

Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por los antígenos de las heces del murciélago

A. Alonso, K. Mouchián, J.F. Albónico, C.H. Pionetti, M. Potenza y M.L. Bignone

Centro de Alergia. Hospital de Clínicas. Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN

Se presentan los hallazgos obtenidos en un modelo experimental en cobayos a los cuales se les aerosolizó durante 12 semanas una solución conteniendo una glucoproteína proveniente de un extracto de heces de murciélago cuya obtención se logró merced al pasaje por una columna de Sephadex G-150. Semanalmente y luego de la aerosolización se obtuvieron muestras de sueros y de tejidos para la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgE específicos por diversas técnicas inmunológicas y el análisis histopatológico de las lesiones inducidas. El grupo control sólo recibió un aerosol de PBS. Resultó positiva la presencia de los anticuerpos al igual que diversos grados de lesiones pulmonares diagnosticadas como una neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgica extrínseca por el trípode constituido por los infiltrados intersticiales, los granulomas solitarios no caseosos y la bronquiolitis celular (tipo IV de Gell & Coombs). Estos hallazgos permiten especular acerca de las posibilidades que tiene este antígeno para desarrollar otros fenómenos inflamatorios pulmonares diferentes a los IgE dependientes en especial en aquellos naturalistas, espeleólogos, biólogos o científicos que se introduzcan en cavernas o lugares altamente contaminados con el mismo.

Correspondencia:

Prof. Dr. A. Alonso
Centro de Alergia. Hospital de Clínicas
Avda. Córdoba 2351
1120 - Buenos Aires. Argentina
Tel.: 54-011-5950-8651
Fax: 54-011-5950-8655
E-mail: alehclin@med.uba.ar

Palabras clave: Neumonitis por hipersensibilidad. Murcielaquina. IgG e IgE específicas. Infiltrados intersticiales. Granulomas no caseosos.

ABSTRACT

A bat feces extract was able to induce the synthesis of specific IgG in rabbits and IgE in atopics. These findings were corroborated by skin tests, RAST and RAST-inhibition. Nowadays, data concerning the experimental induction of hypersensitivity pneumonitis using a glycoprotein of bat feces are presented. This antigen was aerosolized for inhalation by adult guinea pigs for 12 weeks to detect specific serum IgM, IgG and IgE antibodies as well as sensitized T-CD4 cells. Histopathological studies of the lungs showed interstitial infiltrates of macrophages and lymphocytes, cellular bronchiolitis and single non-necrotizing granulomas from the seventh to the ninth weeks. From the tenth week to the end of the experiment the lesions of the lungs progressively worsened. The results from this animal model suggest that the chronic contact with the bat feces' antigen can induce other inflammatory lung reactions than those IgE dependant.

Key words: Hypersensitivity pneumonitis. Bat feces. Specific IgG & IgE antibodies. Interstitial infiltrates. Non caseous granulomata.

INTRODUCCIÓN

En una publicación anterior, se demostró que los antígenos de las heces del murciélago (*Tadarida brasiliensis*) eran capaces de inducir la síntesis de anti-

cuerpos específicos IgG en conejos e IgE en humanos a los que se les atribuyó algún papel en el 25 % de los que sufrían el síndrome rinitis/asma¹.

En este trabajo se presenta la inducción de una neumonitis por hipersensibilidad en cobayos con dichos antígenos para valorar la respuesta inmune específica por la vía inhalatoria habida cuenta de las limitaciones éticas para emplear un antígeno nuevo en la prueba desencadenante bronquial (challenge) y valorar los hallazgos en el BAL de asmáticos atópicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígeno

Las heces de los murciélagos (BAT) se obtuvieron de los taparrollos o de las partes internas de las persianas de enrollar de las viviendas de los pisos altos de las casas de departamentos habitados por nuestros pacientes. Su aspecto macroscópico es el de granitos de arroz de color negro con un olor desagradable. Cada partícula fue tomada con una pinza metálica y guardada en un recipiente estéril a -20°C . Cuando se obtuvieron 20 g, el material fue procesado según la técnica de Frugoni-Hansen para los aero-alergenos, con ligeras modificaciones. Así, en vez de emplear la solución de Coca (CINa: 5 g; CO_3HNa : 2,75 g; fenol: 4 g; agua destilada 1.000 ml) se utilizó la de Stier-Hollister (CINa: 7 g; glicerina: 46 ml; agua destilada 47 ml, a razón de 5 g del extracto por cada 100 ml de la solución extractora) para evitar un posible efecto deletéreo del fenol sobre las proteínas del extracto a obtener². Con la técnica de Bradford se valoraron las proteínas mientras que las hexosas fueron determinadas por el método del indol empleando una mezcla de galactosa y manosa como estándar al medir en el espectrofotómetro a 470 nm de densidad óptica^{3,4}.

Fraccionamiento por columna de Sephadex

Se utilizó una columna de Sephadex G-150 de 780 mm por 22 mm que se equilibró y se eluyó con buffer fosfato y CINa 0,15 M a pH 8 y a 4°C . Tres y medio mililitros del BAT (70 mg de proteínas) fueron sembrados y alícuotas de un mililitro del eluido fueron recogidas en el colector de fracciones con una velocidad de 20 ml/min. Las proteínas de cada eluido fueron determinadas por absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro⁴.

Técnicas inmunológicas

La presencia de IgG e IgM en los cobayos aerosolizados se detectó por las técnicas de Ouchterlony y de Boyden. En la primera, los sueros no se diluyeron mientras que en la segunda fueron diluidos hasta 1:1024. El BAT fue concentrado hasta 10 mg/ml de proteínas puras por preevaporación. El MIF diagnóstico LT sensibilizados realizando los experimentos por duplicado y empleando concentraciones variables del BAT (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$). Todos los animales fueron testificados con 100 μg del BAT en 0.10 ml de PBS en una zona rasurada del dorso 48 hs antes de su sacrificio midiéndose la induración producida. El Ovary-Bier determinó la presencia de anticuerpos citofílicos en los sueros sin diluir de los cobayos mientras que el BAT (10 mg/ml) se empleó con el azul de Evans por la vía venosa⁵⁻⁹.

Animales de experimentación

Treinta y seis cobayos adultos de 250-300 g de peso, vírgenes de todo tratamiento, fueron aerosolizados durante 12 semanas con el BAT. Cada grupo de 6 animales fue colocado en una cámara de vidrio de un volumen de 6.000 cm^3 conectada a un nebulizador ultrasónico que aerosolizaba los 10 ml del antígeno en partículas de 3 μ en 30 minutos. El antígeno estaba compuesto por 1 ml del concentrado (11 mg) diluido en 9 ml de PBS esterilizado por filtros Millipore de 0.22 μ . Este procedimiento se repitió 6 veces para completar los 36 cobayos del grupo experimental. El grupo control recibió la aerosolización diaria de 10 ml de PBS estéril. Semanalmente, una hora después de finalizada la aerosolización, un grupo de 3 animales fue sacrificado bajo anestesia profunda con éter etílico, sangrados a blanco, extraídos sus órganos para el estudio histopatológico, fraccionados los sueros en tubos a -20°C y los linfocitos separados con un gradiente de Ficoll-Hypaque. Idéntico procedimiento se desarrolló con los cobayos del grupo control.

Histopatología

Se realizó sobre los cortes de pulmón, riñón, bazo e hígado de los cobayos de los grupos experimental y control. Los órganos fijados con Bouin, se montaron en parafina, se cortaron en secciones de 6 μ y se colorearon con hematoxilina-eosina, PAS, azul de toluidina al 1 % y tricómico de Mallory. La evidencia histopatológica de una alveolitis alérgica extrínseca se basó en el trípode constituido por la bronquiolitis celular, los infiltrados intersticiales y los granulomas solitarios no caseosos. Se valoró la presencia de células

gigantes multinucleadas, de células espumosas intraalveolares, de neumonía organizada, de bronquiolititis obliterante y de fibrosis intersticial, clasificando la intensidad de la inflamación desde 1 + hasta 5 +.

Así, el grupo de 1 + involucró a la bronquiolititis celular con infiltrados de linfocitos y plasmocitos de intensidad diversa a lo largo de los bronquiolos sin invadir los sacos alveolares mientras el epitelio bronquiolar permaneció intacto con escaso exudado en la luz. Las lesiones codificadas con 2 + mostraron infiltrados intersticiales linfoplasmocitarios que variaron desde moderados a densos con paredes alveolares engrosadas.

El tipo de 3 + agregó los granulomas solitarios, no necrotizantes repartidos desordenadamente en el parénquima, en las paredes bronquiolares y alveolares; nunca éstos granulomas involucraron a los vasos sanguíneos. Las lesiones rotuladas con 4 + presentaron acúmulos de histiocitos en los alvéolos que imitaban granulomas (histiocitos epitelioides) con o sin células gigantes, cristales de colesterol, cuerpos de Schaumann e inclusiones asteroides. Por fin, las lesiones de 5 + asociaron neumonía organizada, bronquiolititis obliterante y fibrosis intersticial.

Las microfotografías obtenidas y expuestas fueron tomadas con un fotomicroscopio con aumentos de 100X, 400X y 1000X y con una película Kodakcolor de 100° Asa.

RESULTADOS

El fraccionamiento por columna de Sephadex G-150 del BAT permitió obtener un pico proteico entre los tubos 42 y 57 y tres picos de hexosas en los tubos 13, 36 y 48. El Bradford determinó los siguientes contenidos proteicos: el BAT: 20 mg/ml y los tubos 42-57: 15 mg/ml.

El indol estableció los siguientes contenidos de azúcares: el BAT: 50 mg %; el tubo 13: 13,8 mg %; el tubo 36: 9 mg % y el tubo 48: 26 mg % (figs. 1 y 2).

Los resultados del Ouchterlony, Boyden, Ovary-Bier, intradermorreacción tardía e histopatología pulmonar se resúmen en la tabla I (figs. 3 y 4).

No se observaron lesiones en los pulmones, riñones, bazo e hígado de los animales controles. En el grupo experimental, no se observaron cambios durante las 2 primeras semanas de aerosolización aunque aumentó el patrón descamativo de los bronquiolos. A partir de la 3.^a semana se observó una bronquiolititis celular con predominio linfoplasmocitario. Este infiltrado intersticial varió desde moderado a denso (2 +) con engrosamiento de las paredes alveolares incrementándose desde la 6.^a hasta la 9.^a semanas. Desde la 10.^a semana hasta el final del expe-

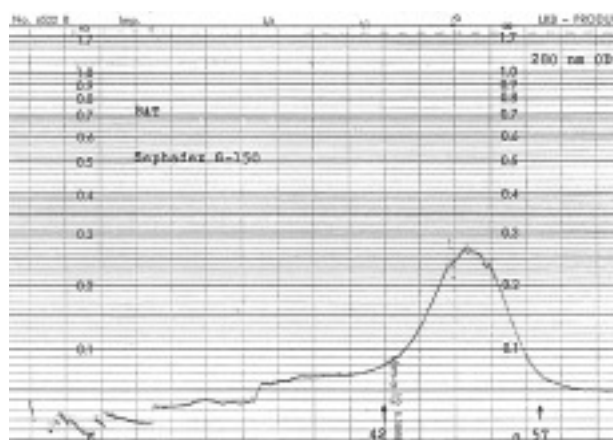


Figura 1.—Fraccionamiento del BAT por columna de Sephadex G-150. Se observa un pico proteico entre los tubos 42 y 57.

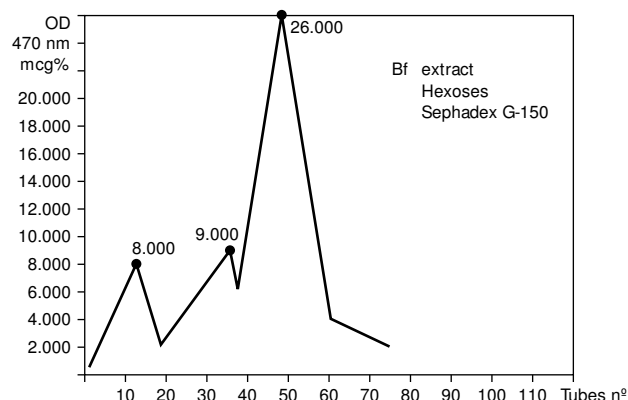


Figura 2.—Gráfico de las concentraciones de hexosas en los diferentes tubos del fraccionamiento.

Tabla I

Respuestas humoral y celular de los cobayos aerosolizados con BAT

Semanas	Respuesta humoral			Respuesta celular		
	Ouchterlony	Boyden	Ovary	MIF	Prueba cutánea	Lesión pulmonar
1. ^a	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2. ^a	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3. ^a	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4. ^a	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+
5. ^a	Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.	+
6. ^a	Neg.	1/16	Neg.	+	+	++
7. ^a	+	1/32	Neg.	+	+	+++
8. ^a	+	1/128	Neg.	+	+	+++
9. ^a	+	1/128	+	+	+	+++
10. ^a	+	1/256	+	+	+	++++
11. ^a	+	1/256	+	+	+	++++
12. ^a	+	1/512	+	+	+	++++

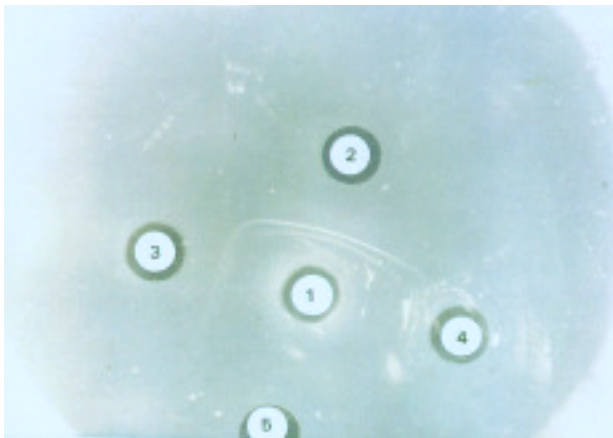


Figura 3.—Prueba de Ouchterlony. 1) suero de cobayo anti-BAT; 2) BAT; 3) fracción 42-57; 4) pelo de murciélago; 5) pelo de rata. Se observan bandas de precipitación entre el suero y sus antígenos con identidad total.

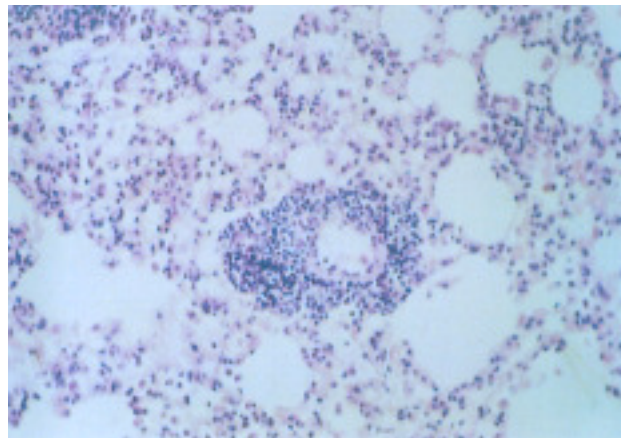


Figura 5.—Histopatología del pulmón de cobayo con infiltrados celulares en los tabiques interalveolares y alrededor de los bronquiolos (HE x 100).

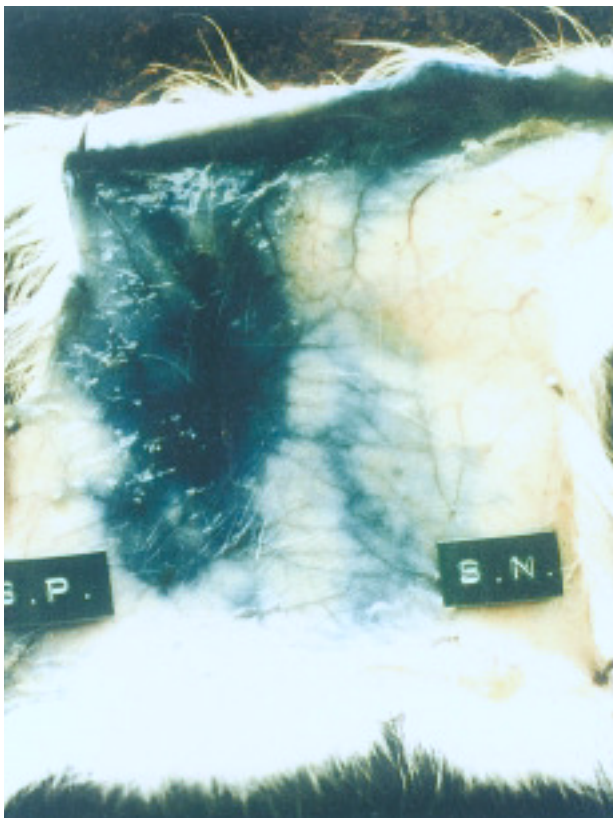


Figura 4.—Test de Ovary-Bier. SP: suero de cobayo anti-BAT; SN: suero normal de cobayo. Se observa una reacción positiva (manchas azules) con el suero anti-BAT.

rimento, las lesiones pulmonares empeoraron progresivamente. Los infiltrados se hicieron más densos (3 + y 4 +) con la aparición de los granulomas solitarios no caseosos (tabla I).

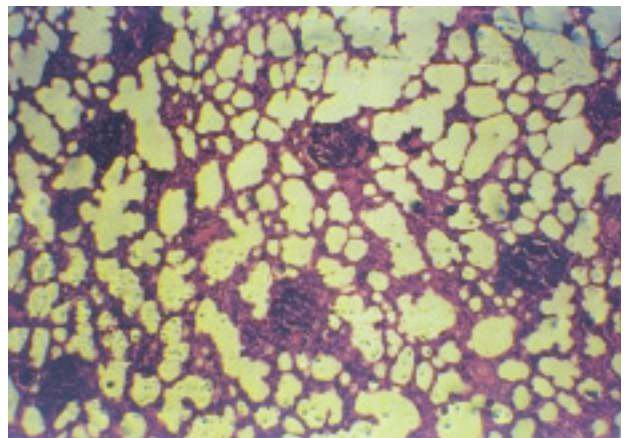


Figura 6.—Histopatología del pulmón de cobayo donde se observan granulomas solitarios no caseosos e infiltrados intersticiales (HE x 400).

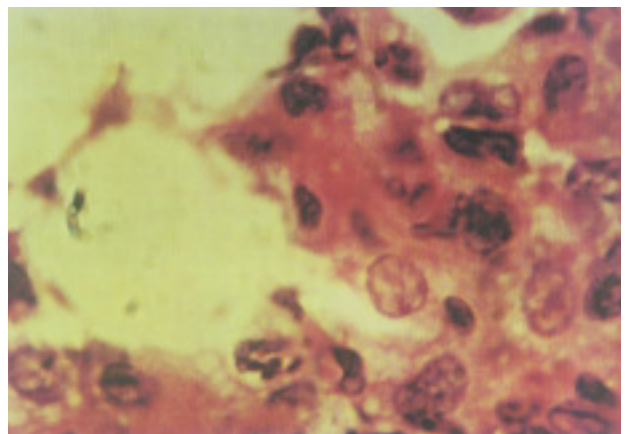


Figura 7.—Histopatología del pulmón del cobayo donde se observan células espumosas ("foamy") en el infiltrado de los tabiques alveolares (HE x 1000).

El azul de toluidina no reveló células metacromáticas (mastocitos) tanto en los pulmones del grupo experimental como del control; el PAS evidenció un engrosamiento de las membranas basales, especialmente, en los pulmones y en los riñones (figs. 5-7).

DISCUSIÓN

Los extractos de heces están involucrados en varias condiciones inmunopatológicas, tales como, el pulmón del colombófilo, aunque los epitopes antígenicos precisos que gatillan la hipersensibilidad no estén muy bien precisados aún. En este caso, las heces de los murciélagos que se refugian en los taparrollos de las ventanas de los departamentos de Buenos Aires demuestra poseer inmunogenicidad en un modelo animal, así como, en los humanos atópicos que sufren de rinitis perenne y de asma bronquial.

Estos asertos están avalados por la detección de anticuerpos específicos IgG y de linfocitos y macrófagos en el modelo animal y de IgE en los pacientes estudiados y no en los animales o humanos de los grupos controles. Por otra parte, este antígeno no experimentó ninguna reactividad cruzada con el pelo del murciélago, el suero y los pelos y escamas de las ratas y las heces de las palomas. Se está desarrollando el análisis del antígeno por SDS-PAGE, Western-blot e isoelectroenfoque al igual que el estudio de sus propiedades proteásicas y gelatinolíticas y su posible vinculación con la inmunogenicidad. El suero del murciélago es muy difícil de conseguir por su escasa cantidad en el mamífero, pero se hace imprescindible el lograrlo para valorar si la IgA, que pudiera haber en esas heces (IgA-secretoria) pudiera jugar un papel en la antigenicidad y/o contaminación del extracto total¹⁸.

El BAT mostró un único pico proteico con un elevado contenido de azúcares, tal como, reveló el estudio cromatográfico. Esta composición glucoproteica refuerza nuestra sospecha que las proteínas del suero del murciélago podrían jugar algún papel en su inmunogenicidad, al igual que, otras estructuras o sustancias pertenecientes al intestino del quiróptero tal como se sostiene con la tropomiosina. El papel de las endotoxinas de la flora intestinal del murciélago debería evaluarse en atención a recientes hallazgos vinculados con su influencia en el paradigma TH1-TH2. Su rol en el desarrollo de lesiones pulmonares por inhalación crónica (modelo animal) se presta para una mayor profundización de la investigación.

Estos datos confirman que el BAT podría comportarse como un antígeno inhalatorio de ciertos habitats domiciliarios, que, en el 25 % de una población

de atópicos respiratorios sería capaz de producir anticuerpos IgE cuya especificidad fuera asegurada por el RAST-inhibición.

Las pruebas desencadenantes nasales y bronquiales (challenge) no se realizaron por razones éticas hasta conocer más acabadamente las propiedades físicoquímicas del antígeno.

Como fuere, el epitelio, la orina y la saliva de los murciélagos deberán ser estudiados para valorar su participación en la generación de anticuerpos específicos, pensando en aquellos laboratoristas que están expuestos permanentemente en la confección de los cultivos celulares para las vacunas antirrábicas⁹.

Es posible que esta sea la primera comunicación mediante la cual se documentan los hallazgos obtenidos luego de la exposición crónica de cobayos al BAT con la producción de una típica alveolitis alérgica extrínseca (neumonitis por hipersensibilidad) y pruebas cutáneas tardías positivas con induración.

La síntesis de anticuerpos específicos del isotipo IgG y la eventual formación de complejos inmunes BAT- IgG- anti- BAT podrían incrementar la activación de los macrófagos a través de sus receptores para los Fc (CD16, CD32 y CD64), y, así contribuir a la formación de los granulomas solitarios no caseosos típicos de la lesión avanzada de la 10.^a semana del experimento.

La ausencia de células metacromáticas (mastocitos) en esta inflamación pulmonar resulta llamativa habida cuenta de su participación en otros modelos inflamatorios crónicos y autoinmunes conocidos (v.g. artritis reumatoidea, encefalomiелitis alérgica experimental y enfermedades desmielinizantes) como elemento perpetuador y amplificador de la respuesta a través de la liberación de mediadores vasoactivos y citoquinas proinflamatorias¹⁰⁻¹⁷.

Los atópicos con hobbies o profesiones ecológicas como espeleólogos, arqueólogos y naturalistas se hallan en riesgo de sufrir un ataque de asma ante la inhalación brusca de grandes cantidades del antígeno en las cuevas de las montañas, si estuvieran sensibilizados previamente¹⁹.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso A, Irañeta S, Rodríguez S, Scavini L, Rodríguez S. Bat feces as an indoor allergen. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1998;8:365-9.
2. Frugoni C. Preparación de alérgenos. En: Hansen K, Wiener M eds. *Alergia Clínica*. Barcelona: Salvat, 1970; p. 586-92.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
4. Dische A. The indol method. En: Glick D ed. *Methods of Biochemical Analysis*. New York: Academic Press, 1958;2:200-10.

5. Crowle A. Precipitin antibodies. En: Immunodiffusion. New York: Academic Press, 1961:46-67.
6. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 1958;5:1-9.
7. Boyden SV. The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera. *J Exp Med* 1951; 93:107-12.
8. Ray NB. Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages. *J Virol* 1995;69:764-70.
9. Ovary Z. Immediate reactions of the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interaction. *Progr Allergy* 1958;5:459-65.
10. Alonso A, Albónico JF, Mouchián K, Pionetti CH. Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of *Periplaneta americana*. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1992;2:263-7.
11. Fink JN. Hypersensitivity Pneumonitis. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF eds. CV. Mosby Co., 1983:1085.
12. Salvaggio JE. Hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:558-63.
13. Coleman A, Colby T. Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis. *Amer J Surg Pathol* 1988;12:514-9.
14. Upadrashta B, Croom J. T-cell localization in rabbit models of acute and chronic experimental hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:821-6.
15. Leatherman JW. Lung T-cell in hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med* 1984;100:390-6.
16. Alonso A, Rodríguez SR, Rodríguez SM, Mouchián K, Albónico JF, Irañeta SG. Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of *Rhizopus nigricans*. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997;7:103-9.
17. Alonso A, Pionetti CH, Scavini L, Mouchián K. Immunochemical of the antigens involved in the pigeon breeder's disease. *Allergol et Immunopathol* 1988;XVI:347-52.
18. Irañeta S, Duschak V, Rodríguez SM, Alonso A. Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts. *J. Invest Allergol Clin Immunol* 1999;9:235-40.
19. El-Ansary EH, Tee RD. Respiratory allergy to inhaled bat guano. *The Lancet* 1987;(8528):316-8.