



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ALERGENICAS
RECONOCIDAS POR PACIENTES ATÓPICOS
MEXICANOS

BO 1347/97
Ej.3

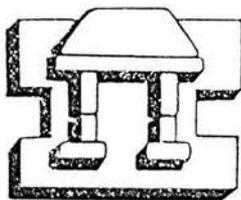
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MADRIGAL VELAZQUEZ MONICA



IZTACALA

ASESOR DE TESIS: DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO

MEXICO, D. F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, bajo la asesoría del Doctor en Ciencias Jose Antonio Enciso Moreno,

A Alfredo por los momentos de amor y felicidad que me has dado y por todo lo
que todavía nos falta por compartir.

AGRADECIMIENTOS

- A mis papas, a Car y Alf por el amor y risas que siempre me han brindado, gracias a ellos he logrado culminar con éxito mi carrera.
- Al Doctor Jose Antonio Enciso Moreno por sus enseñanzas, consejos y regaños los cuales han sido cruciales en ésta importante etapa de mi formación.
- A la Química Xochitl Juárez por haber proporcionado los alergenos utilizados en ésta tesis y por el apoyo económico otorgado.
- A Mauricio Sarrazola e Isabel Castrejón del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades por su colaboración en la colecta de los sueros.
- A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular y Parasitología por su apoyo y ayuda en todo momento.
- A mis amigos y compañeros de la carrera Gabi Rubio, Jeanette González, Iván Martínez, Kena Flores, Ana María García, Malinali Sanchez, Carlos Gallegos y Alejandra de Villa.

INDICE

	PAGINA
Indice de Tablas	I
Indice de Figuras	II
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Respuesta Inmune	2
2.2 Respuesta Inmune en la alérgia	4
2.2.1 Mecanismos inmunológicos involucrados en la alérgia	6
2.2.2 Atopia	7
2.3 Respuesta Inmune Humoral	10
2.3.1 Anticuerpos IgE	10
2.4 Respuesta Inmune Celular	13
2.4.1 Células cebadas	13
2.4.2 Macrófagos	15
2.4.3 Eosinófilos	16
2.4.4 Linfocitos	17
2.5 Alergenos	18
2.5.1 Polenos	19
2.5.2 Acaros del polvo	20
2.6 Análisis de alergenos.....	21
2.6.1 Purificación y caracterización de alergenos	23
3. Antecedentes específicos.....	25
4. Objetivos	29
5. Justificación	30
6. Metodología	33
6.1 Obtención del material biológico	33
6.2 Extracción de proteínas.....	34
6.3 Cuantificación de proteínas	34
6.4 Electroforesis (PAGE-SDS)	34
6.5 Electrotransferencia	35
6.6 Inmunodetección de alergenos	36
6.7 Quimioluminiscencia.....	37
6.8 Análisis estadístico	38
7. Resultados	39
8. Discusión.....	51
9. Conclusiones	55
10. Bibliografía	56
11. Apéndice.....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades alérgicas basada en los mecanismos inmunológicos involucrados. Tomado de Stites, 1994.....	8
Tabla 2. Porcentaje de pacientes asmáticos con pruebas cutáneas (intradermoreacciones) positivas para alérgenos comunes en el Hospital General de México. Tomado de Canseco, 1991.....	9
Tabla 3. Características de las inmunoglobulinas o anticuerpos. Tomado de Abbas <i>et al.</i> 1994.....	12
Tabla 4. Pesos moleculares de los antígenos del polen del ciprés reconocidos por pacientes alérgicos. *Porcentaje calculado a partir de 9 sueros que reaccionaron con al menos una banda. •Porcentaje calculado de a partir de 26 sueros que reaccionaron con al menos una banda. Tomado de Di Felice <i>et al.</i> 1994.....	26
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los alérgenos presentes en los ácaros del polvo Tomado de Platts <i>et al.</i> 1993).....	27
Tabla 6. Lista de alérgenos aplicados para pruebas cutáneas en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS. * Alérgenos utilizados en el presente estudio.....	33
Tabla 7. Concentraciones de proteína extraídas a partir de alérgenos glicerinados cuantificadas por el Método de Lowry. Las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. * Lote utilizado en el presente estudio.....	39
Tabla 8. Porcentajes de reconocimiento de proteínas de alérgenos por sueros de pacientes atópicos utilizando el conjugado anti-IgGs totales.....	41
Tabla 9. Prueba estadística de κ para evaluar la concordancia de los resultados obtenidos por IET y PCI en pacientes alérgicos hacia <i>D. pteronyssinus</i> ; + se reconoció al menos un polipéptido, - no se reconoció ningún polipéptido.....	42
Tabla 10. Prueba estadística de κ para evaluar la concordancia de los resultados obtenidos por IET y PC en pacientes alérgicos hacia <i>F. americana</i> y <i>H. annuus</i> ; + se reconoció al menos un polipéptido, - no se reconoció ningún polipéptido.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papel del sistema inmune en la alergia. <i>Fase de sensibilización</i> .- La reacción ocurre por la primera exposición con un alérgeno, en donde se provoca el cambio de un estado desensibilizado (no-alérgico) a un estado sensibilizado (alérgico). También se induce la sensibilización de linfocitos T y la producción de acs. Modificado de Stites, 1994.....	5
Figura 2. Papel del sistema inmune en la alergia. <i>Fase efectora</i> .- producida por la re-exposición al alérgeno con el cual ocurrió la sensibilización. En esta fase el alérgeno reacciona con acs específicos (IgG e IgE) y linfocitos T efectores, produciendo la liberación de los mediadores de la respuesta inflamatoria. Modificado de Stites, 1994.....	9
Figura 3. Estructura básica de la IgE. La porción "Fab" o fragmento de unión al antígeno está formado por los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH). La porción "Fc" o fragmento constante está formado por los dominios pesados constantes (CH2, CH3 y CH4). Modificado de Abbas <i>et. al.</i> 1994.....	11
Figura 4. Estructura del receptor de alta afinidad (FcεRI) para la IgE Fc. Tomado de Abbas <i>et. al.</i> 1994.....	13
Figura 5. Una mezcla compleja de proteínas puede ser separada por medio de PAGE-SDS y transferida hacia un soporte sólido (nylon, nitrocelulosa, etc.), para realizar una inmunodetección. Esta metodología es conocida como Inmunoelectrotransferencia o Western blot. Modificado de Abbas <i>et. al.</i> 1994.....	21
Figura 6. Análisis por PAGE-SDS de proteínas obtenidas de diferentes alérgenos glicerinados, provenientes de diferentes lotes.....	44
Figura 7. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	45
Figura 8. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Fraxinus americana</i>	46
Figura 9. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Helianthus annuus</i>	47
Figura 10. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Helianthus annuus</i>	48

Figura 11. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Helianthus annuus</i> utilizando conjugados anti-IgEs.....	49
Figura 12. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de <i>Fraxinus americana</i> utilizando quimioluminiscencia.....	50

1. RESUMEN

Existe una gran variedad de aeroalergenos atmosféricos, los cuales son capaces de sensibilizar e inducir repuestas inmunes alérgicas en pacientes atópicos, produciéndose anticuerpos del tipo IgG₄ e IgE, dando como resultado una respuesta inmune de Hipersensibilidad tipo I. Debido a su importancia en Salud Pública y a que una gran proporción (30%) de pacientes atópicos son sensibles a este tipo de alergen, nos propusimos caracterizar las principales proteínas alergénicas presentes en *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro del polvo), *Fraxinus americana* (polen del fresno) y *Helianthus annuus* (polen del girasol), mediante análisis de geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS) e Inmunoelectrotransferencia (IET). Para este fin se extrajeron las proteínas con acetona al 100% a partir de extractos de alergen glicerizados (Lab. Aphi S.A. de C.V.), y se cuantificaron por el método de Lowry, obteniéndose las siguientes concentraciones para el lote utilizado: *D. pteronyssinus* 7.05 µg/µl, *F. americana* 8.8 µg/µl y *Helianthus annuus* 5.60 µg/µl. En el análisis de IET se utilizaron sueros de pacientes atópicos con resultado positivo en pruebas cutáneas intradérmicas (PCI) para los alergen antes mencionados (20 sueros positivos y 20 sueros negativos), así como un conjugado anti-IgGs totales acoplado a peroxidasa y anti-IgEs acoplados a peroxidasa y fosfatasa alcalina. Los análisis de IET realizados con anti-IgGs mostraron polipéptidos reconocidos por el suero de los pacientes atópicos con pesos moleculares de 83 (75%), 74 (75%), 44 (15%), 14 (10%) y 29 (5%) KDa cuando se utilizó *D. pteronyssinus*. Para el caso de *F. americana* los polipéptidos reconocidos fueron de 57 (25%), 42 (15%) y 14 (5%) KDa y para *H. annuus* se reconocieron polipéptidos de 27 (20%), 36 (10%) y 14 (5%). En el índice de concordancia de kappa (κ) se obtuvo un valor de 0.844 para el ácaro, y un valor de 0.593 tanto para el polen del fresno como para el girasol. Los ensayos realizados con anti-IgEs por métodos colorimétricos no permitió diferenciar entre sueros positivos y negativos. Debido a esto se realizaron ensayos de IET con un sustrato quimioluminiscente que permitiera un mayor poder de resolución, encontrando para el polen de *F. americana* polipéptidos reconocidos de 14, 29, 34, 42, 48 y 63 KDa. Estos resultados no son representativos ya que únicamente se utilizó una proporción de los sueros (8) y resulta necesario continuar con la estandarización de la técnica. Aunque la respuesta de anticuerpos contra proteínas alergénicas es generalmente del isotipo IgE, observamos respuesta de pacientes alérgicos a nivel de IgGs totales, contra antígenos de extractos de *D. pteronyssinus*, *F. americana* y *H. annuus*. Los polipéptidos reconocidos por las IgGs de los individuos atópicos analizados se encuentran dentro del rango de proteínas de alergen reportadas en individuos atópicos de otros países.

2. INTRODUCCION

2.1 RESPUESTA INMUNE

Un individuo sano se protege contra antígenos extraños mediante diferentes mecanismos; dichos mecanismos pueden incluir barreras físicas y químicas, células fagocíticas, etc. Todos estos mecanismos se encuentran antes de que se halla tenido contacto con el antígeno y en general no hay discriminación entre las sustancias extrañas, por lo que en conjunto reciben el nombre de **Inmunidad Natural**. Existe otro tipo de inmunidad la cual se induce o estimula por la exposición a sustancias extrañas, pero en este caso ocurre de manera específica y en cada contacto con el antígeno se incrementa su capacidad defensiva. A dicha inmunidad se le conoce como **Inmunidad Específica**. Una vez que un individuo ha sido expuesto a un antígeno extraño, se dice que ha sido inmunizado, por lo que adquiere una **Inmunidad Activa**. Debido a que este tipo de inmunidad específica puede ser transferida de un organismo a otro mediante células o moléculas en el suero, existe además el concepto de **Inmunidad Pasiva**, o inmunidad transferida (Abbas *et. al.* 1994; Roitt, 1994; Stites; 1994).

Dependiendo de los componentes del sistema inmune que medien la respuesta, la respuesta inmune específica se clasifica en dos tipos (Abbas *et. al.* 1994):

* **Inmunidad Humoral**.- es mediada por los acs (anticuerpos) y por una serie de moléculas producidas por los linfocitos B, los cuales son los responsables del reconocimiento y eliminación de antígenos.

* **Inmunidad Celular**.- como su nombre lo dice es mediada por células como los linfocitos T. Esta respuesta se da principalmente contra microorganismos intracelulares, provocando su destrucción o la lisis de las células infectadas.

Ambos tipos de inmunidades (humoral y celular) tienen ciertas características fundamentales tales como:

- 1) *Inducibilidad*.- el desencadenamiento de la respuesta inmune requiere de la exposición del sistema inmunitario del huésped a la sustancia extraña.
- 2) *Especificidad*.- las células o moléculas efectoras de la respuesta inmune reconocen con una extraordinaria selectividad a las sustancias que indujeron su producción (antígenos).
- 3) *Memoria*.- El primer contacto con el antígeno desencadena una respuesta inmune que tiene una magnitud determinada y que requiere de un período relativamente largo (7 a 11 días) para alcanzar su punto máximo. Un segundo contacto resulta en una respuesta que se caracteriza por una magnitud mucho mayor alcanzado en un período sensiblemente menor (4-5 días).
- 4) *Transferibilidad*.- las células o moléculas efectoras pueden ser transferidas de un individuo inmune a uno que no ha estado en contacto con el antígeno. El individuo receptor se comporta, con consecuencia de esto, como un organismo inmune durante un lapso de duración variable (1-6 meses)
- 5) *Heterogeneidad*.- la respuesta inmune se caracteriza por la producción de una gran diversidad de moléculas y/o células capaces de reconocer porciones definidas de la molécula del antígeno (determinante antigénico).

Una vez que se reconoce al antígeno, los linfocitos se activan desarrollando los mecanismos fisiológicos de respuesta que llevarán a la eliminación del antígeno, mediante las fases que se describen a continuación (Abbas *et. al.* 1994; Roitt, 1994):

- 1) *La fase de reconocimiento*.- consiste en la unión de los antígenos extraños a los receptores específicos de los linfocitos T maduros existentes antes de la estimulación antigénica con las células B diferenciadas a células plasmáticas, las cuales comienzan a expresar acs en su superficie que pueden unir a los antígenos. Los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, expresan receptores que reconocen sólo pequeñas secuencias de proteínas antigénicas.
- 2) *La fase de activación*.- la activación de los linfocitos T requiere de dos señales, la primera es la que da el antígeno, y la segunda es dada por las células accesorias. Esta activación involucra a la secuencia de cambios que se inducen en los linfocitos como

consecuencia del reconocimiento antigénico. Así, al inicio los linfocitos comienzan a proliferar, permitiendo la expansión de clonas que reconocen al antígeno con lo que se amplifica la protección. El otro cambio es que los linfocitos B se convierten en células secretoras de acs, que unirán al antígeno y lo eliminarán. Algunos linfocitos se diferenciarán para fagocitar o para lisis células infectadas.

3) *La fase efectora.*- en esta fase participan las células efectoras que eliminan al antígeno, en conjunto con otros tipos celulares no linfoides y los mecanismos de defensa que operan en la inmunidad natural. Por ejemplo, una vez que los acs se unen a los antígenos se incrementa la fagocitosis por los neutrófilos sanguíneos y los macrófagos. Los acs también van a activar al sistema de proteínas plasmáticas conocidas como **complemento**, que participarán en la fagocitosis y en la lisis celular. Dichos acs también pueden estimular la degranulación de las células cebadas, que ayudarán a combatir infecciones y al ser degranuladas liberarán compuestos de respuesta inflamatoria. Los linfocitos T activados secretarán proteínas, llamadas **citocinas**, que incrementarán la fagocitosis y estimularán las respuestas inflamatoria.

2.2 RESPUESTA INMUNE EN LA ALERGIA

La respuesta inmune alérgica hacia un antígeno determinado (alergeno), es uno de los desórdenes inmunológicos más comunes, que puede ocurrir en 1 de cada 10 personas (Quan,1994). Los trabajos de Portier y Richet en 1902, establecieron que la respuesta inmunológica puede ser dañina, naciendo el concepto de Hipersensibilidad. Von Pirquet en 1906 acuña el término de Alergia (Hernández,1987), el cual dentro de la clasificación de Gell y Coombs se agrupa dentro de las reacciones de Hipersensibilidad tipo I, la cual ocurre en un 10 a 30% de la población general (Abbas, *et. al.*1994). En la respuesta inmune de las enfermedades alérgicas, participan los mismos mecanismos efectoras de reconocimiento y presentación antigénica, inmunidad celular y humoral involucrados en los mecanismos de defensa activados por patógenos microbianos.

El fenómeno alérgico ocurre cuando un individuo es expuesto a un alérgeno generándose una respuesta inmune, referida como *sensibilización* (Figura 1). La dosis a la que se estuvo expuesto, la ruta de exposición, el tipo de partícula y la predisposición genética del individuo, determinarán la magnitud de la respuesta hacia el alérgeno (Paul,1993). Una vez que ocurre la sensibilización, el individuo permanecerá asintomático hasta que tenga nuevamente exposición al alérgeno con el que fué sensibilizado, desarrollándose la fase *efectora* en la cual el alérgeno reaccionará con acs específicos o con linfocitos T efectores. Ambos mecanismos serán los reponsables de producir los síntomas y signos de la reacción alérgica (Stites,1994; Abbas *et. al.* 1994) (Figura 2) .

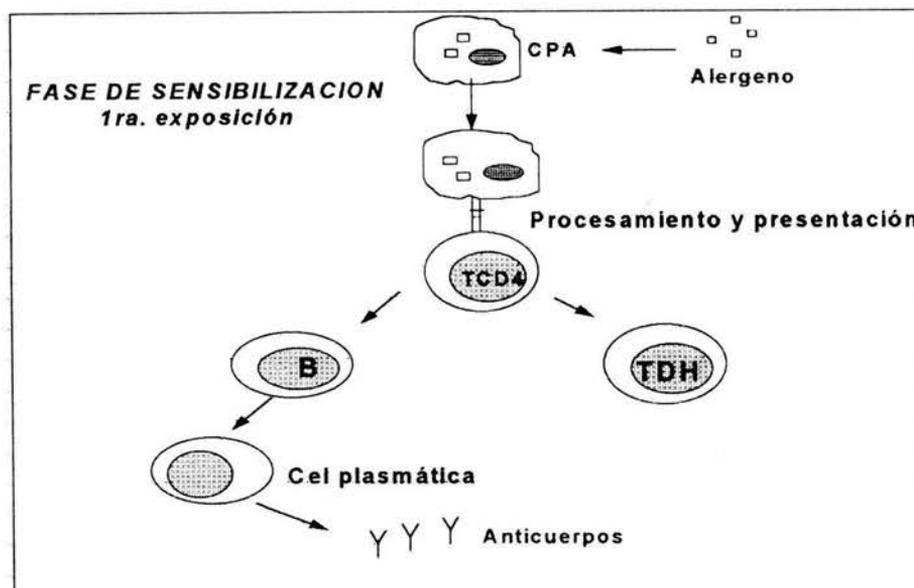


Figura 1. Papel del sistema inmune en la alergia. *Fase de sensibilización*.- La reacción ocurre por la primera exposición con un alérgeno, en donde se provoca el cambio de un estado desensibilizado (no-alérgico) a un estado sensibilizado (alérgico). También se induce la sensibilización de linfocitos T y la producción de acs. Modificado de Stites, 1994.

Cuando ocurre una respuesta alérgica existe localización y migración de las células inmunocompetentes hacia los diferentes tejidos, las células se adhieren al endotelio para después movilizarse hacia el tejido blanco, ocurriendo además un proceso de adhesión intercelular. Las moléculas responsables de estos procesos son las moléculas de adhesión (MA), ubicadas en la superficie celular y agrupadas en familias en base a sus analogías

estructurales. El primer grupo es la superfamilia de inmunoglobina (Ig), la cual agrupa **MA** con dominios parecidos a los de la Ig, entre ellas tenemos a **ICAM-1** (Molécula de adhesión intercelular-1), **VCAM1** (Molécula de adhesión de células vasculares-1), **N-CAM** (Molécula de adhesión celular para neutrofilos), **LFA-3** (Factor de adhesión de linfocitos-3), **CD2** y **CD28**. El segundo grupo es el de las **Integrinas**, formadas por heterodímeros de cadenas α y β . En el tercer grupo tenemos a las **Selectinas L, E y P**, las cuales tiene un dominio parecido a la lectina en la porción amino terminal (Canonica *et. al.* 1994).

2.2.1 MECANISMOS INMUNOLOGICOS INVOLUCRADOS EN LA ALERGIA

Existen 3 mecanismos inmunológicos involucrados en la alergia, dichos mecanismos se mencionan a continuación (Tabla 1, Figura 2):

1) Mediada por la interacción de IgE-células cebadas.- Cuando se producen los acs IgE-alergeno específicos estos se unen a las células cebadas y basófilos por medio de sus receptores de alta afinidad. Así cuando pequeñas cantidades del alergeno ingresan al organismo y se unen a éstos acs ocurren entrecruzamientos de los receptores de alta afinidad para IgE y alteraciones en la membrana celular, por lo que la células cebadas se degranulan. Esto da como resultado la liberación de mediadores inflamatorios como: histamina, leucotrienos, factores quimiotácticos, factor activador de plaquetas, proteasas, prostaglandinas, etc. Estos acontecimientos ocurren en los primeros 15-30 minutos después de la exposición al alergeno, por lo que se denomina *respuesta inmediata*. El periodo comprendido entre las 6 y 12h después del reto, el cual ocurre con participación celular, es caracterizado por la presencia de inflamación y es conocida como *respuesta tardía*. Este mecanismo es el responsable de las enfermedades atópicas, anafilaxis y urticaria.

2) Mediada por los acs IgG o IgM.- Los acs IgG o IgM pueden formar complejos con los alérgenos (cuando se encuentran en grandes cantidades), dichos complejos son capaces de causar inflamación en el tejido debido a la activación de la vía clásica del complemento, por medio de los receptores C1q para la porción Fc de los acs antes mencionados. Una vez activado el complemento se producen anafilatoxinas (C3a, C5a, C4a) y péptidos quimiotácticos, que incrementan la permeabilidad vascular y la infiltración de neutrófilos que son capaces de liberar moléculas inflamatorias y productos tóxicos del metabolismo de oxígeno. Por medio de las anafilatoxinas también se pueden reclutar y activar los macrófagos contribuyendo así al proceso inflamatorio y al daño del tejido.

3) Mediada por linfocitos T efectores y citocinas.- en este tipo de mecanismo existe participación de linfocitos T efectores que tienen un fenotipo **CD4+** del tipo **Th2**, según la clasificación de Mosmann en el año de 1986. Cuando el linfocito encuentra un alérgeno reacciona con él, se activa y genera citocinas, como la **IL-4**, **IL-5** e **IL-10** principalmente, las cuales actuarán sobre una amplia variedad de blancos celulares como macrófagos, células cebadas, linfocitos, etc, produciendo la cascada alérgica.

2.2.2 ATOPIA

El concepto de **atopia** fué introducido por Coca y Crooks en 1923 para un grupo de padecimientos con carácter hereditario multifactorial. El término atopia se refiere a un desorden predeterminado genéticamente en el cual se incrementa la habilidad de los linfocitos B para producir acs del tipo IgE contra antígenos comunes o inocuos. En un individuo no atópico, se sintetizan acs del tipo IgM o IgG y pequeñas cantidades de IgE contra dichos antígenos. Por otro lado, en los pacientes atópicos los niveles séricos de IgE-alérgeno específicos se elevan considerablemente (1000 µg/ml) en comparación con los niveles de individuos no atópicos (1 µg/ml) (Abbas *et. al.* 1994). Una vez producidos los acs IgE para los antígenos externos (alérgenos), se encargarán de estimular a las células blanco (cebadas y basófilos), en la mucosa respiratoria o gastrointestinal, para que liberen

mediadores inflamatorios, los cuales serán responsables de la producción de las respuestas inmediata y tardía observadas en las respuestas alérgicas. Se ha sugerido que los acs de la subclase IgG₄ también se pueden fijar a las células cebadas y basófilos, aunque con menor afinidad que los del tipo IgE, por lo que se piensa que también pueden inducir respuestas alérgicas (Abba Terr *et. al.* 1994).

1. Enfermedades alérgicas causadas por acs IgE y mediadores de células cebadas.
a. Enfermedades atópicas
1. Asma alérgica
2. Rinitis alérgica
3. Dermatitis atópica
4. Gastroenteropatía alérgica
b. Enfermedades anafilácticas
1. Anafilaxis sistémica
2. Angioedema-urticaria
2. Enfermedades alérgicas causadas por acs IgG o IgM y activación del complemento.
a. Enfermedad del suero
b. Neumonitis aguda por hipersensibilidad
3. Enfermedades alérgicas causadas por linfocitos T sensibilizados.
a. Dermatitis alérgica por contacto
b. Neumonitis crónica por hipersensibilidad

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades alérgicas basada en los mecanismos inmunológicos involucrados. Tomado de Stites, 1994.

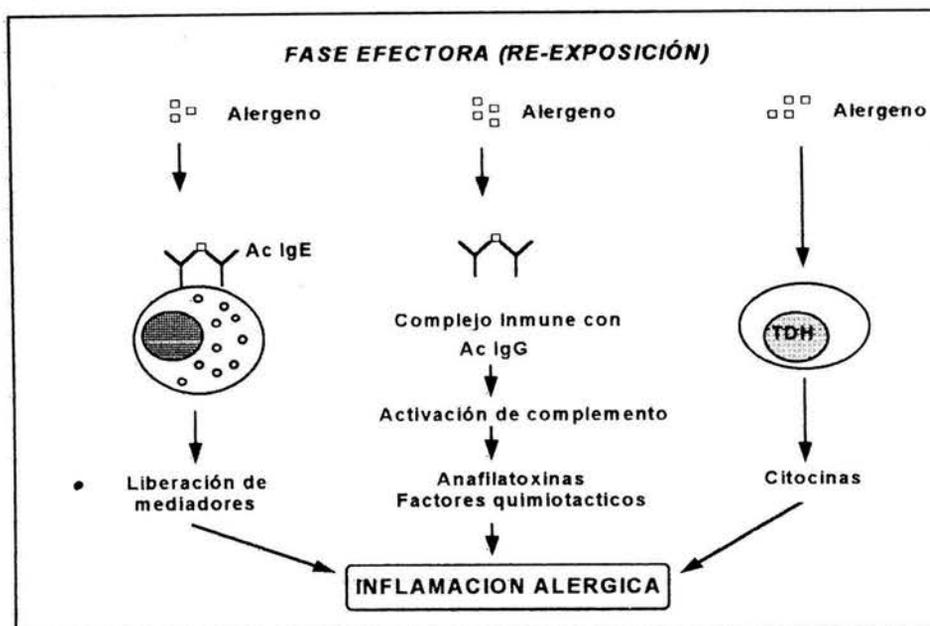


Figura 2. Papel del sistema inmune en la alergia. *Fase efectora*.- producida por la re-exposición al alérgeno con el cual ocurrió la sensibilización. En esta fase el alérgeno reacciona con acs específicos (IgG e IgE) y linfocitos T efectores, produciendo la liberación de los mediadores de la respuesta inflamatoria. Modificado de Stites,1994.

El asma y la rinitis alérgicas son las manifestaciones de atopia más comunes, mientras que la dermatitis atópica es menos común y la gastroenteropatía es rara. Dos o más de éstas enfermedades alérgicas pueden coexistir en un mismo paciente al mismo tiempo o a distintos tiempos (Abba Terr *et. al.* 1994). Elliotson y Phoebos a principios del siglo XVII establecen que en personas atópicas el polen, el pasto, el polvo y la caspa de animales pueden actuar como irritantes (Castrejón,1991), de tal forma que la obstrucción aérea puede ser disparada en estos pacientes por la inhalación de un alérgeno específico (Abbas *et. al.* 1994). Cerca del 75% de los pacientes atópicos muestran pruebas cutáneas positivas cuando se les inyecta uno o más alérgenos comunes (Deborg,1989; Canseco,1991) (Tabla 2).

ALERGENO	NUMERO DE CASOS	PORCENTAJE
Polvo	34	97
<i>Helianthus sp.</i>	10	28.5
<i>Fraximus sp.</i>	4	11.4

Tabla 2. Porcentaje de pacientes asmáticos con pruebas cutáneas (intradermoreacciones) positivas para alérgenos comunes en el Hospital General de México. Tomado de Canseco, 1991.

En pacientes atópicos, que son sometidos a un reto antigénico con el alérgeno al cual son sensibles, se provoca la aparición de mediadores de respuesta inmune en la sangre, orina y fluidos broncoalveolares de las vías aéreas (Mc Fadden *et. al.* 1992), siendo estos indicadores de un proceso alérgico. Usando estos parámetros se ha podido establecer que la constitución de una alergia en el niño, especialmente la alergia respiratoria, depende de factores como la exposición y la predisposición; esta última caracterizada por la hipersecreción de IgE alérgeno-específico (Turner,1981). Tomando en cuenta estos factores, se ha podido establecer que en general existe un 41% de antecedentes de atopia familiar, lo cual habla del componente genético (Hernández,1987). Así, se ha estimado que 40 millones de Norteamericanos padecen enfermedades alérgicas y de éstos 8.9 millones son asmáticos. También se ha comprobado que cerca del 90% de los asmáticos menores de 30 años tienen una etiología alérgica, mientras que el 50% mayores de 40 años son alérgicos. En nuestro país no se conoce con certeza la incidencia y prevalencia de las enfermedades atópicas, pero algunos estudios mencionan que alrededor de un 10 a 15% de la población pediátrica tiene algún tipo de enfermedad alérgica (Mendez,1989).

2.3 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

2.3.1 ANTICUERPOS IgE

La estructura básica de los acs presenta dos cadenas ligeras (L) idénticas de 24 KDa y dos cadenas pesadas (H) idénticas de 55 a 70 KDa. Ambas cadenas tienen regiones repetidas o unidades homólogas de unos 110 residuos de aminoácidos que se unen en un motivo globular formado de 2 capas de hojas beta-plegadas con 3 ó 4 cadenas de polipéptidos antiparalelos llamados dominios de la inmunoglobulina. Dichos dominios se encuentran en series repetidas en ambas cadenas de los acs, presentando secuencias de aminoácidos específicos en todas las moléculas por lo que se han agrupado dentro de la superfamilia de Ig, existiendo la idea de que los segmentos de los genes que codifican para

estos dominios están relacionados con un gen ancestral. Esta superfamilia está definida por un grupo de proteínas con una secuencia de aminoácidos homóloga hasta en un 15 % y la cual es codificada por un solo exón (Abbas *et. al.* 1994; Roitt, 1994).

En la porción amino terminal los acs tienen una secuencia de aminoácidos llamada región variable (V) y otra región denominada región constante (C) la cual es más conservada. Estas moléculas presentan tres porciones en la cadena pesada y otras tres en la ligera altamente variables, los cuales se juntan tridimensionalmente para formar la zona de unión al antígeno. A estas regiones se les conoce como regiones determinantes de la complementaridad o CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3).

Los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH) son conocidos como "Fab" o fragmento de unión al antígeno, y los dominios pesados constantes (CH) son el fragmento "Fc" o fragmento constante el cual es cristalizante y puede unir al complemento (Figura 3).

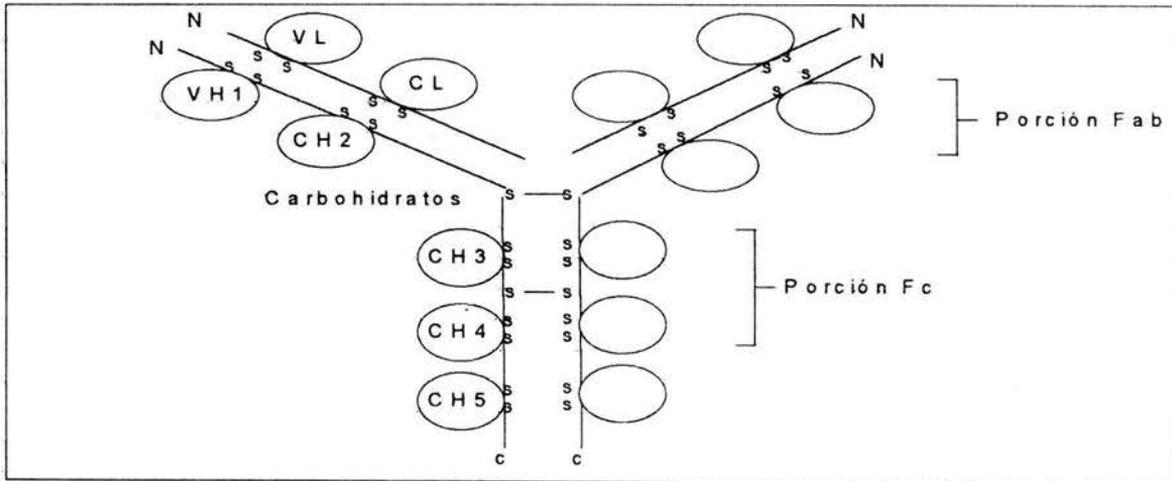


Figura 3. Estructura básica de la IgE. La porción "Fab" o fragmento de unión al antígeno está formado por los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH). La porción "Fc" o fragmento constante está formado por los dominios pesados constantes (CH2, CH3 y CH4). Modificado de Abbas *et. al.* 1994.

La cadena pesada es la que determina el isotipo de cada ac dependiendo del número de dominios que tenga, la **IgE** tiene 5 y la **IgG₄** tiene 4. La región denominada bisagra presenta una serie de residuos de aminoácidos localizados entre CH1 y CH2 con una conformación flexible que permite su acoplamiento a la molécula antigénica; muchas de las diferencias entre las regiones constantes se encuentran en esta zona. En particular la

IgE carece de esta región (Tabla 3). Todas las cadenas pesadas tienen el amino terminal glicosilado, debido a la presencia de oligosacáridos unidos a esta parte. Las cadenas del ac están unidas por medio de interacciones covalentes como enlaces disulfuro y por interacciones no covalentes como interacciones hidrofóbicas.

<i>Ac</i>	<i>Subtipos</i>	<i>Cadena H</i>	<i>Dominios H</i>	<i>Bisagra</i>	<i>Concentración suero mg/ml</i>	<i>Forma secretoria</i>
IgA	IgA1	α 1	4	si	3	Mono, di, trimero
	IgA2	α 2	4	si	0.5	Mono, di, trimero
IgD	-	δ	4	si	traza	-
IgE	-	ϵ	5	no	traza	Monómero
IgG	IgG1	γ 1	4	si	9	Monómero
	IgG2	γ 2	4	si	3	Monómero
	IgG3	γ 3	4	si	1	Monómero
	IgG4	γ 4	4	si	0.5	Monómero
IgM	-	μ	5	no	1.5	Pentámero

Tabla 3. Características de las inmunoglobulinas o anticuerpos. Tomado de Abbas *et. al.* 1994.

El receptor del ac IgE se localiza principalmente sobre las células cebadas y los basófilos. Este ac se une por medio de su porción Fc al receptor específico para las cadenas pesadas (epsilon), de ahí que se denomine Fc ϵ R. Se han descrito dos tipos de receptores en distintos tipos celulares. Las células cebadas y los basófilos expresan receptores Fc ϵ RI en su superficie, que también han sido detectados en células de Langerhans epidermales y macrófagos dermales, pero su función todavía no se conoce. Cada molécula de Fc ϵ RI contiene cuatro polipéptidos separados, una cadena α que media la unión con la IgE, la cadena β que atraviesa la membrana cuatro veces y las dos cadenas γ idénticas que atraviesan la membrana una sola vez. Tanto la cadena β como las γ contienen el motivo de activación y reconocimiento del antígeno, por lo que se sugiere que están involucradas en la transducción de señales (Figura 4).

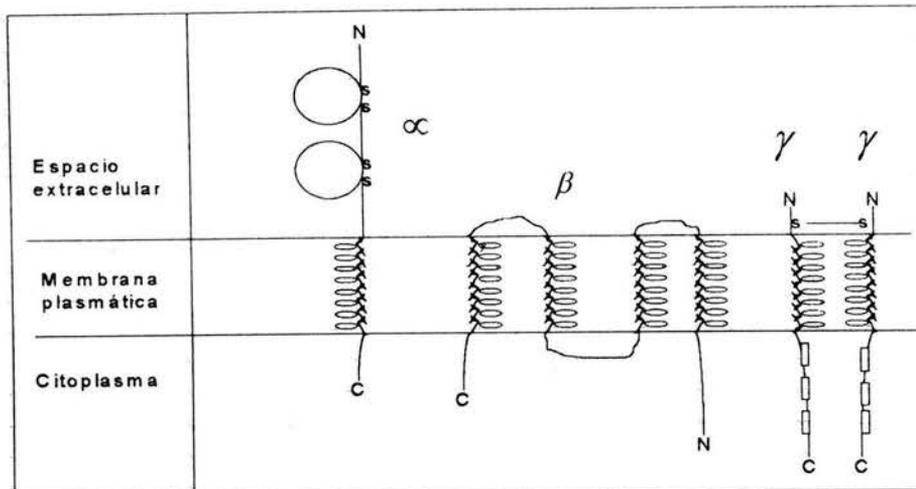


Figura 4. Estructura del receptor de alta afinidad (FcεRI) para IgE. Tomado de Abbas *et. al.* 1994.

Existe un segundo tipo de receptor para IgE, el FcεRII el cual tiene una afinidad mucho más baja para este tipo de ac que el anterior, aunque puede variar en los diferentes tipos celulares. Se puede encontrar en eosinófilos, células B y monocitos.

2.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR

2.4.1 CELULAS CEBADAS

Las células cebadas tienen un papel crucial en las respuestas alérgicas, ya que su degranulación está asociada con la respuesta bronquial hacia un alérgeno y probablemente también a estímulos indirectos como el ejercicio, la hiperventilación y la contaminación (Barnes, 1992). Existen dos subpoblaciones de células cebadas, las de tejido conectivo (MCTC) y las de mucosa intestinal (MCMi) (Befus, 1986, Marshall, 1990). Este tipo de células tienen receptores para IgE de alta afinidad que dirigen la unión con este ac, de tal forma que cuando han sido estimulados apropiadamente inducen la degranulación y liberación de mediadores específicos. Los eventos que determinan la ocurrencia y la intensidad de la respuesta tardía, son también estímulos para el reclutamiento de células cebadas en la mucosa bronquial (Crimi *et. al.* 1991).

Los **mediadores** liberados por las células cebadas pueden ser **preformados** tales como la **histamina** que es una amina biogénica o vasoactiva; ésta molécula de bajo peso molecular puede causar la constricción del músculo bronquial e incrementar la peristalsis de los espasmos bronquiales. Junto con la serotonina, la histamina ejerce sus efectos farmacodinámicos sobre los músculos lisos adyacentes y células endoteliales vasculares. La célula cebada también puede contener macromoléculas granuladas con intensa actividad farmacodinámica, tales como enzimas (tripsina, quimasa, serina-proteasas), heparina, serotonina, bradicinina, etc (Marshall,1990). Además contienen materiales de reparación hística como ácido hialurónico y factores que afectan a otras células, como el factor quimiotáctico de los eosinófilos y neutrófilos en la anafilaxia (Stites,1988).

La otra clase mediadores son los **mediadores sintetizados de novo**. Entre ellos se encuentran los derivados lipídicos y las citocinas. Uno de los más importantes es un derivado del ácido araquidónico, la **Prostaglandina D₂**, la cual actuará como vasodilatador y vasoconstrictor en el músculo liso, siendo liberada en el pulmón durante la broncoconstricción alérgica. Otros compuestos derivados del ácido araquidónico son los leucotrienos: **LTC₄**, **LTD₄**, **LTB₄**, **LTE₄**, también conocidos como Sustancias de Reacción Lenta a la Anafilaxia (SRS-A). Estos compuestos se unen a sus receptores en músculo liso, siendo los principales mediadores de la broncoconstricción alérgica. Además estas moléculas son las responsables de producir en la piel la reacción conocida como "Roncha e Irritación" (wheal and flare). Otro tipo de mediadores son las **Citocinas** e incluyen al **TNF α**, **IL-1**, **IL-4**, **IL-5**, **IL-6** y factores estimuladores de colonias de granulocitos y monocitos (**SFC-GM**, **SFC-M**), estos últimos producidos en su mayoría por los linfocitos T. Estas moléculas están involucrados en la fase tardía de la reacción alérgica (Galli,1993, Abbas *et. al.* 1994), influyendo en los estados de maduración, diferenciación, proliferación de las células cebadas e inducción de cambios fenotípicos en la expresión de acs (Crimi *et. al.* 1991; Beasley *et. al.* 1989). Las células cebadas también pueden producir **el factor de activación plaquetas (PAF)**, el cual tiene acción directa en la

broncoconstricción ya que causa retracción de las células endoteliales y puede relajar el musculo liso.

Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que toda ésta cascada de mediadores pueden causar la contracción del musculo liso bronquial, aumentar la permeabilidad vascular, producir edema muscular e incrementar la producción de moco que puede bloquear las vías respiratorias. Al realizar estudios en lavados broncoalveolares (LAB) tomados de pacientes con asma alérgica, antes y después de la exposición al alergen, se ha demostrado la presencia de histamina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano y triptasa, solos o en combinación con presencia de células cebadas adheridas al endotelio pulmonar (Beasley *et. al*1989). Muchos de estos mediadores han sido recuperados de pacientes atópicos sin asma, lo que sugiere que pueden existir marcadores de atopia (McFadden *et. al*.1992). Otro tipo de estudios han confirmado que el aumento de **TNF α** proveniente de células cebadas de piel, seguido de estimulación dependiente de IgE induce la degranulación de células, por lo que se asume que al menos, una parte de ésta citocina presente en los lavados broncoalveolares (LAB) puede ser liberada por las células cebadas (Kips,1993).

2.4.2 MACROFAGOS

Estas células son derivadas de los monocitos sanguíneos y juegan un papel central en la respuesta inmune, ya que son los encargados del procesamiento del alergen para ser presentado a los linfocitos T (Barnes,1992). Estas células circulan hacia las vías aéreas de pacientes asmáticos, pudiendo ser activados por alergen via receptores de baja afinidad para IgE, los cuales se incrementan en pacientes alérgicos (Tinkelman,1993). El enorme repertorio de macrófagos permite la producción de múltiples moléculas, incluyendo una gran variedad de citocinas que pueden organizar toda la respuesta alérgica. Así pueden incrementar o disminuir la inflamación dependiendo del estímulo otorgado, además pueden elaborar una familia de moléculas llamadas **Factores liberadores de histamina**, las cuales pueden interactuar con las células cebadas, amplificando la información para la respuesta inflamatoria alérgica. Los macrófagos son muy importantes en la producción de un

importante mediador inflamatorio como es el **TNF α** (Kips,1993), por otro lado también aumentan los niveles de leucotrienos, prostaglandinas, **PAF** e **IL-1** la cual estimula la activación de la célula T, la proliferación de células B y la producción de acs (Tinkelman,1993).

2.4.3 EOSINOFILOS

Los eosinófilos están íntimamente relacionados con las reacciones alérgicas dado que constituyen el 3% de los leucocitos circulantes y en pacientes alérgicos se incrementan hasta un 10 a 20%. De todas las células que participan en la fase alérgica tardía los eosinofilos se consideran como los más importantes (McFadden *et. al.*1992). Originalmente se les consideraba como células benéficas para el asma, ya que tienen la capacidad de inactivar histamina y leucotrienos, sin embargo su papel no es tan benéfico ya que pueden liberar radicales libres de O₂, etc. en las vías aéreas (Barnes,1992). La eosinofilia sanguínea y tisular es una característica común de reacciones alérgicas (Abbas *et. al.*1994).

Los eosinófilos contienen gránulos con dos tipos de proteínas, la **Proteína Básica Principal** (PBM) y la **Proteína Catiónica Principal** (PCP) (Abbas *et. al.*1994), las cuales son capaces de dañar el epitelio ciliar de las vías respiratorias (McFadden,1992), en conjunto con radicales de oxígeno y enzimas lisosomales (Beasley *et. al.*1989).

La adhesión de eosinófilos involucra la expresión de moléculas de glicoproteínas en su superficie (**integrinas**) y la expresión de moléculas intercelulares de adhesión (**ICAM-1**) en las células vasculares endoteliales. Tanto el **LTB₄**, el **PAF** y el **ácido hidroxieicosateranoico** permiten la migración de eosinofilos al sitio de la degranulación. Así también citocinas como la **IL-3** (Barnes,1992) incrementa selectivamente la adherencia de estas células, mientras que el **GM-CSF** incrementa su supervivencia. La **IL-5** es un factor de activación y diferenciación de eosinófilos y en estudios recientes con especímenes de biopsias bronquiales y análisis de expresión de RNAm para **IL-5**, se ha demostrado que se produce en algunos pacientes con alergia (McFadden *et. al.*1992).

La inhalación de un alérgeno da como resultado un marcado incremento en el número de eosinófilos en los BAL al tiempo de la fase tardía. Durante esta fase, en individuos atópicos se tiene una acumulación importante de eosinófilos, existiendo además una relación directa entre los conteos de eosinófilos en la sangre y en los BAL, con los de las vías aéreas. En estudios de inmunohistoquímica con biopsias bronquiales se demuestra un incremento en la cantidad de eosinófilos en pacientes con asma inflamatoria (McFadden, 1992).

Se ha demostrado *in vitro* que las proteínas de los gránulos de los eosinófilos pueden destruir el epitelio bronquial, por lo que se piensa que su infiltración causa el daño debido al aumento de sus proteínas tóxicas. Estudios en pacientes que tenían incrementos en el número de eosinófilos en la mucosa bronquial, mostraron un incremento en la incidencia de la abertura de los espacios intracelulares del epitelio bronquial, con presencia de gránulos en los espacios intracelulares. En biopsias bronquiales de sujetos con asma alérgica, se reporta infiltración de eosinófilos en la lámina propia; ésta presencia de eosinófilos es exclusiva de asmáticos, las cuales después del reto con un alérgeno muestran eosinófilos con características morfológicas de activación, indicando por una marcada heterogeneidad de la estructura granular (Beasley, 1989).

2.4.4 LINFOCITOS

Actualmente se tiene bien establecido que los linfocitos T alérgeno-específicos están presentes en los repertorios inmunes de individuos, atópicos y no atópicos. En pacientes con asma crónica los linfocitos son las células que tienen mayor infiltración junto con los eosinófilos. En la mucosa bronquial, se presentan mayoritariamente linfocitos TCD4⁺ los cuales aumentan en pacientes alérgicos que presentan síntomas, comparando con los valores de individuos no alérgicos (Ohashi *et al.* 1992). La respuesta inmune específica que se da contra el alérgeno estará determinada predominantemente por la presencia de **IL-4 (Th₂)** en individuos atópicos y por **IFN- γ (Th₁)** en individuos no atópicos (Mosmann *et al.* 1989; Romagnani, 1994; Corrigan, 1995). Tanto la **IL-4** como la

IL-13 aumentan la producción de **IgE** e **IgG₄** en linfocitos B, pero no de otras subclases de anticuerpos **IgG** (Romagnani,1994). En las biopsias de los alérgicos se encuentran predominantemente los linfocitos **Th₂**, los cuales al parecer se encargan de desencadenar la respuesta inflamatoria crónica, a través de la secreción de citocinas (**IL-3**, **IL-4**, **IL-5**, **GM-CSF** y **TNF α**) (Kips,1993), que pueden activar a los eosinófilos por quimiotaxis, e inducir eosinofilia (Ohashi *et. al.*1992). Se sabe que este tipo de linfocitos en pacientes alérgicos presentan en su superficie un marcador de la superfamilia del **TNF**, el **CD30**; los linfocitos **Th₁** carecen de éste marcador o lo presentan en niveles bajos, mientras que los **Th₀** tienen niveles intermedios (Romagnani,1994).

2.5 ALERGENOS

Se denomina alérgeno a la sustancia que produce síntomas de hipersensibilidad inmediata con producción elevada de acs **IgE**. Los alérgenos inducen sensibilización por su exposición en el tracto respiratorio o nasal. Los aeroalérgenos son proteínas o glicoproteínas derivadas de una gran variedad de sustancias particuladas. Dichos aeroalérgenos pueden estar contenidos en semillas de plantas, partículas reproductivas de hongos, algas, bacterias, polenes, protozoarios, en el pelo de perros y gatos, en desechos biológicos, incluyendo desechos de mamíferos y emanaciones de artrópodos (ácaros). Estas moléculas pueden ser aerosolizadas y transportadas en la atmósfera (Paul,1993). Estas partículas alérgicas afectan a los individuos atópicos, y su presencia esta determinada localmente por factores como el uso de la tierra, temperatura, humedad, ciclos de crecimiento de plantas y la presencia de animales en las distintas regiones (Middleton *et. al.*1993).

La gran mayoría de los alérgenos inhalables provienen de fuentes naturales, aquellos que provienen de la flora y fauna regionales varían con la época del año por lo que son llamados estacionales; este tipo de alérgenos incluye a los polenes (*Fraxinus sp.*, *Helianthus sp.*, etc.) y esporas de hongos (*Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, etc.). Otros tipos importantes de alérgenos, son los generados por el hombre a través de prácticas

domésticas y laborales incluyendo ácaros del polvo (*Dermatophagoides sp.*) y esporas de hongos (*Penicillium sp.*). La importancia global de estas partículas no está sólo en función de su antigenicidad (respuestas alérgicas del tipo IgE), sino también de su presencia en el ambiente, su generación, su liberación, niveles altos de exposición, su transporte y el depósito en las mucosas de un huésped susceptible o atópico (Espinosa,1992; Middleton *et. al.*1993).

En los últimos 20 años, múltiples estudios han establecido el papel de los ácaros, no sólo como una fuente importante de alérgenos, sino también se les ha asociado como desencadenantes de enfermedades alérgicas (asma, rinitis, etc.) (Voorhorst *et. al.*1967; Champan *et. al.*1980; Lind,1985; Cardona,1990; Platts-Mills *et. al.*1992; Middleton *et. al.*1993; Kobayashi *et. al.* 1996). De igual manera los polenes y los hongos han sido objeto de una gran variedad de análisis (Boulet *et. al.*1983; Sears *et. al.*1989; Karlsson-Borga *et. al.*1991; Middleton *et. al.*1993; Obispo *et. Al.*1993).

2.5.1 POLENES

En un medio acuoso, los polenes son esféricos y miden de 16 a 40 μm . Durante su transporte aéreo se secan y contraen, asumiendo formas irregulares y tamaños aerodinámicos que facilitan su transportación a miles de kilómetros, lo cual es promovido por el rápido movimiento del aire y por la baja humedad. Los granos de polen facilitan la reproducción de las plantas con semilla (Espermatofitas) y no más del 10 % de las especies contemporáneas son anemófilas (polinización por el viento). Debido a esto y aunado a sus características moleculares, los pólenes pueden actuar como fuentes potenciales de aeroalérgenos ya que usualmente penetran a nivel de la glotis y se depositan en la nariz, faringe, esófago, estómago y ojos (Bush,1989). Ejemplos de ellos son los polenes del fresno, olmo, mora, roble, eucalipto y girasol entre otros (Middleton *et. al.*1993).

En general un polen tiene tres estructuras básicas (Castrejón,1991):

1)Exina, que es la cubierta protectora, en la cual se localizan los poros germinales.

- 2) Intina, capa interna en donde se encuentran sustancias protéicas (antigénicas o alergénicas), las cuales desencadenan mecanismos de sensibilización o alergia.
- 3) Fóvula, es el centro del polen que contiene una sustancia coloidal además de los núcleos vegetativos.

Thomen describió cinco requisitos que debe llenar un polen para considerarlo importante desde el punto de vista alérgico (Castrejón, 1991; Espinosa *et. al.* 1992):

1. Debe contener una fracción alérgica.
2. Debe ser anemófilo.
3. Debe producirse en grandes cantidades.
4. Debe ser ligero para recorrer grandes distancias.
5. La planta que lo produce debe estar abundantemente distribuida.

El polen del girasol (*Helianthus annuus*), está formado por granos de forma esferoidal en vista polar, 34 a 38 μm de diámetro ecuatorial; en la simetría radial se observa un surco elongado en el centro del grano. Presenta elementos estructurales puntiagudos, espinas larga de aproximadamente 4 μm de longitud, redondeadas de la punta y dispuestas uniformemente sobre la superficie. Florece principalmente en Julio y Agosto (Orozco, 1992).

El polen del fresno (*Fraxinus americana*), tiene una vista polar con forma subcuadrada, de 38 a 40 μm de diámetro, simetría radial, tiene cuatro surcos cortos en las esquinas del grano. Los elementos estructurales son muy pequeños (gránulos), con una disposición reticulada. Florece en Mayo y principios de Junio (Orozco, 1992).

2.5.2 ACAROS DEL POLVO

Desde el descubrimiento de los ácaros del polvo como agentes alérgicos en 1964, la asociación entre el ácaro y el asma alérgica ha sido reportada en muchas partes del mundo. Se sabe desde el año de 1967 que los ácaros de la familia Piroglifidae son la fuente más importante de alérgenos contenidos en el polvo. Dentro de esta familia se encuentran cuatro especies dominantes: *Dermatohagoides pteronyssinus*, *D. farinae*,

D. microceras y *Euroglyphus maynei*. (Platts-Mills *et. al.*1992). Los alérgenos de los ácaros pueden estar presentes en las heces fecales y en el cuerpo del ácaro. Los de las heces pesan ~ 0.2 ng y en tamaño son similares a los granos de polen (10 a 35 μm de diámetro). Los ácaros dependen de la humedad ambiental y de la temperatura, siendo entre 18° a 27°C la temperatura óptima para su crecimiento. Así los niveles de ácaros en el polvo de las casas pueden cambiar debido a las variaciones estacionales en el clima o cambios en los muebles de las casas, por lo que el nivel de riesgo cambia (Voorhorst *et. al.*1967). Además se han estudiado una gran variedad de especies de ácaros del género *Dermatophagoides*, observando que éstos se encuentran en cualquier condición ambiental que posea temperatura, humedad y estratos apropiados (Platts-Mills *et. al.*1992), siendo éste género uno de los más importantes productores de alérgenos, con prevalencia hasta de 30% (Juan,1990).

2.6 ANALISIS DE ALERGENOS

Debido a la importancia de los alérgenos en la Salud Pública, se han establecido una gran variedad de metodologías para la caracterización de proteínas alérgicas. Así por ejemplo, la separación de mezclas de alérgenos se puede realizar por medio de electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (PAGE), en presencia o ausencia de SDS (dodecil sulfato sódico). Estas matrices son capaces de permitir el análisis de complejos proteicos que contienen una gran variedad de componentes, separándolos e identificándolos en base a su movilidad, punto isoeléctrico y peso molecular a través de la tinción con colorantes o marcajes selectivos (Stott,1989). El desarrollo de metodologías para transferir estas proteínas de un gel de poliacrilamida hacia una membrana de nylon o nitrocelulosa (Towbin *et. al.*1979,1984), para posteriormente efectuar una inmunoreacción sobre ésta, han mejorado considerablemente el análisis de proteínas antigénicas, principalmente de aquellas con pesos moleculares grandes. Estos inmunoensayos en soportes o fases sólidas han tenido múltiples aplicaciones en la investigación básica y clínica, ya que la transferencia de proteínas hacia la nitrocelulosa es rápida y en la mayoría

de las veces completa (Stott, 1989). Además esta metodología combina la alta resolución de un gel de PAGE-SDS con la sensibilidad y la facilidad de realizar ensayos en fase sólida (Towbin *et. al.* 1979, 1984). En general este tipo de metodología se puede denominar como ensayos de Western blot, Inmunoblot o Inmunoelctrotransferencia (IET) (Figura 5).

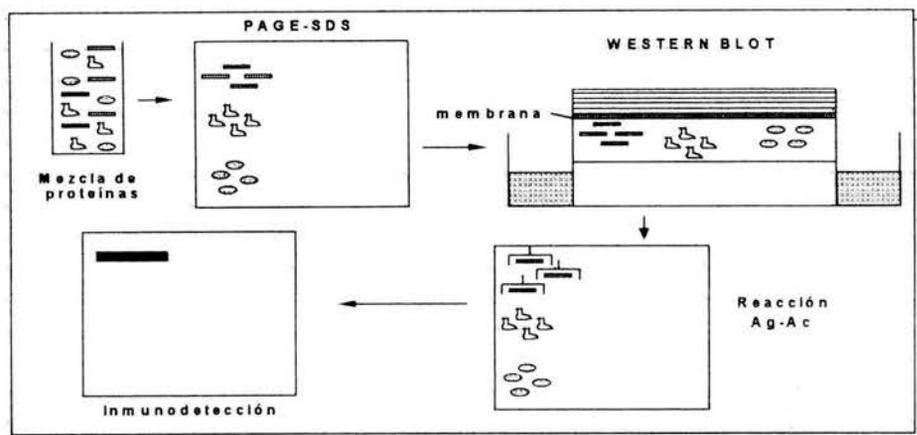


Figura 5. Una mezcla compleja de proteínas puede ser separada por medio de PAGE-SDS y transferida hacia un soporte sólido (nylon, nitrocelulosa, etc.), para realizar una inmunodetección. Esta metodología es conocida como Inmunoelctrotransferencia o Western blot. Modificado de Abbas *et. al.* 1994.

Dado que el tipo de acs involucrados en las respuestas de pacientes alérgicos es del tipo IgE e IgG₄, se requiere de una técnica altamente sensible como es la Inmunoelctrotransferencia para su detección, puesto que los niveles de estos acs son regularmente bajos (Abbas *et. al.* 1994). Una de las condiciones que son esenciales para que la resolución de la inmunodetección sea clara, es el bloqueo, el cual se debe realizar una vez transferidas las proteínas. Este paso previene uniones no específicas del material a estudiar con la membrana, y equivale a la inactivación o saturación de los sitios de la membrana que no estén ocupados por proteínas. Algunas soluciones utilizadas para bloquear son albumina sérica bovina (BSA), detergentes no iónicos como Tween 20 y leche descremada entre otros (Sutton, 1989).

Existen estudios referentes a las metodologías de extracción de proteínas, en donde se utilizan solventes orgánicos como etanol, eter y acetona. Esta metodología hace énfasis en que proteínas altamente hidrofóbicas pueden ser precipitadas con éste solvente orgánico (Scopes, 1985).

Los alérgenos también pueden ser estudiados por medio de Radioalergoabsorbencia (RAST), en éste tipo de metodología se requiere de un alérgeno acoplado en forma covalente a un disco de papel, el cual reaccionará con la IgE específica del paciente en estudio. Posteriormente se agrega anti-IgE conjugada con una enzima como la β -galactosidasa, la cual reacciona con la IgE ligada con el antígeno dando un complejo alérgeno-IgE-anti-IgE. El cual puede ser detectado por una reacción colorida midiendo la absorbancia a 420 nm, siendo dicha absorbancia directamente proporcional a los niveles de alérgeno-IgE específica (Abbas *et. al.* 1994).

2.6.1 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE ALERGENOS

La estandarización de extractos de alérgenos ha cobrado gran interés en los últimos años debido a que éstos no sólo son mezclas complejas, sino que los acs de diferentes pacientes atópicos pueden reaccionar de forma muy diversa a distintos componentes en los mismos extractos. Los miembros de la Academia Americana de Alergia en el año de 1944 llegaron al acuerdo de utilizar tres medidas para comparar la calidad de los extractos de alérgenos. Dentro de estas medidas se encuentran:

- 1.-Cuantificar la concentración de las moléculas alérgénicas contenidas en los extractos. El método original para 1944 se hacía midiendo el contenido de proteínas nitrogenadas y desde 1989 se hace por técnicas inmunoquímicas con acs murinos policlonales o monoclonales contra los alérgenos mayores, o por medio de acs IgE humanos que permitan evaluar la actividad alérgénica mediante RAST o IET. (Figura 5).
- 2.-Cuantificar la actividad biológica. Esto se evaluaba en 1944 por pruebas cutáneas pero a partir de 1989, además de la prueba cutánea se cuantifica la cantidad de histamina producida por los basófilos, con o sin reto nasal.
- 3.-Considerar la calidad de la fuente de los materiales utilizados para la producción de los extractos, así como su manejo. Esto se hace de 1944 a la fecha por medio de taxonomía, y teniendo especial cuidado en los detalles de procedencia, colecta, almacenaje y manufactura de los extractos.

Desde 1944 a la fecha la calidad de los extractos alérgicos ha estado a cargo de sociedades profesionales supervisado por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization WHO). Estas sociedades han adoptado tres sistemas de unidades para los extractos de alérgenos: la OMS trabaja con Unidades Internacionales (IUs), en los estados Nórdicos y la mayor parte de Europa se utilizan Unidades Biológicas (BUs) y el Centro de Investigación y Evaluación de Biológicos de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos utiliza Unidades Alérgicas (AUs). La OMS analiza extractos de alérgenos para preparar estándares internacionales con la finalidad de utilizarlos en investigación. Desde el año de 1989 existen estándares para *D. pteronyssinus*, *Ambrosia*, pastos, perro y abedul. (Reed *et. al.* 1989).

La nomenclatura usada para los alérgenos purificados, utiliza el nombre en Latín del organismo de donde proviene el alérgeno (género y especie) y un número Romano para cada alérgeno derivado de dicho organismo. Por ejemplo para las especies de ambrosia (*Ambrosia*), los nombres de los alérgenos purificados son *Amb a I* hasta *Amb a VI*. Para una especie de pasto (*Lolium*), los nombres son *Lol p I*, etc. En el caso de las dos especies de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*), los nombres que se les dan son *Der p I* y *II*; y *Der f I*, etc (Paul, 1993).

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Existen reportes que indican que el desarrollo de tres polinosis en México y América del Sur es debido a la producción de polenes de alamos, robles y fresnos (Middleton *et. al.* 1993). Estos últimos son de gran interés clínico ya que producen polen en grandes cantidades como por ejemplo el fresno blanco (*F. americana*), el fresno de Oregon (*F. oregona*) y el fresno de Arizona (*F. velutina*). Así mismo hay estudios en donde se han caracterizado los antígenos mayores de polenes (Obispo *et. al.* 1993), y otros en donde se han identificado los componentes alergénicos (Di Felice *et. al.* 1994) (Tabla 4). No existen reportes que describan cuales son las proteínas antigénicas presentes en los fresnos y girasoles, sin embargo se sabe que las proteínas contenidas en los polenes capaces de sensibilizar a un individuo atópico tienen un rango de tamaño entre 10 a 60 KDa. Un ejemplo son los polenes del cedro de la montaña (*Cry j 1*) y cedro japones que tienen un peso entre 40 a 50 KDa. También se han purificado los alérgenos del centeno (*Lolium*): *Lol p 1*, *II* y *III*, encontrándose que el 95% de los pacientes exhiben reactividad hacia los alérgenos del grupo I; también se han purificado alérgenos de 12 KDa a partir de hierbas de la pared (Bush, 1989). En un estudio realizado por Pastorello en 1994 mostró que los componentes que unieron a la IgE de los pacientes en extractos de frutas fueron de 14 a 20 KDa; en el extracto de cereza los acs de los pacientes atópicos reaccionaron con un polipéptido de 30 KDa en un 77%, otros polipéptidos de alto peso molecular (40-70 KDa) fueron reconocidas en los diferentes extractos, aunque en una proporción menor (16% al 38%). En el mismo estudio se analizaron las proteínas reconocidas por pacientes alérgicos en extractos de durazno, cereza, albaricoque y ciruela, así como el polen del pasto y abedul (los últimos dos provenientes de extractos comerciales), encontrando que en el procedimiento de extracción estos presentaron concentraciones de proteína de 3.56 mg/ml, 7.34 mg/ml, 2.87 mg/ml, 3.92 mg/ml, 9.37 mg/ml y 5 mg/ml respectivamente, cuantificadas por el método de Lowry.

PM (KDa)	IgE	IgG
≥100	1 (11)*	
70	7 (77)	3 (12)•
50		3 (12)
46	3 (33)	7 (27)
43	9 (100)	1 (4)
41		4 (15)
39		3 (12)
38		13 (50)
37.5		22 (85)
36	5 (55)	1 (4)
30.5		7 (27)
29.5		8 (31)
19	4 (44)	9 (35)
17.5		15 (58)
17		17 (65)
16.5		18 (69)

Tabla 4. Pesos moleculares de los antígenos del polen del ciprés reconocidos por pacientes alérgicos. *Porcentaje calculado a partir de 9 sueros que reaccionaron con al menos un polipéptido. •Porcentaje calculado de a partir de 26 sueros que reaccionaron con al menos una polipéptido. (Tomado de Di Felice *et. al.* 1994)

Los alérgenos dominantes del ácaro (*Dermatophagoides sp*) se clasifican en los grupos I, II, III y IV (Tabla 5). Niveles de exposición de 2 µg a 10 µg de los alérgenos del grupo I por gramo de polvo (equivalente a ~100 a 500 ácaros/gr), son relevantes en el desarrollo del asma alérgica (Platts-Mills *et. al.* 1992). En algunas partes del mundo, más del 80% de los niños y adultos jóvenes con asma tienen resultados positivos a los ácaros en pruebas cutáneas (Voorhorst *et. al.* 1967; Champan *et. al.* 1980; Lind, 1985; Cardona, 1990; Platts-Mills *et. al.* 1992; Middleton *et. al.* 1993; Kobayashi *et. al.* 1996). En lo que se refiere a las respuestas inflamatorias, se ha sugerido que un nivel de ácaros en el rango de 100 a 500 por gramo de polvo, son un factor de riesgo para este tipo de respuestas, además la

presencia de altos niveles de ácaros pueden ser un factor importante en la inducción de síntesis de acs IgE y de asma en individuos atópicos.

Alergeno	PM (KDa)	Función	Punto isoelectrico	Reconocimiento por individuos alérgicos
GRUPO I				80 % con IgE
<i>Der p I</i>	25	Cistein-proteasa	4.5-7.1	
<i>Der f I</i>	25		4.7-7.2	
<i>Der m I</i>	25		-	
<i>Eur m I</i>	25		-	
GRUPO II				80 % con IgE
<i>Der p II</i>	14	Desconocida	7.6-8.5	
<i>Der f II</i>	14		7.8-8.3	
GRUPO III				60 y 70 % con IgE
<i>Der p III</i>	30	Tripsina	4>8	
<i>Der f III</i>	29	Serin proteasa	4.1-4.7	
GRUPO IV				25 y 46 % con IgE
<i>Der p IV</i>	60	Amilasa	-	
-	27	Serin proteasa	-	36 % con IgE

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los alérgenos dominantes presentes en los ácaros del polvo. Tomado de Platts *et. al.* 1993.

En lo referente a la respuesta inmune, se menciona que la mayoría de los individuos con pruebas cutáneas positivas para extractos de *D. pteronyssinus* producen acs anti *Der p I* en suero del tipo IgG, IgA, e IgE, mientras que los individuos con pruebas cutáneas negativas tienen niveles de acs no detectables, aunque pueden producir bajos niveles de acs IgG, del 20% al 30%, pero sin producir IgE. Existe una buena correlación cuantitativa entre los niveles de acs IgG e IgE, siendo que la IgE nunca se encuentra sin la presencia de IgG teniendo un radio de acs IgG:IgE es entre 2:1 y 15:1, y los niveles de acs IgE son generalmente más altos que los acs IgA. La respuesta hacia los alérgenos del ácaro en individuos alérgicos es similar a lo reportado para una gran variedad de alérgenos

purificados de polenes, y la correlación entre los acs IgG e IgE sugiere que estos dos isotipos están bajo un control genético e inmunoregulador común.

Estudios inmunoquímicos muestran que más del 80% de los pacientes alérgicos a los ácaros presentan acs del isotipo IgE contra los alergenos del grupo I y II. Para los alergenos de grupo III se tiene un porcentaje de Ac IgE entre el 60% y 70%, detectables por Radioalergoabsorbencia (RAST) e Inmunoelectrotransferencia. Se menciona que pueden existir alrededor de 30 componentes en los extractos de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, que pueden unir acs del isotipo IgE. Tres de estos compuestos han sido analizados: el primero es la proteína amilasa de 60 KDa la cual fué purificada a partir de *D. pteronyssinus* (Lake *et. al.* 1991), en inmunoblots reacciona con los acs IgE del suero de pacientes en un 25% a 46%. Dicha proteína esta considerada dentro del grupo IV de alergenos del ácaro. El segundo es una serin proteasa de 27 KDa la cual reacciona con un 36% de los sueros y el tercero es una proteína clonada de una librería de cDNA de *D. pteronyssinus*, la cual reacciona con un 40% a 50% de los sueros de pacientes atópicos en E.E.U.U. (Tovey *et. al.* 1989).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

*Identificar las principales proteínas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus* reconocidas por sueros de pacientes atópicos mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

*Extraer las proteínas a partir de extractos glicerinados de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus* utilizando solventes orgánicos.

*Analizar los extractos proteicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus* mediante PAGE-SDS.

*Identificar por medio de IET proteínas alérgicas específicas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus*, reconocidas por IgGs totales e IgE presentes en sueros de individuos atópicos mexicanos.

5. JUSTIFICACION

Existen una gran variedad de aeroalergenos ambientales que afectan a los pacientes atópicos, causando irritación en las mucosas y la obstrucción de las vías aéreas después de ingresar al tracto respiratorio (Sears *et. al.*1989), dando como resultado una reacción alérgica. Dichos aeroalergenos inhalables pueden provenir tanto de los polenes (Middleton *et. al.*1993, Obispo *et. al.*1993), como de los ácaros del polvo (Voorhorst *et. al.*1967; Champan *et. al.*1980; Lind,1985; Cardona,1990; Platts-Mills *et. al.*1992; Middleton *et. al.*1993; Kobayashi *et. al.*1996), los cuales son capaces de inducir respuestas inmunes del tipo IgG₄ e IgE principalmente (Romagnani,1994). En la práctica clínica se realizan pruebas cutáneas (Deborg,1989), utilizando extractos comerciales de alergenos glicerizados en diferentes diluciones (1:10, 1:100, etc.) con la finalidad de evaluar la respuesta alérgica en pacientes atópicos. La mayoría de las veces dichos extractos pueden ser mezclas complejas y variables de proteínas (Kjell As,1975), de los cuales no se conoce el patrón ni el contenido proteínico, de tal forma que se puede provocar una respuesta inespecífica y por lo tanto un diagnóstico falso. En nuestro medio no se conocen los perfiles de reconocimiento antigénico hacia las proteínas de *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro del polvo), *Fraxinus americana* (fresno) y *Helianthus annus* (girasol), en pacientes atópicos mexicanos. De ahí la necesidad de caracterizar dichas proteínas, ya que la respuesta hacia los alergenos generalmente tiene un caracter genético ligado a susceptibilidad y exposición. Esta caracterización de proteínas puede realizarse utilizando un método eficaz y altamente sensible como es la Inmunoelctrotransferencia, la cual es un método de estudio ideal por su alta afinidad y por su amplio potencial para la identificación de estas proteínas (Stott,1989), aún cuando se encuentren mezcladas con materiales complejos. De este modo resulta importante realizar una evaluación tanto cuantitativa como cualitativa de los extractos alérgicos, que permita tener una prueba diagnóstica de mayor especificidad para caracterizar la respuesta de pacientes atópicos

mexicanos. Además se limitaría la variabilidad que existe en el contenido de los extractos alergénicos cuando éstos son producidos en diferentes compañías o cuando los extractos provienen de diferentes lotes dentro de una misma compañía, al evaluar la respuesta de sueros control en estos extractos. Aunado a lo anterior la utilización de un extracto estandarizado ofrecerían múltiples ventajas tanto para los pacientes como para el médico alergólogo, ya que si el extracto de un alérgeno en particular tiene estandarizadas las concentraciones de proteínas específicas que van a ser reconocidas por los pacientes, se permitiría evaluar cuantitativamente el diagnóstico y la aplicación de estos extractos en inmunoterapia favoreciendo la utilización confiable y segura de estas pruebas (Reed *et. al.* 1989).

ESTRATEGIA METODOLOGICA

ALERGENOS GLICERINADOS

Lab. Aphi S.A. de C.V.

Extracción de proteínas

Acetona 100%

Scopes, 1985

Cuantificación de proteínas

Lowry, 1951

PAGE-SDS

Laemli, 1976

SUEROS DE PACIENTES
ATOPICOS

PCI ++++ para *D. pteronyssinus*,
F. americana y *H. annuus*.

IET (IgGs totales e IgE)

Towbin, 1979

6. METODOLOGIA

6.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de suero fueron obtenidas de pacientes mayores de 16 años remitidos al servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, para su evaluación por posible alergia respiratoria. A todos los pacientes se les realizó una historia clínica completa y pruebas cutáneas intradérmicas (PCI) por el método de "Prick" (Deborg, 1989; Arreguín, 1995), para 15 alérgenos comunes en el Valle de México (Tabla 6). A los pacientes que resultaron positivos hacia alguno de los tres alérgenos antes mencionados, se les solicitó su consentimiento por escrito para obtener una muestra de sangre por punción venosa periférica (5ml). Una vez obtenida la sangre, se dejó coagular para separar el suero por medio de centrifugación a 1,400 g (Centrífuga Sorvall TR 6000D), durante 20 min. Alicuotas de 300 µl se almacenaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Se colectaron 20 sueros positivos por la prueba de Prick para cada uno de los alérgenos antes mencionados y 20 suero negativos que serán utilizados como controles. Todos lo pacientes positivos tenían rinitis alérgica y los negativos rinitis no alérgica.

HONGOS	POLENES	INHALABLES
<i>Fusarium sp.</i>	* <i>Fraxinus americana</i>	Polvo cascro
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Capriola sp.</i>	* <i>D. pteronyssinus</i>
	<i>Quercus sp.</i>	<i>D. farinae</i>
	* <i>Helianthus annus</i>	Perro
	<i>Ambrosia sp.</i>	Gato
	<i>Lolium sp.</i>	Cucaracha
	<i>Artemisa sp.</i>	

Control Negativo (Evans)

Control Positivo (Histamina)

Tabla 6. Lista de alérgenos aplicados para pruebas cutáneas en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS. * Alérgenos utilizados en el presente estudio.

6.2 EXTRACCION DE PROTEINAS

Se utilizaron extractos totales de alergenios glicerizados (Lab. Aphi S.A. de C.V.) provenientes de *D. pteronyssinus*, *F. americana* y *H. annus* diluidos 1:10. Dichos alergenios fueron procesados agregando un volumen igual (10 ml) de acetona al 100% (Scopes, 1985) para extraer las proteinas. Se dejaron incubar durante media hora a -20°C, para despues centrifugar las muestras (Sorvall RC-5B Dupont instruments) a 40,000 g por 10 min. a 4°C para precipitar las proteinas. El sobrenadante se desecho y la pastilla se resuspendió en 1 ml PBS 1X (Amortiguador de fosfatos salino) en frio, además se adicionaron inhibidores de proteasas en las siguientes concentraciones por ml de antigeno: 86 µl de EDTA (Etilendinitrotetracetato), 50 µl de PMSF (Fenil Metil Sulfonil Fluoruro), 50 µl de TLCK (N-p-Tosil-Lisina Clorometil Cetona) y 33 µl de TPCK (L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona). Una vez realizada esta mezcla, se almacenó a -20°C en alicuotas de 200 µl para su posterior cuantificación y análisis electroforético.

6.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Las concentraciones de proteinas se cuantificaron en microplacas de fondo plano empleando el Método de Lowry (De Protein Assay Instruction Manual Bio-Rad) (Lowry *et. al.* 1951), utilizando una curva patrón de proteinas con albúmina, y agua como blanco. La Absorbancia fué leída a 690 nm en un lector de ELISA (Labsystems Integrated Management System, Oslo, Finland).

6.4 ELECTROFORESIS (PAGE-SDS)

Las proteinas se separaron en geles de poliacrilamida (7 X 8 cm) al 10% (Laemmli, 1970) en presencia de SDS (sodio dodecil sulfato). Los geles se prepararon de un grosor de 0.75 mm, entre dos placas de vidrio en donde se aplicó la mezcla para preparar el gel espaciador hasta una altura de 5 cm, sobre la cual se aplicó alcohol isopropílico para obtener una polimerización uniforme y evitar la formación de un menisco. Despues se retiró el alcohol y se lavó el gel con agua desionizada para eliminar el

exceso de alcohol, para posteriormente agregar la mezcla del gel concentrador en donde además se inserto antes de la polimerización el peine respectivo al gel analítico. Una vez realizado el gel se procedió a colocar 50 µg de proteína por carril de cada muestra, las cuales fueron hervidas durante 5 min. antes de ser colocadas, utilizando un amortiguador de muestra 2X (1.25 ml de amortiguador de muestra, 1.0 ml de glicerol, 0.5 ml de 2β-mercaptoetanol, 1.0 ml de SDS 10%, 0.2 % de azul de bromofenol aforando con agua desionizada a 10 ml). El corrimiento electroforético se efectuó a 100 V (Mini PROTEAN II y fuente de poder 3000 XI Bio Rad, USA), durante 10 min. para permitir la entrada de las proteínas y a 140 V durante 1:30 hrs. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie al 0.1% (Bio Rad) durante 24 hrs. y desteñidos con metanol 50% y ácido acético 7.5% (2 cambios de 15 min c/u).

Para caracterizar los pesos moleculares de las bandas de alergen se utilizaron como marcadores de peso molecular albúmina bovina 66 KDa, albúmina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa y lactoalbúmina 14.2 KDa (SIGMA CHEMICAL Co.).

6.5 ELECTROTRANSFERENCIA

Una vez evaluados los patrones de bandas de proteínas, se realizó la electrotransferencia (Towbin *et. al.* 1979), en donde las proteínas se separaron utilizando las condiciones electroforéticas antes mencionadas con la excepción de que se aplicaron 500 µg de proteína en geles preparativos de 1.0 mm de grosor. Posteriormente las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa de 0.45 µm (Trans-blot transfer Bio Rad, USA), utilizando buffer de transferencia (1X) el cual contenía Glicina (15.5 %), Trisma base (72 %) y Metanol a un pH de 8.3. Acomodando en la cámara de transferencia partiendo del anodo, la esponja, papel filtro, papel de nitrocelulosa, gel con proteínas, papel filtro y esponja, cuidando de eliminar por completo las burbujas y de no perder la orientación del gel. Dicha transferencia se realizó durante 1 hr a 100 V (Mini PROTEAN II BIO RAD, USA y Fuente de Poder E-C 570 Apparatus Corporation St. Petersburg, Florida) en frío. Para corroborar la transferencia de las proteínas, se recortó la región del papel en donde se

colocaron los marcadores de peso molecular para teñirlos con Negro Amido 0.1% por 15 min. y desteñidos durante 1 min. con una solución desteñidora preparada con isopropanol (5%) y ácido acético (10%). El resto del papel se dejó bloqueando con leche descremada al 5% en PBS 1X durante toda la noche a 4°C para después realizar un lavado muy ligero durante 3 min. con PBS 1X. El papel se recortó en tiras de 0.5 mm de ancho con una muesca en el extremo inferior izquierdo de cada tira e identificar así la posición correcta del frente de proteínas. Las tiras se dejaron secar perfectamente para evitar la formación de hongos y se guardaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

6.6 INMUNODETECCION DE ALERGENOS

La inmunodetección de *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus* se realizó incubando el suero de los pacientes (primer anticuerpo) en una dilución 1:10 en PBS 1X + suero bovino al 2.5% por 2 hrs. La interacción antígeno-ac se reveló utilizando un conjugado (segundo ac) anti IgGs humana-acoplado a peroxidasa (Cappel), diluido 1:1500 en PBS 1X e incubando por 2 hrs adicionando en todos los lavados únicamente PBS 1X (tres lavados después del 1er. y 2do. ac, durante 5 min. c/u). Los pasos anteriores se efectuaron bajo agitación continua y a 37°C.

En el caso de *Dermatophagoides pteromyssinus* las condiciones de detección fueron similares a las descritas, a excepción de los lavados, en donde se utilizó PBS 1X conteniendo Tween 20 (Polioxietilenesorbitan monolaurato) al 0.05%, en uno de los lavados después de la incubación con el segundo ac. El revelado de la interacción antígeno-ac se realizó a temperatura ambiente utilizando 4-cloro- α -naftol (BIO RAD, USA) y peróxido de hidrógeno. Para cada tira se colocaron 500 μ l de esta solución y se dejó revelar de 3 a 5 min. hasta la aparición de bandas. La reacción se detuvo con agua destilada.

Para la inmunodetección de acs IgE se utilizaron inicialmente las condiciones antes mencionadas y un conjugado anti-IgE humano acoplado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates Inc).

La incubación con el primer ac en este caso se realizó utilizando una dilución 1:4 en PBS 1X conteniendo suero bovino al 2.5% y Tween 0.05% durante toda la noche a 25°C. El segundo ac utilizado fué diluido 1:500 en PBS 1X durante 4 horas a 25°C. Las tiras fueron entonces lavadas 3 veces con PBS 1X conteniendo Tween 0.05% durante 10 min. Para revelar las bandas antigénicas se usaron conjugados anti-IgEs humanos acoplados a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates Inc. y American Qualex) y peroxidasa (KPL).

El revelado de los conjugados acoplados a fosfatasa alcalina fué utilizando 500 µl de una solución de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fostato de toluidina) y NBT (p-nitro azul de tetrazolio cloruro) (BIO RAD, USA). En este caso, las tiras se incubaron durante 1 hora deteniendo la reacción con agua. Para el conjugado unido a peroxidasa el revelado se realizó con las condiciones antes mencionadas para el conjugado anti-IgGs.

6.7 QUIMIOLUMINISCENCIA

Para los experimentos de quimioluminiscencia (Huang,1997), se utilizó un bloqueo con leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C. El primer ac se diluyó 1:10 en PBS 1X, y el conjugado anti-IgE humano acoplado a peroxidasa (KPL) fué diluido 1:1500 en PBS 1X. Ambos conjugados fueron incubados 2 horas a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min. con PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0.05%. Al momento de revelar la interacción antígeno-ac las tiras se colocaron individualmente entre dos plasticos y se les eliminó el exceso de amortiguador de lavado pero sin dejar que las tiras se secaran. Después se aplicaron 100 µl de solución de revelado por tira que contenía el sustrato quimioluminescente (ECL Amersham) diluido 1:5 en PBS 1X, todo esto en el cuarto oscuro y usando un filtro de luz roja. La reacción se efectuó durante 30 seg. y se eliminó el exceso de revelador para después exponer durante 1 min. una placa de rayos X y finalmente revelar para observar los polipéptidos antigénicos reconocidos por los acs de los pacientes.

6.8 ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis estadístico utilizando el índice de concordancia de “kappa” (κ) el cual es un parámetro estadístico que se emplea para medir la correspondencia entre dos pruebas (IET y PCI) ante una variable dicotómica (positivo+, negativo-) (Dawson, 1990). Se define como la concordancia más allá de la probabilidad dividida entre la cantidad de concordancia posible más allá de la probabilidad:

$$\kappa = \frac{O - C}{1 - C}$$

donde O es la concordancia observada y C la concordancia por probabilidad.

Según Dawson, 1990 los valores de κ pueden agruparse de la siguiente manera:

0 - 0.2	malo
0.21 - 0.4	regular
0.41 - 0.6	bueno
0.61 - 0.8	muy bueno
0.81 - 0.9	perfecto

7. RESULTADOS

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Se analizaron extractos de alergenios glicerizados proporcionados por los Laboratorios Aphi S.A. de C.V. en una dilución 1:10 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus*. Los rendimientos de proteína cuantificados por el Método de Lowry se muestran en la Tabla 7, en donde se observa la variabilidad existente en los extractos de diferentes lotes y se muestra el lote utilizado para los ensayos de IET.

LOTE	<i>D. pteronyssinus</i>	<i>F. americana</i>	<i>H. annuus</i>
1	7.80	6.48	2.20
2	5.60	7.86	3.35
3	4.63	7.80	5.63
4	5.20	7.30	3.70
*5	* 7.05	* 8.80	* 5.60
PROMEDIO	6.06	7.65	4.10

Tabla 7. Concentraciones de proteína extraídas a partir de alergenios glicerizados cuantificadas por el Método de Lowry. Las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. * Lote utilizado en el presente estudio.

ELECTROFORESIS (PAGE-SDS)

Cuando se evaluaron los perfiles electroforéticos de la proteínas extraídas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fraxinus americana* y *Helianthus annuus* a partir de alergenios glicerizados provenientes de diferentes lotes, observamos que a pesar de que los contenidos de proteína se mantuvieron similares en el proceso de extracción, los perfiles proteicos en los geles variaban de lote a lote. Lo anterior ocurrió principalmente para el extracto del ácaro del polvo, mientras que en los extractos de los polenes no se observaron cambios importantes. Se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, corriendo 50 μg de proteína por carril. (Figura 6).

INMUNODETECCION

Para este estudio se colectaron 20 sueros positivos para cada alérgeno estudiado por medio de PCI, ya que ésta prueba es utilizada en la práctica clínica. Dicha prueba es capaz de identificar sujetos alérgicos pero no permite identificar la naturaleza de los alérgenos involucrados en la respuesta alérgica, ya que sólo es capaz de evaluar el nivel de respuesta de inflamación localizada por el tamaño de la roncha producida. Así esta prueba evalúa con cruces de 1-4 la comparación entre el control positivo de histamina y negativo de solución de Evans (solución amortiguadora salina) la alergia hacia un antígeno determinado. Todos los pacientes positivos de este estudio tuvieron resultados positivos de 3 a 4 cruces según el criterio del médico alergólogo. Dichos sueros fueron utilizados en los ensayos de IET para evaluar la respuesta inmune utilizando un conjugado anti-IgGs totales.

De los 20 sueros utilizados 15 reconocieron al menos un polipéptido cuando se utilizó como antígeno al *D. pteronyssinus*, representando un 75% de reconocimiento. Los polipéptidos de proteínas reconocidos tuvieron pesos moleculares de 83, 74, 44, 29 y 14 KDa (Tabla 8 y Figura 7). Los sueros provenientes de pacientes con PCI negativa no reconocieron ningún polipéptido, lo cual garantizó la especificidad de la prueba.

En el caso del polen de *F. americana* sólo 7 de los sueros dieron resultado positivo, representando un 35% de reconocimiento. Los polipéptidos reconocidos tuvieron pesos moleculares de 57, 42 y 14 KDa (Tabla 8 y Figura 8). Para el caso de *H. annuus* el porcentaje de reconocimiento fue igual que el anterior pero con polipéptidos de 27, 36 y 14 KDa (Tabla 8 y Figura 9). Los sueros provenientes de pacientes con PCI negativa tampoco reaccionaron contra estos extractos.

Alergeno	Polipéptidos reconocidos (KDa)	No. de pacientes	Porcentaje (%)
<i>D. pteronyssinus</i>	83	15	75
	74	15	75
	44	3	15
	14	2	10
	29	1	5
<i>F. americana</i>	57	5	25
	42	3	15
	14	1	5
<i>H. annuus</i>	27	4	20
	36	2	10
	14	1	5

Tabla 8. Porcentajes de reconocimiento de proteínas de alergenos por sueros de pacientes atópicos utilizando el conjugado anti-IgGs totales.

Se realizaron experimentos utilizando conjugados anti-IgE acoplados a peroxidasa (KPL) y a fosfatasa alcalina (American-Qualex y Southern Biotechnology Associates Inc.), aplicando las condiciones de incubación y lavados utilizadas para revelar acs IgGs. Con ninguno de los tres conjugados fué posible el reconocimiento de los acs IgE, mediante reacciones coloridas, ya que se mostraban un alto grado de inespecificidad (Figura 10), que no permitió diferenciar entre sueros positivos y negativos. Por otro lado cuando se utilizaron las condiciones descritas por Karlsson en 1991 para revelar acs IgE se obtuvieron nuevamente resultados inespecíficos (Figura 11).

QUIMIOLUMINISCENCIA

Debido a la inespecificidad encontrada con los conjugados anti-IgE se realizaron experimentos revelando por agentes quimioluminiscentes (Huang, 1997). En estos ensayos sólo se utilizarón algunos de los sueros (8) con la finalidad de estandarizar el método,

encontrando que se pueden reconocer polipéptidos de proteínas de 14, 29, 34, 42, 48 y 63 KDa para *F. americana*, los cuales permiten diferenciar entre sueros positivos y sueros negativos (Figura 12).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba estadística con el índice de concordancia de κ la cual evalúa la correspondencia entre los resultados obtenidos mediante IET y PCI, ante una variable dicotómica (positivo +, negativo-). Los resultados se muestran en la Tabla 9 para *D. pteronyssinus* y en la Tabla 10 para *F. americana* y *H. annus*.

		PC		
		+	-	T
IET	+	15	0	15
	-	5	20	25
	T	20	20	40

Tabla 9. Prueba estadística de κ para evaluar la concordancia de los resultados obtenidos por IET y PCI en pacientes alérgicos hacia *D. pteronyssinus*; + se reconoció al menos un polipéptido, - no se reconoció ningún polipéptido.

		PC		
		+	-	T
IET	+	7	0	7
	-	13	20	33
	T	20	20	40

Tabla 10. Prueba estadística de κ para evaluar la concordancia de los resultados obtenidos por IET y PC en pacientes alérgicos hacia *F. americana* y *H. annus*; + se reconoció al menos un polipéptido, - no se reconoció ningún polipéptido.

Se obtuvo un valor de 0.844 en la prueba estadística de κ cuando se utilizó como antígeno al *D. pteronyssinus*, el cual dentro de la clasificación de Dawson en 1990 nos indica que la concordancia entre las PCIs y el IET para el ácaro es muy buena y no es debida al azar.

Para los polenes se obtuvo un valor de 0.593 tanto para *F. americana* como para *H. annuus*, este dentro de la clasificación de Dawson en 1990 nos indica que la concordancia entre las PCIs y el IET para estos polenes es buena y no es debida al azar.

EXTRACCION DE PROTEINAS CON ACETONA A PARTIR DE ALERGENOS GLICERINADOS

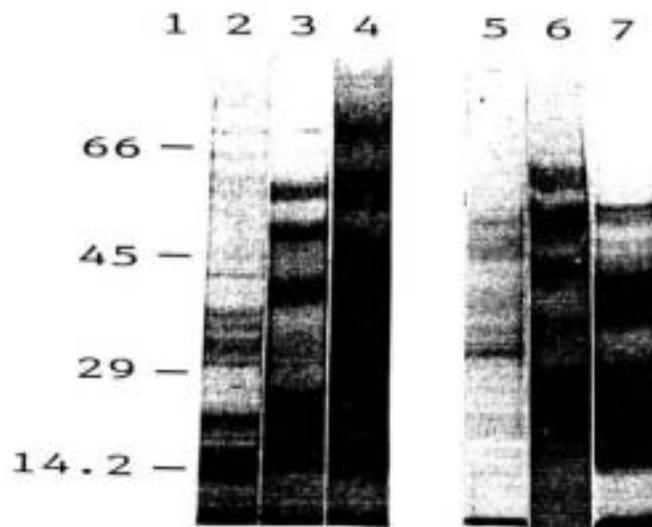


Figura 6. Análisis por PAGE-SDS de proteínas obtenidas de alérgenos glicerizados, provenientes de diferentes lotes. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carril 2 y 5.- *Dermatophadoides pteronyssinus*, Carril 3 y 6.- *Fraxinus americana*, Carril 4 y 7.- *Helianthus annuus*. En todos los casos se utilizaron 50 μ g de proteína/carril, las cuales fueron extraídas con acetona al 100%. La concentración de poliacrilamida en el gel fué al 10%. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 10 min y a 140 V, durante 1.5 hrs, a 4°C. La tinción del gel se realizó con una solución de Azul de Coomassie al 0.1%.

INMUNODETECCION DE ANTIGENOS DEL ACARO DEL POLVO (*Dermatophagoides pteronyssinus*)
UTILIZANDO SUEROS DE PACIENTES ATOPICOS

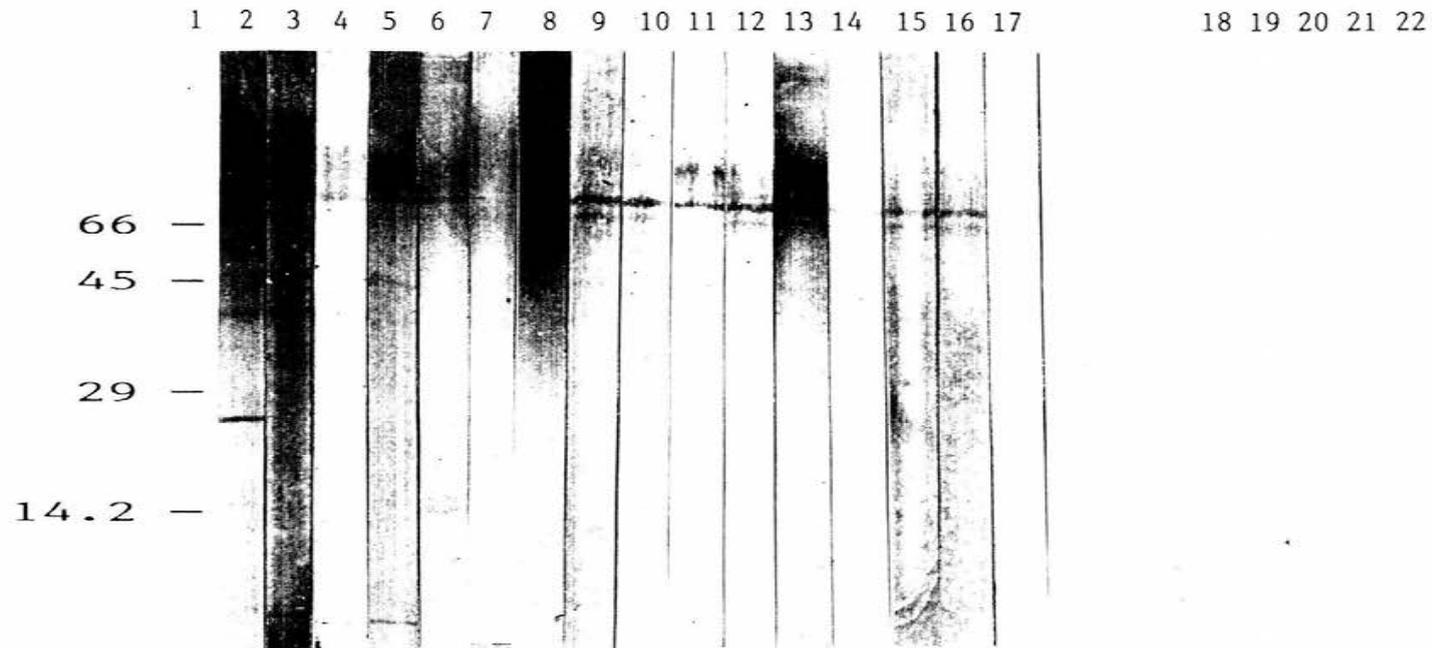


Figura 7. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Dermatophagoides pteronyssinus*. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa, y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carriles 2-17 sueros de pacientes atópicos positivos al acaro en PCI. Carriles 18-22 sueros negativos. La dilución del suero utilizada fué 1:10; se utilizó un conjugado anti-IgGs totales acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1500. En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fueron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

INMUNODETECCION DE ANTIGENOS DEL POLEN DEL FRESNO (*Fraxinus americana*) UTILIZANDO SUEROS DE PACIENTES ATOPICOS

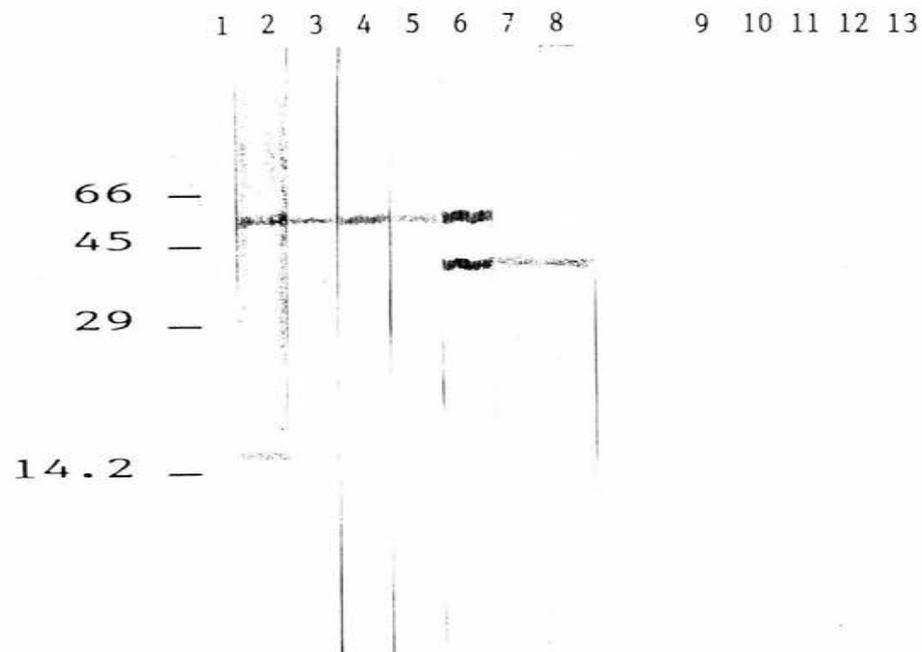
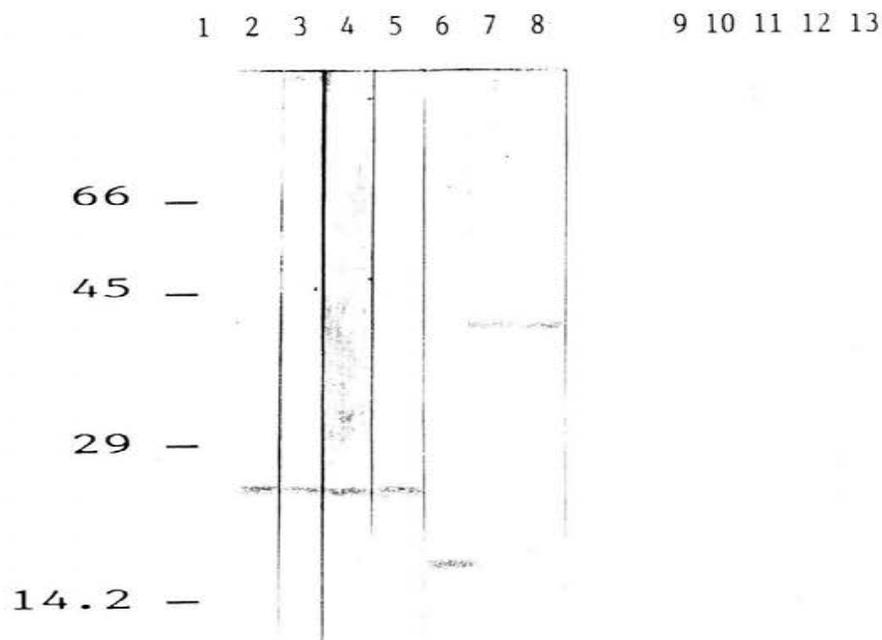


Figura 8. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Fraxinus americana*. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa, y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carriles 2-8 sueros de pacientes atópicos positivos al fresno en PCI. Carriles 9-13 sueros negativos. La dilución del suero utilizada fué 1:10; se utilizó un conjugado anti-IgGs totales acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1500. En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fuerón de acuerdo a lo descrito en material y metodos.

INMUNODETECCION DE ANTIGENOS DEL POLEN DEL GIRASOL (*Helianthus annuus*) UTILIZANDO SUEROS DE PACIENTES ATOPICOS



47

Figura 9. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Helianthus annuus*. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa, y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carriles 2-8 sueros de pacientes atópicos positivos al girasol en PCI. Carriles 9-13 sueros negativos. La dilución del suero utilizada fué 1:10; se utilizó un conjugado anti-IgGs totales acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1500. En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fueron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

**INMUNODETECCION DEL POLEN DEL GIRASOL (*Helianthus annuus*)
UTILIZANDO CONJUGADOS ANTI-IgE.**

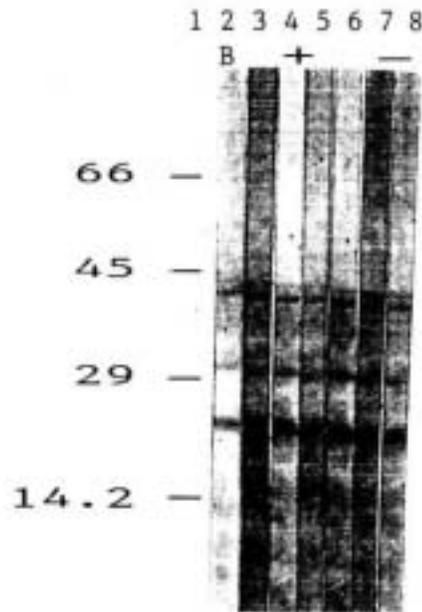


Figura 10. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Helianthus annuus*. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carril 2-8.- sueros de pacientes atopicos positivos al girasol en PCI (+), sueros negativos (-) y blanco (B). La dilución del suero utilizada fué 1:10; se utilizó un con conjugado anti-IgE acoplado a fosfatasa alcalina a una dilucion 1:1500. En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fueron de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

INMUNODETECCION DEL POLEN DEL GIRASOL (*Helianthus annuus*)
UTILIZANDO CONJUGADOS ANTI-IgE

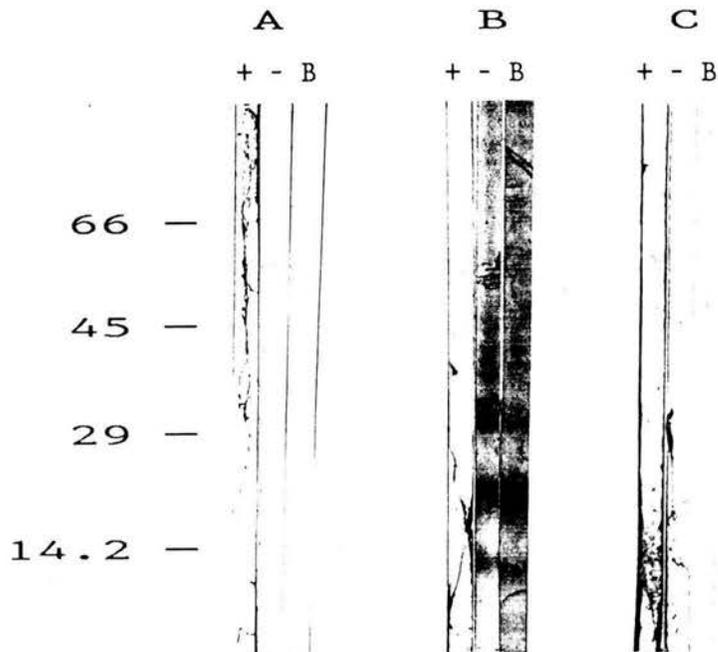


Figura 11. IET de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Helianthus annuus*. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa y α lactoalbumina 14.2 KDa). A).- Conjugado acoplado a peroxidasa (KPL). B).- Conjugado acoplado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology) C).- Conjugado acoplado a fosfatasa alcalina (American Qualex). Se utilizaron sueros de pacientes atopicos positivos al girasol en PCI (+). Sueros negativos (-). Blanco (B). La dilución de los sueros utilizadas fueron 1:4, los conjugados se utilizaron 1:500. En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fueron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

INMUNODETECCION DE ANTIGENOS DEL POLEN DEL FRESNO (*Fraxinus americana*) UTILIZANDO QUIMIOLUMINISCENCIA

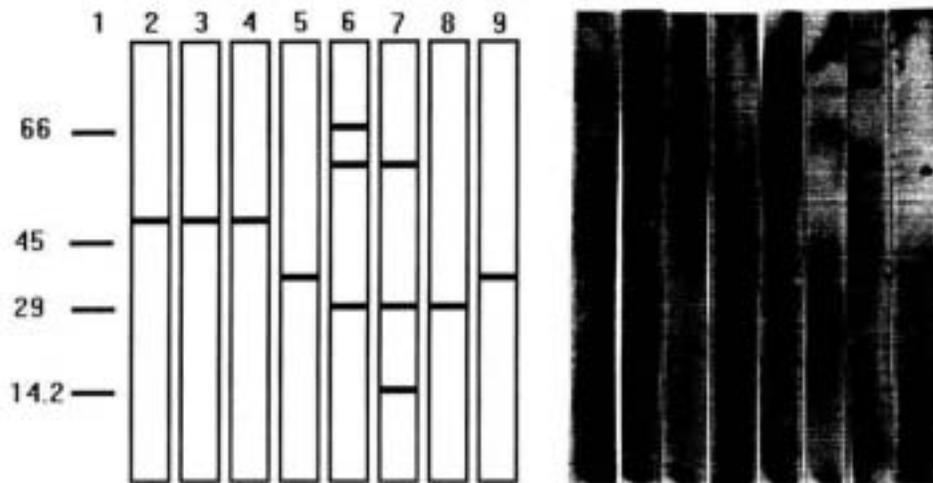


Figura 12. Perfil de antígenos reconocidos en el extracto purificado de *Fraxinus americana* utilizando quimioluminiscencia. Los marcadores de peso molecular se muestran en el Carril 1.- (albumina bovina 66 KDa, albumina de huevo 45 KDa, anhidrasa carbónica 29 KDa y α lactoalbumina 14.2 KDa). Carriles 2-9.- sueros de pacientes atópicos positivos al fresno en PCI. La dilución del suero utilizada fue 1:10; se utilizó un conjugado anti-IgE acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1500. Para el revelado se utilizó un sustrato quimioluminiscente diluido 1:5 (ECL, Amersham). En todos los casos se utilizaron 36 μ g de proteína/carril. Las condiciones de incubación, lavados y revelado fueron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

8. DISCUSION

La estandarización para la purificación de los extractos de alérgenos es un procedimiento importante para la identificación de antígenos en los extractos purificados de diferentes alérgenos, ya que estos presentan mezclas complejas de proteínas con peso molecular y propiedades distintas. Debido a lo anterior, uno de los objetivos del presente trabajo fue identificar las principales proteínas antigénicas, contenidas en extractos glicerinados de *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro del polvo), *Fraxinus americana* (fresno) y *Helianthus annuus* (girasol), que son reconocidas por sueros de pacientes atópicos mexicanos, por medio de ensayos de IET, utilizando conjugados específicos anti-IgGs e IgE totales.

Las variaciones observadas en el análisis electroforético pueden deberse a que tal vez durante el proceso de extracción se hayan perdido proteínas, como resultado de a una precipitación insuficiente o también a la variabilidad existente en los extractos desde el momento de su producción. Debido a esta variabilidad, al momento de estandarizar la técnica, los ensayos de IET se realizaron con extractos de alérgenos procedentes del mismo lote tanto para los polenes como para el ácaro.

En los ensayos de inmunodetección 15 de los pacientes que dieron resultado positivo para el ácaro reconocieron a nivel de IgGs polipéptidos de 83 y 74 KDa. Esta última proteína está muy cercana al peso molecular de la proteína reportada en los estudios de Platts y colaboradores en 1993, los cuales demuestran la existencia de una Amilasa del ácaro de 60 KDa, a la cual se le denominó como *Derp IV*. La proteína de 83 KDa no está reportada como antígeno inmunodominante para el ácaro, por lo que es posible que se trate de un antígeno exclusivamente reconocido por población mexicana. También se reconocieron en menor porcentaje proteínas de bajo peso molecular de 24 y 14 KDa; la primera es igual en peso molecular al antígeno *Der pI*, clasificado dentro del grupo I de los alérgenos dominantes del ácaro; la segunda tienen el mismo peso molecular que el antígeno *Der pII* ubicado dentro del grupo II (Platts, 1995). Para el caso de los pacientes

alérgicos a *D. pteronyssinus* la sensibilidad no sólo se evaluó por PCI, sino que además se les realizó un Reto Nasal con lo que se corroboró que el paciente era alérgico al ácaro. Lo anterior nos explica el porcentaje de reconocimiento que se obtuvo *D. pteronyssinus* en IET, además coincide con lo reportado por la literatura en donde se menciona que una gran cantidad (60 al 90%) de pacientes son sensibles hacia este alérgeno, tanto en México como en otros países.

No existen reportes que nos indiquen cuales son los alérgenos inmunodominantes presentes en *F. americana* y *H. annuus*. Sin embargo, existen estudios sobre otros polenes de arboles, arbustos, flores, etc. en donde podemos observar que las proteínas de estos alérgenos se encuentran dentro de un rango de peso molecular de 10 a 70 KDa (Pastorello, 1994, DiFelice, 1994, Leduc-Brodard, 1996). Las proteínas del fresno y del girasol reconocidas por los sueros de los pacientes atópicos de este estudio, se ubicaron dentro del rango de peso molecular mencionado. El que los valores de κ obtenidos para polenes hayan sido inferiores en comparación con el del ácaro, se debió principalmente a que el porcentaje de pacientes que son sensibles hacia polenes es menor (30%) en comparación con el ácaro (80%). Otra explicación es que aún cuando los pacientes estaban sensibilizados hacia los polenes estudiados y presentaron reactividad cutánea, no se puede descartar la posibilidad de que los pacientes hayan reaccionado hacia otro tipo de componentes en los extractos utilizados que por sí solos pueden actuar como irritantes en este tipo de pacientes hipersensibles. Además, este estudio se realizó en el periodo comprendido entre Septiembre y Diciembre de 1996 y la época de polinización en México del fresno es en Mayo y principios Junio, y para el girasol es en Julio y Agosto (Orozco, 1992), por lo cual la toma de muestra pudo influir en que los pacientes tuvieran poca exposición al alérgeno y por lo tanto niveles bajos de acs circulantes al momento de realizar el estudio.

En el presente estudio se analizó la respuesta inmune humoral generada contra alérgenos a nivel de IgGs en pacientes atópicos. El reconocimiento de polipéptidos obtenido con anti-IgGs, es posible que se trate del isotipo IgG₄, pero no se puede descartar

la posibilidad de que el reconocimiento haya sido por el isotipo IgG₁, ya que este isotipo de IgG es el más abundante en el suero, por lo que sería importante utilizar en estudios posteriores un conjugado específico para IgG₄. Por otro lado también se pretendió evaluar la respuesta a nivel de IgE, sin embargo aún cuando se utilizaron una gran variedad de condiciones y tres conjugados anti-IgE de diferentes proveedores, no fué posible el reconocimiento específico de acs IgE contra proteínas de alergenios por medio de reacciones coloridas. Los conjugados mostraron un alto grado de inespecificidad ya que los mismos polipéptidos en sueros positivos, sueros negativos y blancos (sin suero), fueron observados indicando que se estaban uniendo directamente a las proteínas fijadas a la membrana. El uso de condiciones astringentes permitió eliminar algunas de las bandas, pero el sistema de detección continuo siendo inespecífico. Un factor importante que pudo haber afectado el revelado de acs IgE por este tipo de reacciones son los niveles extremadamente bajos en el suero (1µg/ml) (Abbas, 1994), aún cuando este tipo de pacientes tiene elevadas concentraciones de acs IgE-alergeno específicos, es posible que los receptores de alta afinidad para la IgE ubicados la superficie de células cebadas, provoquen que ésta inmunoglobulina al ser sintetizada sea rápidamente atrapada en la superficie celular, dando como resultado que los niveles en circulación disminuyan considerablemente, y por lo tanto que se necesite de un método altamente sensible para detectarla.

Debido a que no fué posible reconocer acs del tipo IgE por medio de reacciones coloridas, se tomó la decisión de utilizar quimioluminiscencia, un método más sensible (Huang, 1997), para reconocer acs IgE a bajos niveles de concentración. Los resultados obtenidos con ésta metodología no son representativos ya que sólo se utilizó una parte de los sueros (8), por lo que resulta necesario continuar con la estandarización de las condiciones para realizar ensayos de IET para IgE en los sueros de pacientes atópicos. Dicho modelo de quimioluminiscencia se propone como una alternativa a seguir para el reconocimiento de proteínas alérgicas para estudios posteriores.

La respuesta inmune depende de varios factores, entre los que tenemos las características propias del antígeno, la vía de inmunización, la dosis, tiempo de exposición, susceptibilidad y características genéticas del individuo, estas últimas determinarán en el contexto de MHC II la respuesta que se genere contra el alérgeno. En base a esto es importante señalar que los grupos de alérgenos reportados han sido descritos en base a estudios de pruebas cutáneas, RAST, IET, etc. en poblaciones estadounidenses y canadienses con características genéticas diferentes a la población mexicana, de ahí que algunas proteínas de bajo peso molecular (≤ 25), reconocidas por estas poblaciones no sean las mismas que se están reconociendo en nuestra población, en donde hemos encontrado que se reconocen proteínas a nivel de IgGs con pesos moleculares más altos (≥ 25).

En el presente estudio no sólo se reconocieron algunas de las proteínas antigénicas presentes en extractos comerciales de alérgenos sino que además se cumplió con los puntos 1 y 2 de los sistemas de estandarización de alérgenos propuestos por la Academia Americana de Alergia, la cual propone un sistema de estandarización basado en: 1) Patrones de actividad biológica, mediante titulación con pruebas cutáneas, 2) Patrones cuantitativos y cualitativos, que aseguren la presencia de alérgenos mayores y menores en el extracto, mediante técnicas moleculares (PAGE-SDS, IET, RAST). 3) Patrones de potencia mediante técnicas de inhibición de IgE, que permitan conservar la misma potencia alérgica interlote.

En conjunto los resultados obtenidos nos revelan la necesidad de utilizar extractos alérgicos estandarizados para las pruebas cutáneas, que contengan todos o algunos de los alérgenos inmunodominantes presentes en el material nativo, así como una inmunogenicidad consistente y constante que permita realizar comparaciones de los resultados obtenidos en diferentes pacientes o en el mismo paciente a través del tiempo. Esto último resulta importante para lograr un diagnóstico confiable para el paciente, además de un conocimiento más amplio de las proteínas inmunodominantes de ácaros y polenes reconocidas por pacientes atópicos mexicanos.

9. CONCLUSIONES

-Los pacientes atópicos mexicanos reconocieron proteínas de 83 (75%), 74 (75%), 44 (15%), 14 (10%) y 29 (5%) KDa de *D. pteronyssinus* a nivel de IgGs totales.

-Los pacientes atópicos mexicanos reconocieron proteínas de 57 (25%), 42 (15%) y 14 (5%) KDa para *F. americana* a nivel de IgGs totales.

-Los pacientes atópicos mexicanos reconocieron proteínas de 27 (20 %), 36 (10%) y 14 (5%) KDa para *H. annus* a nivel de IgGs totales.

-Aunque la respuesta de anticuerpos contra proteínas alergénicas es del isotipo IgE, se encontró un alto nivel de respuesta en sueros de pacientes alérgicos a nivel de IgGs totales contra antígenos de extractos de *D. pteronyssinus*, *F. americana* y *H. annus*.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abba Terr I.A. The Atopic Diseases. In: Stites P.D., Terr I.A., Parslow G.T. Basic & Clinical -Immunology, 8 ed. Lange Medical Book Publications U.S.A., 1994; 327-345.
- Abba Terr I.A. Mechanisms of Hypersensitivity. In: Stites P.D., Terr I.A., Parslow G.T. Basic & Clinical Immunology, 8 ed. Lange Medical Book Publications U.S.A., 1994; 314-326.
- Abbas K. A., Lichtman H.A., Pober S.J. 1994 Cellular and Molecular Immunology WB. Saunders Company. United States of America.
- Angus Thomson 1991 The Cytokine Handbook. Academic Press San Diego USA.
- Arreguín O.L, Meza M.A, Ortiz A.I. Pruebas cutáneas en alergia. *Rev Aler Méx* 1995; Marzo-Abril Vol. XLII, 2: 20-23.
- Balderrama C. J. L. 1990 Alergia a la cucaracha en la Ciudad de México. IMSS Hospital de Especialidades. Centro Médico la Raza. Tesis de Posgrado. Especialista en Inmunología y Alergia clínica. UNAM Facultad de Medicina.
- Barnes J.P. Frontiers in medicine. New aspects of asthma *J Internal Med* 1992; 231:453-461.
- Batteiger, Byron, Newhall V Wilbert J, Jones B. Robert. The Use of Tween 20 as a Blocking Agent in the Immunological Detection of Proteins Transferred to Nitrocellulose Membranes. *J Immunol Methods* 1982; 55: 297-307.
- Beasley R, Roche R. W, Roberts A, Holgate T. S. Cellular Events in the Bronchi in Mild Asthma and after Bronchial Provocation *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 806-817.
- Boulet PL, Cartier A, Thomson CN, Roberts SR. Dolovich Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71:399-406.
- Bush K.R. Aerobiology of pollen and fungal allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 1120-1124.
- Canonica G.W, Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Bagnasco M. Adhesion molecules of allergic inflammation: recent insights into their functional roles. *Allergy* 1994; 49: 135-141.
- Canseco R. R. 1991 Asma bronquial experiencia clínica en la Unidad de Pediatría del Hospital General de México de la S. S. A. Tesis de Posgrado. Especialista en Pediatría. UNAM Facultad de Medicina.
- Cardona M. R. M. 1990 Correlación entre pruebas cutáneas, IgE total e IgE específica en alergia a *Dermatophagoides*. IMSS Hospital Especialidades Centro Medico Nacional. Tesis de Postgrado. Especialista en Inmunología y Alergia. UNAM Facultad de Medicina.

- Castrejon T. M. 1991 Valoración alérgica de los polenes de: *Alnus*, *Cupresus* y *Eucalipto*. Hospital Regional 20 de Noviembre I.S.S.S.T.E.. Tesis de Posgrado. Especialista en Inmunología y Alergia. UNAM Facultad de Medicina.
- Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, Lachmann PJ eds. *Clinical aspects of immunology*, 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975; 761-781.
- Corles M.M. 1988 Evaluación clínica de la efectividad de la inmunoterapia en pacientes alérgicos. Tesis de Posgrado. Especialista en Pediatría. UNAM Facultad de Medicina.
- Corrigan C. J. Elevated interleukin-4 secretion by T lymphocytes: a feature of atopy or of asthma? *Clin Exp Allergy* 1995; 25:485-487.
- Crimi E, Chiaramondia M, Milanese M, Rossi A. G, Brusasco V. Increased Numbers of Mast Cells in Bronchial Mucosa after Late-Phase Asthmatic Response to Allergen. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144; 1282-1286.
- Champan MD, Platts-Mills TAE: Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol* 1980; 125: 587.
- Church M.M., Lai C., Beasley R., Featherstone I.R., Holgate T.S. The mediator and cellular basis of the allergic response. *Allergy* 1988; 43: (suppl.8) 26-29.
- DC Protein Assay Instruction Manual BIO-RAD, 1996.
- Dawson S.B., Trapp G.R. Bioestadística Médica. Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. 1990.
- Deborg S. Methods for skin testing. *Allergy* 1989; 44 (Suppl 10): 22-30.
- Del Río N.B.E, Mercado O.V, Lerma O.L, Montejo B.M, Gazca A.A, Luis Sienna M.J.J. Comparación de dos métodos de pruebas cutáneas para el diagnóstico de enfermedades alérgicas. *Rev Aler Méx* 1996; Julio-Agosto Vol. XLIII, 4: 100-103.
- Di Felice. G., Filomena MC, Briletto G., Afferni C., Di Paola R., Mari A., Palumbo s., Tnghino R., Sallusto F., Tursi A., Macchia L., Pini C. Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizona*) pollen: Characterization of the pollen extract and identification of the allergenic componentes. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 547-555.
- Espinosa M.S.M, Bolaños A.J.C., Miranda F.A.J. Estudio de hipersensibilidad cutánea: intradérmica a extractos alérgicos y su relación con el lugar de residencia. *Rev Aler Méx* 1992; Noviembre-Diciembre Vol. XXXIX, 6: 115-119.
- Figueroa P. C. L. 1980 Características de los niños asmáticos de la población del Hospital de Hacienda y Crédito Público. Tesis de Postgrado. Especialista en Pediatría. UNAM Facultad de Medicina.

- Gauci M, Stone B.F, Thong Y.H. An immunoblot technique for identification of allergens of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus*. *J Immunol Methods* 1990; 126: 51-55.
- Galli J.S. New concepts about the mast cell *N Engl J Med* 1993; 28: 257-265.
- Gibson G. P, Manning J. P, O'Byrne M. P, Gabardo G. A, Dolovich J, Denburg A. J, Hargreave E. F. Allergen-induced Asthmatic Responses. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 331-335.
- Hefle Susan L, Helm Ricki M, Burks Wesley A, Bush Robert K. Comparison of commercial peanut skin test extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 837-42.
- Herian Anne M. and Taylor Steve L. Non-specific binding of anti-human IgE peroxidase-linked conjugates to legume proteins in immunoblots. *J Immunol Methods* 1991; 140: 53-158.
- Hernández H.E. 1987 Crisis asmática (salbutamol vs. adrenalina) Tesis de Posgrado. Especialista en Pediatría UNAM Facultad de Medicina.
- Juan P.A, Prieto U.L, García C.R, Huerta L.J. Comparación de la respuesta cutánea a *Dermatophagoides farinae* de dos laboratorios distintos. *Rev Aler Méx* 1990; Julio-Agosto Vol. XXXVII, 4: 137-139.
- Huang D., Amero A.S. Measurement of Antigen by Enhanced Chemiluminescent Western blot. *Biotechniques* 22:454-458 (March 1997).
- Karlsson-Borga A. and Rolfsen W. Methodological considerations when using nitrocellulose immunoblotting from polyacrylamide gels to study the mould allergens *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria alternata*. *J Immunol Methods* 1991; 136; 91-102.
- Kjell Aas Clinical and Experimental Aspects of Standardization and Purification of Allergen. *Int Archs Allergy appl Immunol* 1975; 49: 44-54.
- Kips C.J, Tavernier H. J, Joos F. G, Peleman A. R, Pauwels A. R. The potential role of tumour necrosis factor α in asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 247-250.
- Kobayashi I., Sakiyama YI, Tame A., Kobayashi K., Matsumoto S. IgE and IgG4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of *Dermatophagoides teronyssinus* group II antigen (Derp p 2). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 638-45.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Lake FR, Ward LD, Simpson RJ, Tompson PJ, Stewart G.A. House dust mite-derived amylase: allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 1035-42.

- Lind P. Purification and partial characterization of two major allergens from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:753-761.
- Lowry OH, Rosebrough NS, Fair AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Marshall S.J., Bienenstock J. Mast Cells. *Springer Semin Immunopathol* 1990; 12: 191-202.
- Mc Fadden R.E., Gilbert A.I. Asthma . *New Eng J Medicine* 1992; 327: 1928-1938.
- Mendez C. J. E. 1989 Asma bronquial en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Tesis de Posgrado. Especialista en Pediatría. UNAM Facultad de Medicina.
- Middleton E. Allergy Principles and Practice Volume I and II Fourth edition. Mosby USA. 1993.
- Miribel L., Arnaud P. Electrotransfer of proteins following polyacrylamide gel electrophoresis. Nitrocellulose versus nylon membranes. *J Immunol Methods*. 1988;107: 253-259.
- Mosmann T. R, Coffman R.L. Th1 and Th2 cells; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
- Musmand Jonathan J, Horner W. Elliott , Lopez Manuel, Lehrer Samuel B. Identification of important allergens in German cockroach extracts by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 877-85.
- Obispo T. M., Melero J. A, Capizo J. A, Carreira J, Lombardero M. The main allergen of *Olea europaea* (*Ole e 1*) is also present in other species of the oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 311-316.
- Ohashi Y, Motojima S, Fukuda T, Makino S. Airway Hyperresponsiveness, Increased Intracellular Spaces of Bronchial Epithelium, and Increased Infiltration of Eosinophils and Lymphocytes in Bronchial Mucosa in Asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1469-1476.
- Pastorello A.E., Ortolane C., Farioli L., Pravettoni V., Spano M, et. al. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: An in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 699-707.
- Paul E.W. Fundamental Immunology, 3 ed., Raven Press, Ltd., New York 1993;1399-1425.
- Platts-Mills TAE, de Weck AL. Dust mite allergens and asthma-a worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 416-427.
- Platts-Mills TAE, Thomas WR, Albersen RC. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1046-1060.

- Platts Mills TAE, William R. Solomon Aerobiology and inhalant allergens. In: Middleton E. Allergy Principles and Practice Volume I and II, fourth ed. Mosby USA. 1993; 469-525.
- Plaut M, Zimmerman M.E. Allergy and Mechanisms of Hypersensitivity. In: Paul E.W. Fundamental Immunology, 3 ed., Raven Press, Ltd., New York 1993;1399-1425.
- Quan S. Allergy. In: Gosling P. J., Basso L. C. Immunoassay Laboratory Analysis and Clinical Application. United States of America 1994; 249-257.
- Ramírez F.W, Pérez O.A. Estandarización y caracterización de los extractos alérgicos. *Rev Aler Méx* 1988; Septiembre-Octubre Vol. XXXV, 4: 93-97.
- Reed. R.C, Yunginger W. J. Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J Allergy Clin Immunol* July 1989; 84(1): 4-8.
- Ricci M. IL-4: a key cytokine in atopy *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 811-812.
- Roitt M. I. 1994 Essential Immunology Blackwell Scientific Publications Australia.
- Romagnani S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy *Curr Opinion Immunol* 1994; 6:838-846
- Scopes R. Protein Purification Principles and Practice Springer. 3 ed. Verlag New York USA 1985.
- Sears Mr. Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, *et. al.* The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite, and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:419-424.
- Smiths, L.D., deShazo D.R. Allergy and Immunology. *JAMA* 1994; 271(No.21)Junio1: 1653-1654.
- Stott D. I. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods*. 1989; 119: 153-187.
- Sutton R, Wrigley C.W, Baldo B. A. Detection of IgE and IgG Binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels. *J Immunol Methods*. 1982; 52: 183-194.
- Tinkelman G.D., Naspitz K.C. 1993 Childhood Asthma Pathophysiology and Treatment. Marcel Dekker Inc. New York United States of America 2 ed.
- Tovey ER, Johnson MC, Roche AL, Gobon GS, Baldo BA. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J Exp Med* 1989;170:1457-62.
- Turner W.M. 1981 Inmunología del Pulmón Ed. Manual Moderno México.
- Towbin H. and Gordon J. Immunoblotting and Dot Immunobinding-Current Status and Outlook. Review Article. *J Immunol Methods* 1984; 314-340.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Precedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci* 1979; 76: 4350-4354.

- Uranga F.G, Hernández C.L, Gómez M.R, Hernández G.F. Rinitis alérgica. Revisión. *Rev Aler Méx* 1994; Enero-Febrero Vol. XLI, 1: 25-28.
- Virchow C.J., Walker C., Hafner D., Kortisik C., Werner P., Matthys H., Kroegel C. T cells and Cytokines in Bronchoalveolar Lavage Fluid after Segmental Allergen Provocation in Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:960-968.
- Voorhorst R, Soieksma FTHM, Varekam H. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen. *J Allergy* 1967, 39: 325-339.
- Wakida G, Huerta J, Muñoz V, Garza R, Pedroza A, Limón A. Frecuencia de alérgenos en las respuestas alérgicas cutáneas tipo inmediata, tardía y dual en el Instituto Nacional de Pediatría. *Rev Aler Méx* 1995; Julio-Agosto Vol. XLII, 4: 69-73.
- Walsh A. J, Wrigley C. W, Baldo B. A. Simultaneous Detection for IgE Binding to Several Allergens Using a Nitrocellulose "Polydisc". *J Immunol Methods*. 1984; 66: 99-102.

11. APENDICE

SOLUCIONES

1.- Trisma base 2M pH 6.8 y 8.8

242.2 g - 1000 ml de agua

El pH se ajusta con HCl concentrado.

2.- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 20%

20 g - 100 ml de agua

3.- Acrilamida - Bisacrilamida

Acrilamida - 30% - 30 g

Bisacrilamida - 0.8% - 800 g

Se disuelven en 100 ml de agua.

4.- Solución teñir geles

Azul de Coomasie - 0.1% - 500 mg

Metanol absoluto - 50% - 250 ml

Ac. acético glacial - 10% - 100 ml

El azul de Coomasie se disuelve en el metanol absoluto, después se adiciona el ácido acético glacial y se afora a 500 ml.

5.- Persulfato 10 %

50 mg - 500 μ l de agua

6.- Gel concentrador BGC 8X (100 ml)

Tris base 2M pH 6.8 - 50 ml

SDS 20% - 4 ml

Agua - 46 ml

7.- Gel espaciador BGC 5X (200 ml)

Tris base 2M pH 8.8 - 187.5 ml

SDS 20% - 5 ml

Agua - 7.5 ml

8.- Amortiguador de corrida pH 8.4 10X (1 lt)

Trisma base 30.2 g

Glicina 144.1 g

SDS 20% 50 ml (se agrega después de ajustar el pH)

9.- Solución para desteñir geles (1 lt)

	Alto metanol	Bajo metanol
Metanol absoluto	500 ml	150 ml
Ac. acético glacial	100 ml	100 ml
Se afora a 1000 ml		

10.- Amortiguador de corrida de muestra 2X vol/vol (10 ml)

Amortiguador de corrida 1X - 1.25 ml

Glicerol anhidro - 1 ml

2 mercapto etanol - 0.5 ml

SDS 10% - 1 ml

Azul de bromofenol 0.25 - 0.5 ml

Agua - 5.75 ml.

11.- Regulador de transferencia

Trisma base - 3.03 g

Glicina - 14.4 g

Metanol absoluto - 200 ml

Agua - 800 ml

El alcohol se adiciona al final para evitar que se precipiten las sales

12.- Amortiguador de fosfatos salino pH 7.4 10X (PBS 1X) (1 lt)

NaCl - 80 g

KH_2PO_4 - 2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 29 g

KCl - 2 g

Se ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado y se afora a un litro.

13.- Regulador de bloqueo 5%

Leche descremada - 5g

PBS 1X - 100 ml

14.- Amido negro 0.1%

Amido negro - 0.1 g
Isopropanol - 25 ml
Ac. acético glacial - 10 ml

15.- Sol. para desteñir papel de nitrocelulosa teñido con amido negro.

Metanol absoluto - 5 ml
Ac. acético glacial - 10 ml
Se afora a 100 ml

16.- Sol. para revelar con peroxidasa (para 12 tiras adicionando 500 μ l por tira)

Solución stock

4-cloro α naftol - 30 mg
Metanol absoluto - 10 ml

Solución stock - 1 ml

PBS 1X - 5 ml

H₂ O₂ - 2 ml

Se prepara al momento de utilizarse

17.- Sol. para revelar con fosfatasa alcalina

Amortiguador Tris pH 9.5

Trisma base - 12.1 g
MgCl₂ .6H₂ O - 0.233 g
Se afora a 1000 ml

NBT (nitro azul de tetrasolio cloruro)

Dimetilformamida - 1 ml

NBT - 30 mg

BCIP (5-bromo-4- cloro-3-indol fosfato de toluidina)

Dimetilformamida 1 ml

BCIP - 15 mg

En 10 ml de amortiguador se agregan 100 μ l de cada una de las soluciones de NBT y BCIP. Se prepara al momento de utilizarse y se aplican 500 μ l por tira.

18.- Sol. para revelar con quimioluminiscencia 1:5 (peroxidasa)

Sustrato quimioluminiscente (ECL Amersham) 1 - 50 μ l

Sustrato quimioluminiscente (ECL Amersham) 2 - 50 μ l

PBS 1X - 4 ml

Se prepara al momento de utilizarse y debe de estar protegida de la luz. Se aplican 100 μ l por tira

19.- Sol. de incubación para el primer anticuerpo

PBS 1X - 100 ml

Suero bovino 2.5% - 2.5 ml

20.- Sol. de lavado para las inmunodetecciones

PBS 1X - 100 ml

Tween 20 0.05% - 50 μ l

21.- Inhibidores de proteasas

PMSF (Fenil Metil Sulfonil Fluorido) 200 μ M

0.34 mg - 10 ml de isopropanol

Se utilizan 50 μ l por cada ml de antígeno

TLCK (N-p-Tosil-Lisina Clorometil Cetona) 1mg/ml

10 mg - 10 ml de HCl 1 μ M

EDTA (Etilendinitrotetracetato) 0.5 M

3.48 g - 10 ml de agua

TPCK ((L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona)

30 mg - 10 ml etanol