

ARTICULO ORIGINAL – ORIGINAL ARTICLE

Expresión de receptor clase II (Rabbit Leucocyte Antigen class II) en células de la mucosa laríngea de conejos sensibilizados y desafiados por vía inhalatoria con Ovalbúmina

Drs. Ana Inés Cases, Norberto David Bassan, Gustavo Krumrick, Miguel Vinuesa

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Superi 247, Rosario, Argentina.

**E-mail: vinuesa@cidoc-unr.com.ar*

Acta Científica Estudiantil 2009; 7(2):94-99.

Recibido 19 Abr 09 – Aceptado 20 Jun 09

Resumen

El objetivo del proyecto llevado a cabo, fue identificar mediante técnicas inmunohistoquímicas las poblaciones de células RLA II positivas (Rabbit Leucocyte Antigen II - homólogo al HLA II humano) en mucosa laríngea de animales sensibilizados con albúmina de huevo por vía subcutánea y desafiados por vía inhalatoria. Así mismo, también se analizaron las modificaciones en la cantidad y distribución de dichas células.

Palabras Clave: Conejo; RLA II; ovoalbúmina, mucosa laríngea.

(fuente: DeCS Bireme)

Introducción

Los mamíferos superiores han desarrollado un sistema linfático altamente organizado en el aparato gastrointestinal y en el tracto respiratorio que permite el muestreo, captación y presentación del antígeno para el inicio de la respuesta inmune mucosa. Este sistema es denominado MALT (Tejido Linfático Asociado a Mucosas), y conforma el órgano linfoide más grande del sistema inmune en los mamíferos. A su vez, se encuentra dividido en distintos compartimentos entre los cuales encontramos NALT, Tejido Linfático Asociado a Nasofaringe. (1)

Este órgano se presenta entonces, como vastas áreas del sistema inmune mucoso caracterizado por presentar colecciones difusas de células linfáticas en la lámina propia del aparato respiratorio y otros sitios mucosos, constituyendo una enorme red interrelacionada con el sistema inmunológico. (2)

La superficie epitelial del aparato respiratorio corresponde a una superficie de aproximadamente 500 metros cuadrados, la cual se encuentra continuamente expuesta a una gran cantidad de antígenos presentes en los 10.000 litros de aire medioambiental inhalado. La vía aérea se convierte así, en una importante ruta de sensibilización para antígenos aerotransportados.

La laringe es una estructura hueca constituida por un esqueleto de cartílagos, en la cual a partir de su luz se describe una mucosa caracterizada por un epitelio de revestimiento biseriado cilíndrico ciliado con células caliciformes y una lámina propia de tejido conectivo laxo con glándulas mucosas, rica vascularización y presencia de mastocitos, eosinófilos y linfocitos.(3)

En conejo, la administración por vía intraperitoneal o subcutánea de albúmina de huevo u ovoalbúmina (OVA), produce elevados niveles de IgE anti-OVA. El posterior contacto del antígeno a nivel de la mucosa con células inmunocompetentes (linfocitos y mastocitos sensibilizados), desencadena una cascada de hechos que conduce a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica, con degranulación mastocitaria, edema e infiltración de eosinófilos.

En trabajos anteriormente realizados en íleon, apéndice y ciego, demostramos la utilidad del conejo como modelo para el estudio de la respuesta anafiláctica local. Constatamos altos títulos de IgE anti-OVA como respuesta a la sensibilización. Así mismo hallamos modificaciones cuantitativas significativas en las poblaciones celulares (linfocitos B, linfocitos T y mastocitos y células enteroendócrinas) en animales sensibilizados y, sensibilizados y desafiados con OVA por vía oral.

El objetivo del proyecto llevado a cabo, fue identificar mediante técnicas inmunohistoquímicas las poblaciones de células RLA II positivas (Rabbit Leucocyte Antigen II - homólogo al HLA II humano) en mucosa laríngea de animales sensibilizados con albúmina de huevo por vía subcutánea y desafiados por vía inhalatoria. Así mismo, también se analizaron las modificaciones en la cantidad y distribución de dichas células.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron conejos neocelandeses machos, adultos jóvenes, los que se mantuvieron en el bioterio del Laboratorio de Histoquímica de la Cátedra de Histología y Embriología, con alimento balanceado comercial (17% de proteína como máximo y 12% de fibra como mínimo, libre de albúmina) y agua ad-libitum hasta su sacrificio, de acuerdo a las condiciones aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas (providencia resolutive de Decanato 1883/96)

Grupos Experimentales

Los animales se distribuyeron al azar conformando 3 grupos experimentales simultáneos, donde cada uno de ellos recibió el tratamiento que se describe a continuación.

Grupo 1: Control

Grupo 2: Sensibilizado por vía subcutánea con OVA (OVA sc)

Grupo 3: Sensibilizado por vía subcutánea y desafiado por vía inhalatoria con OVA (OVA sc/OVA)

Sensibilización y Desafío

Los conejos del grupo 2 y 3 se inocularon por vía subcutánea en dos oportunidades, y con 15 días de diferencia, con 2 ml de una suspensión de 70 µg de OVA en 30 mg de alumbre/ml.

Luego en el día 30, los animales del grupo 3 fueron nebulizados, previo sacrificio, con una suspensión de 50 mg de OVA en 50 ml de PBS.

Los animales se sacrificaron por sobredosis de éter sulfúrico, de acuerdo a las consideraciones aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas, e inmediatamente se obtuvieron las muestras del órgano requeridas para los estudios.

Obtención de las muestras y Fijación de los tejidos

Se obtuvieron 6 muestras de laringe de cada animal.

Las muestras para inmunohistoquímica se sumergieron en medio líquido protector para congelación rápida (OCT), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C . Luego se cortaron a $8\text{ }\mu\text{m}$ con crióstomo, realizándose 5 cortes de cada una de ellas.

Técnica Inmunohistoquímica

El anticuerpo monoclonal empleado para la identificación de la población celular de conejo deseada, fue obtenido en ratones y se detalla a continuación:

□ Ratón anti-conejo RLA-DR (RDR34, BALB/c IgG2b, Pharmingen, San Diego, California, U.S.A). El RDR34 identifica la molécula de clase 2 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad del conejo RLA-DR y la RLA-DQ. Se lo considera marcador de activación en células presentadoras de antígeno.

Para revelar las células inmuno-marcadas se utilizó Histostain Kit, Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A, que emplea avidina-biotina como amplificador y peroxidasa como enzima. La diaminobenzidina (DAB) se empleó para visualizar la peroxidasa.

Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA)

La producción de IgE anti-OVA se semicuantificó por medio de la prueba de anafilaxia cutánea pasiva (PCA).

Para ello se realizaron pooles de sueros de tres conejos por grupo experimental; estos sueros se obtuvieron a partir de sangre extraída en el momento del sacrificio. Se realizaron diluciones de los mismos en PBS: 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 y se inyectaron 0,05 ml de cada dilución del pool vía SC en el lomo de ratas Wistar de 8 semanas de vida. Las inoculaciones se realizaron en dos zonas paralelas a ambos lados de la línea media dorsal. Luego de 30 minutos las mismas ratas se inocularon por vía endovenosa con una solución de 1 mg de OVA en 0,5 ml de PBS conteniendo 1% de Azul de Evans. Con cada pool de sueros se inocularon no menos de dos ratas. Las zonas inyectadas con los pooles de sueros de conejos que adquirieron color azul se consideraron positivas para IgE, pero solo si el diámetro de la mancha superaba los 5 mm para diluciones iguales o menores a 1/160.

Análisis de Resultados

Las células positivas se identificaron y cuantificaron en 10 unidades (áreas) x 400 aumentos en lámina propia de laringe en cada muestra y se analizaron estadísticamente.

Resultados

Los resultados obtenidos a partir de la utilización de la técnica inmunohistoquímica para la detección de receptor de Clase II se muestran en el cuadro I y en las Figuras I y II.

Cuadro I. Expresión de receptor clase II (Rabbit Leucocyte Antigen class II) en células de la mucosa laríngea de conejos de los distintos grupos experimentales utilizados.

Los resultados se expresan como media y desvío estándar de células por campo de mayor aumento (x400).

Receptor RLA II	G1 Control	G2 Sensibilizado SC	G3 Desafío inhalatorio
Media	4,0	5,1	7,8 [#]
DE	1,3	1,8	1,7

#G1, G2 vs G3 p<0,001.

Figura I. Células RLA II positivas en mucosa laríngea de conejos sensibilizados y desafiados por vía inhalatoria (x 200 aumentos).

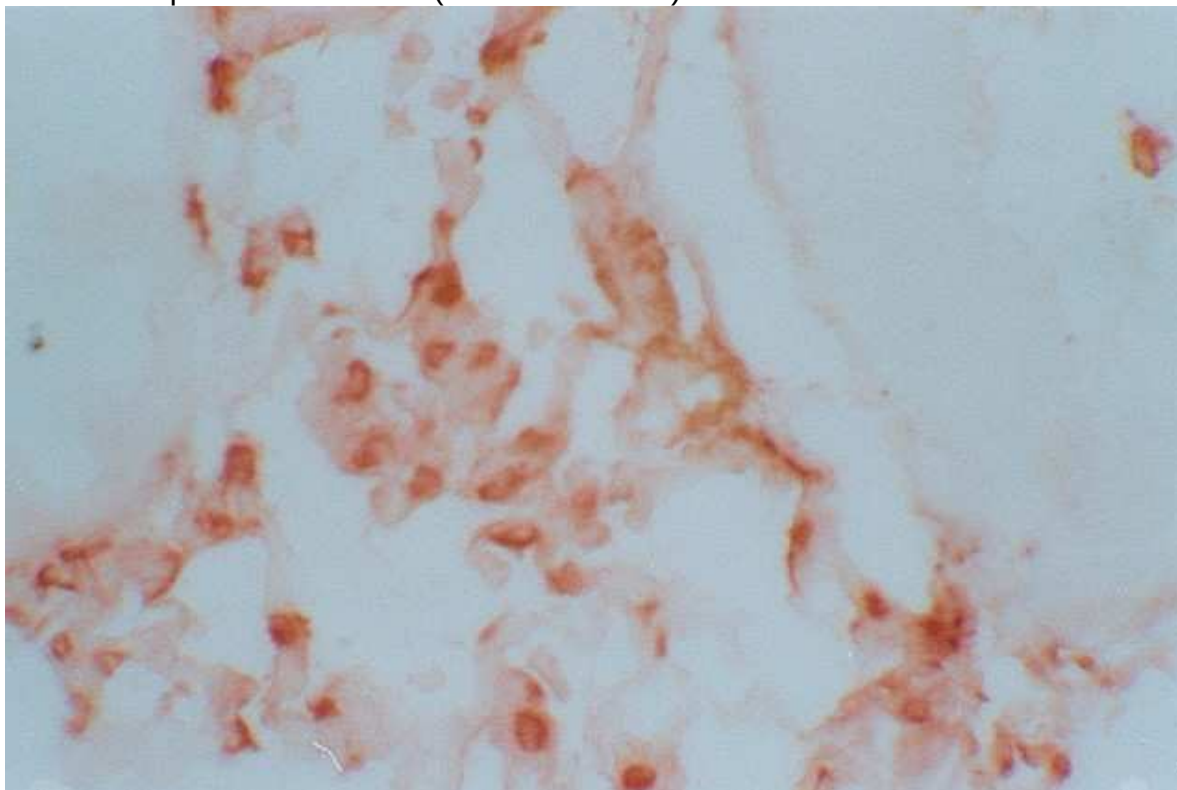
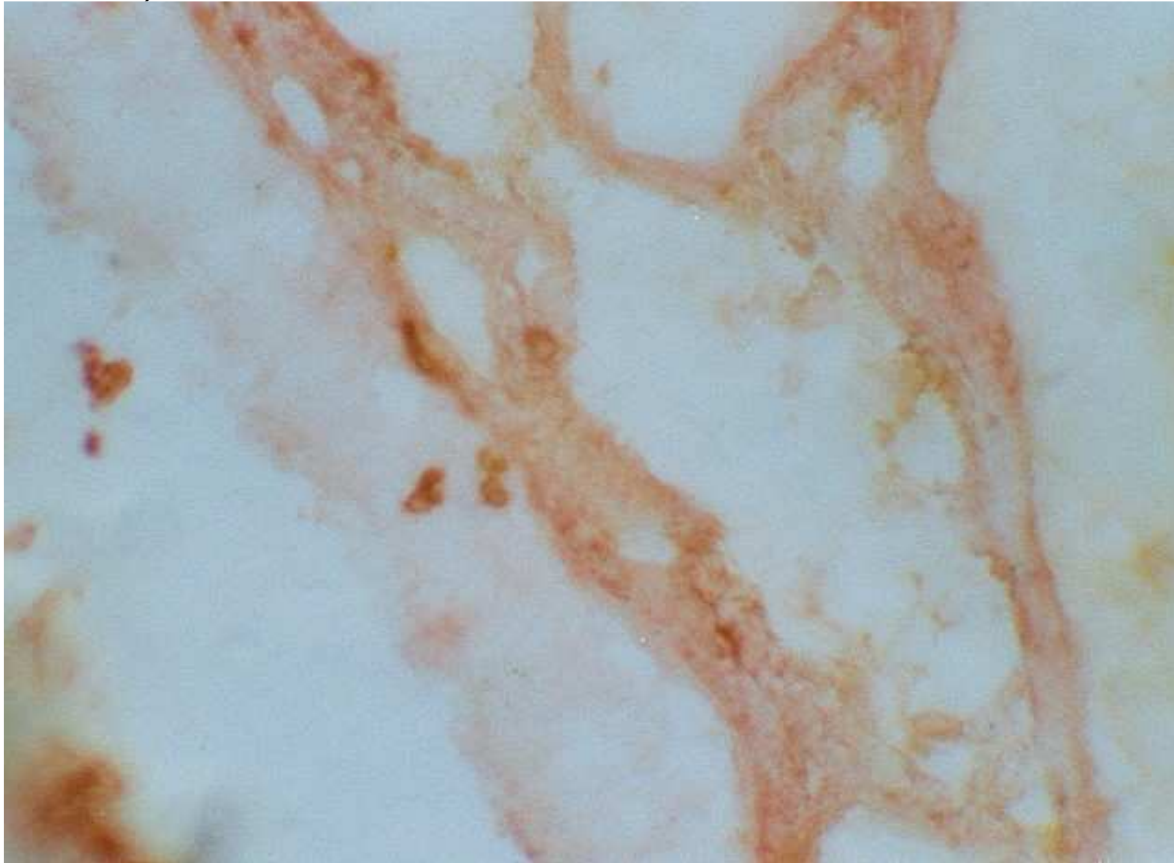


Figura II. Células RLA II positivas en mucosa laríngea de conejos control (x 200 aumentos).



Discusión

En el presente estudio utilizamos ovoalbúmina que es un antígeno soluble que administrado por vía subcutánea en conjunción con el adyuvante hidróxido de aluminio (ALUM) es capaz de generar IgE específica. Mediante el test de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) demostramos elevados niveles de IgE anti-OVA en los grupos de conejos sometidos a sensibilización subcutánea, observándose completa negatividad en todas las diluciones del grupo control. En trabajos previos se ha demostrado que en conejos el único anticuerpo anafiláctico es la IgE, a diferencia de lo ocurrido en murinos y otras especies donde los mastocitos poseen receptor Fc para IgG.

La lámina propia laríngea está conformada por una estructura de tejido conectivo laxo rico en linfocitos, asociada a un epitelio biseriado cilíndrico ciliado con células caliciformes. Estas estructuras conforman una interfase que se incluye en el sistema inmune de mucosas.

En este trabajo demostramos un aumento en el número de células que expresan el RLA II en los conejos del grupo sensibilizado y desafiado por vía inhalatoria. En esta variante de desafío el antígeno en cuestión contacta en forma directa con la mucosa laríngea desencadenando una cascada de eventos que conduce a la inflamación alérgica.

Estudios posteriores serán necesarios para obtener mayores datos que nos permitan conocer otros aspectos de la respuesta inmune mucosa y su relación con la respuesta alérgica inmediata.

Referencias

1. Mayer, L. Local and systemic regulation of mucosal immunity. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 81-85.
2. Brandtzaeg P; Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004; 25(11): 570-577.
3. Tlaskalova-Hogenova H; Tuckova L; Lodinova-Zadnikova R; Stepankova R; Cukrowska B; Funda DP; Striz I; Kozakova H; Trebichavsk I; Sokol D; Rehakova Z; Sinkora J; Fundova P; Horakova D; Jelinkova L; Sanchez D. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Allergy Immunol* 2002; 128(2): 77-89.
4. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997; 57: 311-340.
5. Elson CO. Advances in mucosal immunity. *Drugs* 1997; 54(1): 13-14. *Eur Respir J* 2000 Dec; 16(6): 1091-4.
6. Thaminy A; Lamblin C; Perez T; Bergoin C; Tonel AB; Wallaert B. Increased frequency of asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in nonasthmatic patients with food allergy. *Clin Exp Immunol* 1984 May; 56(2): 302-10
7. Calvanico NJ; Ambegaonkar S; Geoghegan WD; Hanly WC. Analysis of rabbit lung lavage immunoglobulins during the course of pulmonary inflammation induced with aerosolized antigen. *Am Rev Respir Dis* 1982 Jul; 126(6): 80-5.
8. Butler JE; Swanson PA; Richerson HB; Ratajczak HV; Richards DW; Suelzer MT. The local and systemic IgA and IgG antibody responses of rabbits to a soluble inhaled antigen: measurement of responses in a model of acute hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2000 Dec; 16(6): 1091-4.
9. Bassan N; Vinuesa M; Pérez F; Roma S; Bernardi S; Lagrutta M. Mastocitos Azul Anciano positivos en la mucosa del ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina. *Analecta Veterinaria* 1998; 18: 15-20.
10. Bassan N; Vinuesa M; Roma S; Pérez F. Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52(3): 249-256.
11. Bassan N; Vinuesa M; Roma S; Pérez F. Modificaciones inmunopatológicas de la mucosa rectal en un modelo animal de alergia alimentaria. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97(9): 629-636.
12. Ganter P; Jolles G. Formulaire: Colorations topographiques générales. En: *Histochimie normale et pathologique*- Gauthier Villars editores. París 1970; 15: 1418-1424.

Declaración de Intereses: No se declararon conflictos de intereses.