelos^{16,17}.

Hay que reseñar algunos aspectos observados en nuestro modelo. Recientemente se ha documentado la microlocalización de mastocitos en el espesor del músculo liso bronquial de los

pacientes con asma¹⁸ y se ha dado importancia a las potenciales implicaciones fisiopatológicas de este hallazgo. En nuestro modelo los mastocitos, en número incrementado, se distribuyeron en la región subepitelial y ocasionalmente en localización intraepitelial o en la adventicia, pero no observamos mastocitos en la capa de músculo liso o en contacto con ella. La ausencia de este fenómeno debe interpretarse con cautela, dado que en el ratón el tamaño celular está proporcionalmente menos disminuido que el conjunto de estructuras anatómicas. En consecuencia, el espesor de la capa de músculo liso de las vías respiratorias del ratón puede ser insuficiente para albergar mastocitos en su interior, pero la actuación directa sobre el músculo de mediadores de mastocitos situados a corta distancia es aún factible. En segundo lugar, consideramos que la hiperplasia de células caliciformes, concepto reflejado en la literatura médica a partir de tinciones que detectan el moco, puede ser en parte el resultado de un estado hiperfuncional de estas células, las cuales pueden no identificarse fácilmente en animales controles o en personas sin asma. Un examen a una alta magnificación en los animales controles induce a pensar que las células caliciformes, en su estado fisiológico normal, mantienen un flujo equilibrado entre la producción de moco y su secreción, por lo que acumulan muy escasas cantidades de moco en su citoplasma. En los animales con asma experimental las células caliciformes presentan un citoplasma extremadamente distendido e ingurgitado de contenido mucoso, lo que hace que estas células sean particularmente visibles. El elevado número de estas células hipertróficas podría indicar que hay un proceso hiperplásico, pero aún no se ha determinado de forma cuantitativa la contribución de la proliferación celular a la metaplasia mucosa. Por último, respecto de la M_{TC} y su incremento, es interesante comentar que este índice adimensional tiene en los ratones controles el mismo valor que el observado en la rata¹⁹ y el caballo²⁰, lo que sugiere que la cantidad de músculo liso normalizada por el tamaño de la vía respiratoria es una constante que se conserva entre especies. La magnitud del incremento de la M_{TC} en los ratones con asma experimental resultó asimismo equiparable al que se observa en la rata y en los caballos con *heaves*, una enfermedad alérgica obstructiva y crónica que se presenta de forma natural. Respecto de la distribución de la M_{TC} en las vías respiratorias de diferentes tamaños, ésta se aproximó en los controles a una constante, al igual que en el caso de la rata y el caballo. Llama la atención, sin embargo, que el incremento de la M_{TC} en los ratones del grupo OVA se distribuyera de forma homogénea a lo largo del árbol bronquial, mientras que en la enfermedad inducida en un modelo de rata o en la *heaves* del caballo crece exponencialmente hacia las vías respiratorias más periféricas. Este comportamiento diferente puede estar relacionado con las diferencias anatómicas y probablemente funcionales que hay entre el árbol de las vías respiratorias del ratón y el de especies mamíferas de mayor tamaño⁴.

En conclusión, los datos aquí presentados corresponden al desarrollo inicial de un modelo de inflamación y remodelación que servirá de base para estudios futuros. La evolución conceptual de la patogenia del asma desde broncoconstricción a inflamación y remodelación, junto con datos clínicos que apuntan a la pertinencia de guiar el manejo del asma "según la remodelación" y la necesidad del desarrollo preclínico de nuevos agentes farmacológicos "antirremodeladores", demanda la maduración de modelos de enfermedad experimental que se sustenten sobre una base inmunológica y aborden de forma integrada la medición de variables cuantitativas de inflamación y remodelación. Los

modelos de estas características deben servir de base para posibilitar la explotación con proyección traslacional de las técnicas de modificación genética de organismos.

Financiación

Estudio financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, fondos CP04/00313 y PI05/2478. D. Ramos-Barbón tiene un contrato de investigador del Sistema Nacional de Salud (FIS,CP04/00313). R.Fragalriso y L.Núñez Naveira son perceptoras, respectivamente, de una ayuda predoctoral de formación en investigación (FIS,PI05/00171) y un contrato posdoctoral de perfeccionamiento Sara Borrell(FISCD05/00250).

Bibliografía

- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004;59:469-78.
- Ramos-Barbón D. Investigación básica en asma: ¿hacia dónde nos dirigimos?. *Arch Bronconeumol*. 2006;42:613-5.
- Cortijo J. Modelos experimentales de asma. Aportaciones y limitaciones. *Arch Bronconeumol*. 2003;39:54-6.
- Ramos-Barbón D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;27:3-22.
- Torres R, Picado C, De Mora F. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:141-52.
- James AL, Hogg JC, Dunn LA, Pare PD. The use of the internal perimeter to compare airway size and to calculate smooth muscle shortening. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138:136-9.
- Lambert AL, Winsett DW, Costa DL, Selgrade MK, Gilmour MI. Transfer of allergic airway responses with serum and lymphocytes from rats sensitized to dust mite. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1991-9.
- Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:378-85.
- Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Álvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, et al. Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1076-86.
- Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo. *Science*. 1990;250:1720-3.
- Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology*. 1981;42:409-17.
- Sedgwick JD, Holt PG. Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology*. 1985;56:635-42.
- Swirski FK, Sajic D, Robbins CS, Gajewska BU, Jordana M, Stampfli MR. Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 2002;169:3499-506.
- Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolized allergen. *Thorax*. 1998;53:849-56.
- McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:497-507.
- Hellings PW, Hessel EM, Van Den Oord JJ, Kasran A, Van Hecke P, Ceuppens JL. Eosinophilic rhinitis accompanies the development of lower airway inflammation and hyper-reactivity in sensitized mice exposed to aerosolized allergen. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:782-90.
- Hellings PW, Ceuppens JL. Mouse models of global airway allergy: what have we learned and what should we do next?. *Allergy*. 2004;59:914-9.
- Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002;346:1699-705.
- Ramos-Barbón D, Presley JF, Hamid QA, Fixman ED, Martin JG. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest*. 2005;115:1580-9.
- Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:382-8.