

Alteraciones patológicas producidas por la inoculación subcutánea de los extractos alergénicos de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney* en ratas y ratones

Fuentes D¹, González Navarro B¹, González Torres Y¹, Aldana L¹, Arteaga ME¹, Bada AM¹, Labrada A² y Bellido de Luna AT¹

¹Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB. Finca Tirabeque, Km 21/2 Carretera al Cacahual, Bejucal, La Habana, Cuba. e.Mail: ict@cenpalab.inf.cu

²Centro Nacional de Biopreparados, La Habana, Cuba

Recibido 11 de Marzo de 2002 / Aceptado 7 de Agosto de 2002

Resumen: Los extractos alergénicos se emplean en tratamientos de inmunoterapia, ya que son capaces de inducir cambios inmunológicos en la respuesta alérgica, reduciendo los síntomas clínicos de la enfermedad. Estas preparaciones terapéuticas se aplican directamente al hombre, por lo que nos propusimos como objetivo de este trabajo evaluar los cambios patológicos producidos por la administración subcutánea durante 28 días del extracto alergénico de *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en ratas y ratones. Se encontraron lesiones circunscritas en la hipodermis del lugar de aplicación y caracterizadas por abundantes células redondas: linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, agrupadas fundamentalmente alrededor de los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, así como algunos leucocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilo y células cebadas. Se concluye que la administración repetida de los extractos alergénicos de *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en ratas y ratones no provoca alteraciones patológicas.

Palabras clave: Alergenos, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides siboney*, ratas, ratones.

Abstract: Pathological changes due to subcutaneous administration of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergenic extracts in rats and mice. The allergenic extracts are used in immunotherapy treatments, because they are able to induce immunologic changes in the allergic response, significantly reducing the clinical symptoms of the illness. These therapeutic preparations are applied directly to man. The objective of this paper is to evaluate anatomopathologic changes due to subcutaneous administration by 28 days of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergenic extracts in mice and rats. Circumscribed lesions were found in hipodermis's application point and characterized by abundant round cells: lymphocytes, plasmatic cells and macrophages. This cells were grouped near nervous and sanguineous vessels. Some neutrophils leukocytes and mast cells were also observed. We concluded that repeated administration of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergenic extracts' in mice and rats did not provoke any pathological changes.

Key words: Allergens, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides siboney*, rats, mice.

Introducción

El interés de los ácaros como causas posibles de enfermedades alérgicas ha aumentado en las tres últimas décadas [1, 2]. La importancia de estos artrópodos como inductores de asma ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [3].

Los ácaros del polvo *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney* están distribuidos en todo el mundo, siendo más comunes en el polvo de las casas de climas tropicales y subtropicales [4], por lo que millones de personas están expuestos a ellos. En los Estados Unidos se ha demostrado que estas especies son comunes en el polvo de las casas [5], mientras que otros estudios realizados en algunos países de América Latina como: Argentina [6], Brasil [7], Colombia [8] y Venezuela [9] revelaron una alta prevalencia de asma, asociada directamente con la exposición a los alérgenos de los ácaros del polvo.

Extensos estudios realizados en Cuba han encontrado la presencia de ácaros en aproximadamente el 85 % de las muestras de polvo estudiadas, así como una gran sensibilización de los pacientes asmáticos a estos ácaros, determinada mediante pruebas en piel e IgE específicas [10, 11].

Teniendo en cuenta la gran difusión de estos ácaros y las posibles consecuencias de su acción sobre el hombre, resulta imprescindible la utilización de una vacuna contra ellos, mediante la inoculación de sus extractos alergénicos.

Los extractos alergénicos son obtenidos a partir del cultivo de ácaros en condiciones de laboratorio, están compuestos por una mezcla de proteínas de bajo y mediano peso molecular y son usados fundamentalmente para el diagnóstico y la terapia de pacientes con manifestaciones alérgicas [12,13].

Debido a que los extractos alergénicos constituyen preparaciones terapéuticas que se aplican directamente en el hombre, es necesario realizar los estudios de Toxicología Experimental, para detectar los efectos de su administración repetida en animales [14]. Por esas razones nos hemos propuesto como objetivo de este trabajo evaluar los cambios histopatológicos producidos por la inoculación subcutánea durante 28 días del extracto alergénico de *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en la piel de ratas y ratones.

Material y Métodos

El ensayo fue concebido como se estipula en las directrices de extractos alérgicos, para el registro de cualquier sustancia o componente relacionado [14,15].

Sustancia de ensayo

Este producto se obtiene a partir de la extracción en disolución de bicarbonato de amonio de las proteínas solubles del cultivo completo de ácaros *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney*; es sometido posteriormente a procesos de purificación, filtración esterilizante y liofilización y contiene de un 30 a un 50 % de proteínas y de un 10 a un 30 % de carbohidratos. Su actividad alérgica radica en la fracción proteica y es diluido para su uso en solución fosfato salina (PBS) con fenol al 0.4 % como conservante y albúmina humana al 0.03 % como esterilizante

Animales

Se emplearon 80 ratones NMRI (Cenp:NMRI) y 120 ratas Sprague Dawley (Cenp:SPRD) de ambos sexos, de 5-6 semanas y 4-6 semanas de edad, respectivamente, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), clínicamente sanos y SPF, los cuales se mantuvieron en período de adaptación de 7 días.

Condiciones de mantenimiento:

Todos los animales se alojaron individualmente en cajas plásticas de polipropileno (Tecniplast), y se mantuvieron en condiciones controladas, con temperatura: 22 ± 2 °C, humedad relativa: 65-80%, 12 cambios de aire/hora y un fotoperíodo de 12/12 horas.

Tanto a las ratas como a los ratones se les suministró alimento pelletizado, fórmula EMO 1001 (ALYco, CENPALAB, La Habana, Cuba) para un consumo promedio diario de 25 g y 5 g, respectivamente. El agua de bebida se administró a voluntad. Todos los materiales fueron esterilizados mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Dosificación

El ensayo se realizó con un solo nivel de dosis. La dosis administrada en cada inyección (0.5 ml) fue de 166.6 UB, 50 veces superior a la dosis terapéutica máxima propuesta para el hombre [14].

Evaluación del extracto alérgico de *Blomia tropicalis*

Los animales fueron divididos en grupos de 10 hembras y 10 machos cada uno, a los cuales se les aplicó el siguiente tratamiento:

- Grupo I: Ratones: 0.5 ml (166.6 UB) de extracto alérgico.
- Grupo II: Ratones: 0.5 ml de Diluyente (Control).
- Grupo III: Ratas: 0.5 ml (166.6 UB) de extracto alérgico.
- Grupo IV: Ratas: 0.5 ml de Diluyente (Control).
- Grupo V: Ratas: 0.5 ml de Solución Salina (Control Negativo)

Evaluación del extracto alérgico de *Dermatophagoides siboney*

Los animales fueron divididos en grupos de 10 hembras y 10 machos cada uno, a los cuales se les aplicó el siguiente tratamiento:

- Grupo I: Ratones: 0.5 ml (166.6 UB) de extracto alérgico.
- Grupo II: Ratones: 0.5 ml de Diluyente (Control).
- Grupo III: Ratas: 0.5 ml (166.6 UB) de extracto alérgico.
- Grupo IV: Ratas: 0.5 ml de Diluyente (Control).
- Grupo V: 0.5 ml de Solución Salina (Control Negativo)

Vía, lugar de administración y duración del ensayo

La administración se llevó a cabo por vía subcutánea. Las aplicaciones se realizaron detrás del área escapular, alternando en los pliegues derecho e izquierdo que se forman a ambos lados de la columna vertebral.

El tratamiento se aplicó diariamente a los animales durante los 28 días del ensayo.

Observaciones clínicas

El período de observación fue de 28 días. Se realizó observación clínica dos veces al día en horas de la mañana y la tarde. Las observaciones incluyeron, entre otras, cambios en: lugar de aplicación, piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrón de comportamiento.

Se prestó particular atención a la observación de temblores, convulsiones, diarrea, letargia, salivación, sueño y coma.

Exámenes de Patología

Al finalizar el estudio todos los animales fueron narcotizados con éter dietílico, posteriormente desangrados por la vena femoral y finalmente se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación se realizó necropsia completa de todos los animales, describiendo las lesiones anatomopatológicas macroscópicas encontradas.

En los estudios con ratones, se obtuvieron y pesaron los siguientes órganos: Hígado, Riñones, Bazo, Timo, Ovario/Testículo, Corazón y Pulmones.

Para el estudio histopatológico se procesaron los órganos: Bazo, Riñones, Hígado, Ovario/Testículo, Timo, Corazón, Pulmón, Encéfalo, Adrenales, Ganglio mesentérico y supraescapular, así como el lugar de inoculación y alejado de la inoculación de todos los animales; para lo cual se realizó la fijación en formol neutro al 10%, imbibición e inclusión en parafina, cortes y tinción con Hematoxilina-Eosina. Se utilizó un microscopio simple, Carl Zeiss.

Análisis estadístico

El análisis estadístico a los pesos de órganos se realizó por el paquete estadístico SPSS Windows [16] para un nivel de significación de $p < 0.05$, utilizando una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los datos se analizaron de manera independiente para cada sexo.

Resultados

Durante el desarrollo de la prueba no se observaron síntomas de toxicidad ni mortalidad en las ratas ni en los ratones.

El estudio de los pesos relativos de órganos (en relación con el peso corporal, %) de los ratones a los que se les aplicaron los extractos alérgicos de *B. tropicalis* y *D. siboney* durante 28 días (Tabla 1 y 2) demostró la no existencia de diferencias significativas en el Grupo Tratado con respecto al Grupo Control, excepto en el bazo de los machos ($p=0.001$) a los que se le aplicó extracto de *D. siboney*.

No se encontraron cambios significativos de expresión patológica durante la necropsia ni en el estudio histológico de los órganos Bazo, Riñones, Hígado, Ovario/Testículo, Timo, Corazón, Pulmón, Encéfalo, Adrenales, Ganglio mesentérico y supraescapular; tanto de las ratas como de los ratones, mientras que la

Tabla 1. Aplicación del extracto alérgico de *Blomia tropicalis* durante 28 días en ratones. Comportamiento del peso relativo de órganos (en relación con el peso corporal, %).

Sexo	Órgano	Control (n=10)		Tratado (n=10)	
		Media	D.E.	Media	D.E.
Hembras	Timo	0.28	0.07	0.31	0.07
	Bazo	0.50	0.09	0.45	0.09
	Hígado	5.40	0.34	5.86	1.51
	Riñones	1.47	0.05	1.44	0.09
	Corazón	0.54	0.05	0.52	0.06
	Pulmones	0.83	0.06	0.88	0.08
	Ovario	0.10	0.02	0.13	0.02
Machos	Timo	0.25	0.05	0.23	0.05
	Bazo	0.45	0.07	0.42	0.05
	Hígado	5.67	0.56	5.88	0.29
	Riñones	1.77	0.11	1.84	0.10
	Corazón	0.66	0.06	0.67	0.10
	Pulmones	0.76	0.11	0.80	0.06
	Testículo	0.41	0.05	0.44	0.15

Tabla 2. Aplicación de extracto alérgico de *Dermatophagoides siboney* durante 28 días en ratones. Comportamiento del peso relativo de órganos (en relación con el peso corporal, %).

Sexo	Órgano	Control (n=10)		Tratado (n=10)	
		Media	D.E.	Media	D.E.
Hembras	Timo	0.35	0.06	0.28	0.08
	Bazo	0.50	0.15	0.43	0.11
	Hígado	5.34	0.35	5.34	0.55
	Riñones	1.41	0.14	1.33	0.19
	Corazón	0.55	0.05	0.52	0.08
	Pulmones	0.68	0.08	0.71	0.05
	Ovario	0.10	0.02	0.13	0.02
Machos	Timo	0.24	0.02	0.21	0.04
	Bazo	0.36	0.06	0.48*	0.08
	Hígado	5.70	0.40	5.99	0.24
	Riñones	1.77	0.16	1.77	0.15
	Corazón	0.61	0.09	0.58	0.05
	Pulmones	0.70	0.14	0.72	0.04
	Testículo	0.41	0.05	0.44	0.15

*Diferencias significativas para $p<0.05$. Test no paramétrico U de Mann-Whitney.

observación microscópica de la piel reveló alteraciones circunscritas al punto de aplicación, las cuales no se evidenciaron en las muestras de piel alejadas del lugar de inoculación.

En ambas especies, el cuadro microscópico de la piel del lugar donde se inoculó el producto se caracterizó por la presencia de abundantes células redondas: linfocitos, células plasmáticas y macrófagos agrupadas en la proximidad de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (Figuras 1 y 2). Estos cambios se localizaron en la hipodermis, por debajo de la capa muscular, donde se apreció además una extensa área de tejido cicatrizal y algunos polimorfonucleares de tipo neutrófilo y células cebadas, así como ligera hemorragia en algunos casos.

Se realizó tinción especial con azul de toluidina para evidenciar las células cebadas (mastocitos) y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos para las ratas ni para los ratones.

Discusión

Las reacciones alérgicas son el resultado de la exposición a un (1) alérgeno, el cual provoca la producción y liberación de anticuerpos IgE, que se asocian a receptores ($Fc_\epsilon R$) de alta especi-

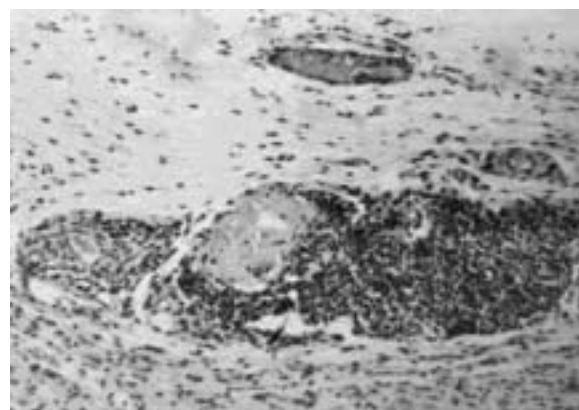


Figura 1. Agrupación de células redondas en la cercanía de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas en el lugar de aplicación tras la inoculación repetida por vía subcutánea de extractos alérgicos de *D. Siboney* y *B. tropicalis*. Hematoxilina Eosina 32X.

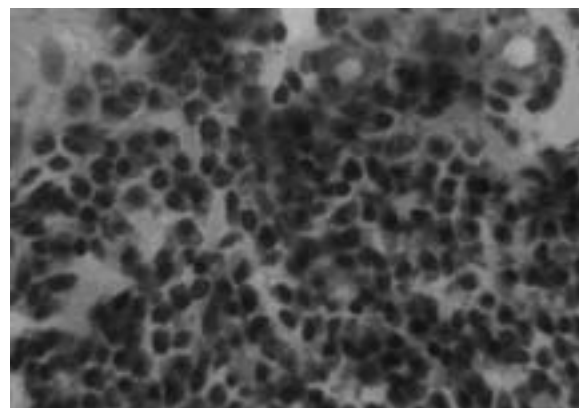


Figura 2. Agrupación de células redondas en la cercanía de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas en el lugar de aplicación tras la inoculación repetida por vía subcutánea de extractos alérgicos de *D. Siboney* y *B. tropicalis*. Nótese el predominio de linfocitos y células plasmáticas. Hematoxilina Eosina 400X.

ficidad en los basófilos y células cebadas provocando la degranulación de las células y la liberación de histamina, prostaglandina y leucotrienos [17].

En este trabajo se estudiaron los cambios patológicos producidos por la inoculación durante 28 días de los extractos alergénicos de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney*, por vía subcutánea en ratas y ratones.

Durante la realización del estudio no se detectaron síntomas clínicos ni mortalidad de los animales.

Respecto al estudio de los pesos de órganos en relación con el peso corporal (%) de los ratones se observaron diferencias significativas en el bazo de los machos tratados con extracto de *D. Siboney*, pero teniendo en cuenta las funciones que desempeña el mismo dentro del organismo [18], resulta lógico su aumento de tamaño ante la administración repetida de un alérgeno que actúa como antígeno, sin embargo, no se encontraron centros germinales ni otro cambio histopatológico de importancia.

La observación de abundantes células plasmáticas y linfocitos en el lugar de aplicación, tanto en ratas como en ratones, sugiere que los extractos alergénicos son capaces de estimular mecanismos inmunitarios que permiten la protección del organismo.

La presencia de estas células y la no existencia de diferencias significativas entre grupos respecto a las células cebadas y basófilos es atribuible a la acción farmacológica esperada del extracto alergénico, el cual previene la interacción de las IgE específicas al alérgeno y los basófilos. Estudios previos encontraron que la vacunación por largos períodos con estas sustancias disminuye la producción de IgE y aumenta los anticuerpos de tipo IgG1. Este cambio permite a los anticuerpos reconocer el alérgeno en sangre y eliminarlo, lo que evita la reacción alérgica. Debido a esta situación, las moléculas de IgE no pueden interactuar con los alérgenos y por lo tanto no pueden ponerse en contacto con los basófilos y mastocitos, lo que trae consigo que no ocurra la degranulación de estas células ni la respuesta alérgica [17].

Estudios anteriores para valorar la toxicidad por dosis repetidas del extracto alergénico del ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus* [19] obtuvieron resultados similares a los alcanzados durante nuestro estudio, mostrando que la inoculación repetida de este extracto no produce alteraciones en el organismo que los recibe y sólo provoca una respuesta celular circunscrita al lugar de aplicación con predominio de células redondas.

En nuestro caso, se encontró una reacción similar ante la inoculación subcutánea por 28 días de los extractos alergénicos de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney* en ratas y en ratones, lo que corrobora que ambas especies pueden usarse indistintamente como biomodelos adecuados para la evaluación de la toxicidad de sustancias que actúan sobre el sistema inmune [20].

Teniendo en cuenta que el asma y otras enfermedades alérgicas constituyen un serio problema para la salud, y que la exposición a alérgenos de los ácaros del polvo está estrechamente vinculada a su aparición [21]; el uso de extractos alergénicos representa un método eficaz para el diagnóstico y control de estas enfermedades.

En conclusión, bajo las condiciones experimentales de los ensayos realizados y de acuerdo a los resultados obtenidos, la administración repetida de alérgenos en ratas y ratones no provocó alteraciones patológicas que afecten a los animales.

Bibliografía

1. Platts-Mills TAE, Sporik RB, Chapman MD, Heyman PW (1997) The role of domestic allergens. En Chadwick DJ, Cardew G (Eds.), The rising trends in asthma. Ciba foundation. Chichester: John Wiley & Sons. London. pp.173-189.
2. Cuello MN, Patiño CM, Baena-Cagnari CE (1998) Existe una relación entre síntomas respiratorios en la infancia y la exposición a ácaros? Educación médica continua. Arch Arg Alergia Inmunol 29. 7-11.
3. Organización Mundial de la Salud (1988) Dust mite allergens and asthma: A world-wide problem. International workshop report. Bull WHO 66. 769-780.
4. Editorial (1995) *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis*-dust mites of subtropical and tropical areas. Clin Exp Allergy 25. 922-928.
5. Arlian L, Bernstein D, Berstein IL (1992) Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. J of Allergy and Clin Immunol 90. 292-296.
6. Baena-Cagnari CE, Neffen HE, Fernández-Caldas E, Patiño CM, Sanchez-Guerra ME, Cuello MN, Bustos GJ (1992) Sensibilidad cutánea a ácaros domésticos y de depósito en niños y adultos asmáticos. Arch Arg Alergia Inmunol 23. 66-70.
7. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernández-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TAE, Naspitz CK (1990) Exposure and sensitisation to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. Clin Exp Allergy 23. 433-439.
8. Puerta-Llerena L, Fernández-Caldas E, Caraballo García L, Lockett RF (1991) Sensitisation to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp Allergic individuals. J Allergy Clin Immunol 88. 943-950.
9. Hurtado I, Parini M (1987) House dust mites in Caracas, Venezuela. Ann Allergy 59.128-130.
10. Ferrándiz R. (1997) Allergenic characterization of the domestic mite *Dermatophagoides siboney*. Linköping University Medical Dissertations No. 532. pp. 126.
11. Casas R, Ferrándiz R, Wihl JA, Fernández B, Dreborg S (1999) Biological activity of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergens in exposed and unexposed mite-allergic individuals. Effect of patient selection on the biologic standardization of mite extracts. Allergy 54. 392-396.
12. Hage-Hamsten M (1995) *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis*-dust mites of subtropical and tropical areas. Clin and Exp Allergy 25. 905-909.
13. WHO Position Paper (1997) Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for allergic diseases, draft 7, Geneva: 27-29 January, 1-20.
14. Nordic Council on Medicine (1989) Registration of allergen preparations. Nordic Guidelines. Publication No. 23, 2nd Edition. Uppsala. pp. 18-19.
15. Handbook of in Vivo Toxicity Testing (1990). Academic Press. USA. pp. 394.
16. Statistical Package Scientific System 1992, SPSS for Windows, Released 5.0.1, License # 651544. October 9.
17. Edmonds J (2002). The development of allergen vaccines. Available from: <http://www.micro.unsw.edu.au>.