

166
rej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



IDENTIFICACION DE LOS PEPTIDOS DEL SITIO
DE LA INMUNOGLOBULINA E PROTEGIDO DE LA
IODINACION POR SU RECEPTOR CELULAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

SERAFIN RAMIREZ ZAMORA

MEXICO, D. F.

1988



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 está 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.

INDICE.

1	ABREVIATURAS	1
2	RESUMEN	5
3	INTRODUCCION	7
	3.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE	7
	3.2 ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS	9
	3.3 ASPECTOS HISTORICOS DE LAS REACCIONES ALERGICAS	16
	3.4 CLASIFICACION DE LAS REACCIONES ALERGICAS	22
	3.5 ASPECTOS HISTORICOS RECIENTES	34
	3.6 OBJETIVO	55
4	MATERIALES Y METODOS	56
	4.1 INMUNOGLOBULINA E (IgE)	56
	4.2 PREPARACION DEL ANTISUERO ANTI-IgE EN CONEJO Y PRECIPITACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS	57
	4.3 CELULAS BASOFILICAS LEUCEMICAS DE RATA	60
	4.4 PREPARACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD DE SEFAROSA DINITROFENIL-LISINA (DNP-lisina)	62
	4.5 PURIFICACION DE LA IgE UNIDA A SU RECEPTOR CELULAR	62
	4.6 IODINACION DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR	64
	4.7 SEPARACION DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR	65

4.8	DIGESTION DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR	66
4.9	ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS PEPTIDOS DE LA CADENA H DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR GENERADOS POR LA DIGESTION CON PROTEASAS	68
5	RESULTADOS Y DISCUSION	70
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	87
7	REFERENCIAS	89

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Diagrama de una molécula de una inmunoglobulina en la que se muestran las cadenas pesadas (H) y las cadenas ligeras (L)	10
Figura 2. Diagrama de una molécula de IgE en la que se aprecian los dominios constantes (C) y los dominios variables (V)	12
Figura 3. Diagrama donde se muestran los fragmentos obtenidos a partir de la digestión de una molécula de inmunoglobulina con papaina o con pepsina	13
Figura 4. Reacción de Tipo 1. Anafiláctica	25
Figura 5. Reacción de Tipo 2. Citotóxica	28
Figura 6. Reacción de Tipo 3. Complejo-Inmune	29
Figura 7. Reacción de Tipo 4. Inmune-Celular	31
Figura 8. Diagrama en el que se muestran las regiones Fab, F(ab') ₂ y Fc de una molécula de inmunoglobulina	33
Figura 9. Diagrama del receptor celular propuesto por Metzger y colaboradores (9)	39
Figura 10. Modelo de los mecanismos de liberación de histamina (HR+) por el anticuerpo antireceptor (anti-r) y por el	

anticuerpo anti-IgE, propuesto por Ishizaka e Ishizaka en 1978 (7)	44
Figura 11. Fragmentos de la región Fc épsilon sintetizados en <i>E. coli</i>	49
Figura 12. Doble inmuno difusión utilizada para comprobar la actividad de la IgG (anticuerpo) de conejo dirigida contra la IgE (antígeno) de rata	59
Figura 13. Cadenas pesadas (H) y ligeras de la IgE separadas por SDS-PAGE	71
Figura 14-A. Péptidos trípticos iodados de la cadena épsilon	72
Figura 14-B. Péptidos trípticos iodados de la cadena épsilon	73
Figura 15. Péptidos quimotrípticos iodados de la cadena épsilon	75
Figura 16. Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodados de la cadena épsilon digeridos con tripsina en ausencia de su receptor celular	77
Figura 17. Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodados de la cadena épsilon digeridos con tripsina en presencia de su receptor celular	78

Figura 18. Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodinados de la cadena ϵ digeridos con quimotripsina en ausencia de su receptor celular 79

Figura 19. Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodinados de la cadena ϵ digeridos con quimotripsina en presencia de su receptor celular 80

INDICE DE TABLAS.

TABLA 1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS 5 CLASES DE INMUNOGLOBULINAS QUE SE CONOCEN	15
TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS DIFERENTES REACCIONES ALERGICAS	23
TABLA 3. PROPIEDADES DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA LA IgE	40
TABLA 4. CPM PROMEDIO DE LOS PRINCIPALES PEPTIDOS IODINADOS DE LA CADENA EPSILON DIGERIDOS CON TRIPSINA (T) O CON QUIMOTRIPSINA (Q) EN AUSENCIA (I _g E) O EN PRESENCIA (R) DE SU RECEPTOR CELULAR	82

1 ABREVIATURAS.

- 1) H Cadenas pesadas.
- 2) L Cadenas ligeras.
- 3) (S-S) Enlace disulfuro.
- 4) C Dominio constante.
- 5) V Dominio variable.
- 6) Ig Inmunoglobulina, se conocen 5 clases de Igs designadas por las letras griegas α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) y μ (IgM) por el tipo de cadena H que presentan.
- 7) Fc Región de las Igs fácilmente cristalizable, que comprende los dominios 2-4 en el caso de la IgE e IgM, y los dominios 2-3 en el caso de la IgA, IgD e IgG.
- 8) Fab Región de las Igs que presenta el sitio de unión y/o reconocimiento para el antígeno. Está constituida por un dímero que contiene una cadena L, un dominio C y un dominio V de la cadena H unidos por enlaces (S-S).
- 9) (Fab')₂ .. Región de las Igs que presenta 2 sitios de unión y/o reconocimiento para el antígeno. Está constituida por 2 dímeros que contienen cada uno una cadena L, un dominio C y un dominio V de cada cadena H unidos entre si por enlaces (S-S).
- 10) SRS-A Sustancias de reactividad lenta de anafilaxis.

- 11) ECF-A Factor eosinófilo quimotáctico de anafilaxis.
- 12) PAF Factor de agregación de plaquetas.
- 13) P-K Reacción de Prausnitz-Küstner.
- 14) ^{125}I Iodo 125.
- 15) Anti-r ... Anticuerpos antireceptor.
- 16) C_e Dominios constantes de la cadena H épsilon (ϵ)
de la IgE.
- 17) F_c Región F_c de la IgE.
- 18) E. coli .. Escherichia coli.
- 19) cADN Acido desoxiribonucleico complementario.
- 20) APC Anafilaxis pasiva cutánea.
- 21) MARE-1 ... Anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra la
cadena épsilon de la IgE.
- 22) ^{125}I -IgE . IgE marcada radioactivamente con ^{125}I .
- 23) $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Sulfato de amonio.
- 24) SABS Solución amortiguadora de boratos salina.
- 25) CNBr Bromuro de cianógeno.
- 26) °C Grados centígrados.
- 27) M Concentración molar.
- 28) ml Mililitros.
- 29) μl Microlitros.
- 30) PBS Amortiguador de fosfatos salino.
- 31) NaOH Hidróxido de sodio.
- 32) D.I.D. ... Doble inmunodifusión.
- 33) MEM Medio mínimo esencial de Eagle.

- 34) CO_2 Bióxido de carbono.
- 35) cm^2 Centímetros cuadrados.
- 36) HCl Acido clorhídrico.
- 37) mg Miligramos.
- 38) DNP-lisina. Dinitrofenil-lisina.
- 39) NaHCO_3 ... Bicarbonato de sodio.
- 40) NaCl Cloruro de sodio.
- 41) Sefarosa 4B-CNBr. Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno.
- 42) HEPES N-2 hidroxietilpiperazina N-2 ácido etanosulfónico.
- 43) MEM-HEPES. Medio mínimo esencial de Eagle suplementado con N-2 hidroxietilpiperazina N-2 ácido etanosulfónico.
- 44) PO_4 Fosfatos.
- 45) mCi MiliCurie.
- 46) cpm Cuentas por minuto.
- 47) SDS Dodecil sulfato de sodio.
- 48) SDS-PAGE . Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.
- 49) $\text{NH}_4 \text{CO}_3$.. Carbonato de amonio.
- 50) V Volts.
- 51) mA Miliamperes.
- 52) W Watts.
- 53) cm Centímetros.

- 54) kDa kilo Daltons.
- 55) IgE IgE en ausencia del receptor celular.
- 56) IgE-R IgE en presencia del receptor celular.
- 57) Rf Valor obtenido al dividir la distancia recorrida por la muestra entre la distancia recorrida por el frente.
- 58) R-T IgE en presencia del receptor celular digerida con tripsina.
- 59) R-Q IgE en presencia del receptor celular digerida con quimotripsina.
- 60) IgE-T IgE en ausencia del receptor celular digerida con tripsina.
- 61) IgE-Q IgE en ausencia del receptor celular digerida con quimotripsina.

2 RESUMEN.

IDENTIFICACION DE LOS PEPTIDOS DEL SITIO DE LA INMUNOGLOBULINA E PROTEGIDO DE LA IODINACION POR SU RECEPTOR CELULAR.

La unión de la inmunoglobulina E (IgE) a células cebadas y a basófilos ocurre en receptores de la membrana celular.

En la etapa inicial de nuestro trabajo estamos tratando de caracterizar el sitio de la IgE con el cual interactúa el receptor por medio de técnicas de inmunoquímica.

Se iodizó IgE monoclonal de ratón en presencia (IgE-R) y ausencia (IgE) de receptor y se separaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida. En cada caso se cortaron las bandas correspondientes a la cadena pesada de la IgE-R y la IgE y se digirieron con tripsina (T) o quimotripsina (Q). Los péptidos resultantes se analizaron siguiendo la técnica de Pecoud y Conrad (36) modificada en nuestro laboratorio.

Al comparar los resultados obtenidos por autorradiografía, observamos que en la IgE-R tratada con T, disminuye el grado de iodinación de dos péptidos con respecto a los mismos péptidos en la IgE.

En la autorradiografía de la IgE-R tratada con Q disminuye la intensidad de dos péptidos con respecto a los mismos péptidos de la IgE.

Suponemos que los péptidos que disminuyen de intensidad

en las autorradiografías están protegidos de la iodación porque son los que interactúan con el receptor celular.

3 INTRODUCCION.

3.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE (1, 2, 3 y 4).

La vida de cada organismo está constantemente amenazada por otros organismos, siendo esta la naturaleza del mundo vivo. Para su defensa, cada especie ha desarrollado una variedad de mecanismos de protección, como por ejemplo, el camuflaje con colores, los venenos, los músculos fuertes para correr, etc.

Para defenderse de los microorganismos los vertebrados han desarrollado todo un sistema de reconocimiento y de reacción que colectivamente se conoce como el sistema inmune.

Las células responsables de la inmunidad en los organismos son los linfocitos que son parte de las células o glóbulos blancos de la sangre. Hay aproximadamente 2×10^{12} linfocitos en el cuerpo humano.

Los linfocitos se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales, las cuales dan origen a todos los tipos celulares sanguíneos. Estas células madre, durante la etapa fetal de los organismos, se localizan en el hígado y en la etapa adulta se encuentran en la médula ósea.

Se conocen dos tipos de linfocitos, los linfocitos B y los linfocitos T.

Esta clasificación se da por el tipo de órgano en el que se diferencian. Así, los linfocitos B son producidos en la médula ósea en el caso de los mamíferos y en la bolsa de Fabricio en el caso de las aves, en tanto que los linfocitos T maduran

en el timo. Los linfocitos B son los encargados del desarrollo de la respuesta inmune humoral, y los linfocitos T son los encargados de la respuesta inmune celular.

La respuesta inmune celular, involucra la producción de células especializadas que reaccionan con los antígenos.

La respuesta inmune humoral se origina cuando los linfocitos B son activados por un antígeno. Esta activación origina que los linfocitos proliferen y se transformen en células plasmáticas que inician la síntesis de las moléculas de anticuerpos específicos que circulan en el torrente sanguíneo y se unen a los antígenos que los inducen.

El reconocimiento y la unión de la molécula de anticuerpo con el antígeno facilitan que ciertas células fagocíticas, por ejemplo los macrófagos, ingieran y destruyan al antígeno y frecuentemente activan un sistema de proteínas de la sangre conocidas como "el sistema del complemento" que ayuda en la destrucción del antígeno.

El sistema inmune presenta dos propiedades fundamentales, la primera de ellas es la especificidad, que es su capacidad para distinguir entre lo propio y lo no propio. Cuando una macromolécula ajena penetra en el organismo, ésta actúa como un antígeno y estimula al sistema inmune exclusivamente contra ese antígeno.

La memoria inmunológica es la segunda propiedad del sistema inmune. Debido a ella, tiene lugar una respuesta inmune más rápida y más fuerte cuando el organismo es reexposto al

antígeno.

Esto se debe a un subconjunto de linfocitos estimulados por antígenos que circulan en la sangre y en la linfa por años y son llamados "células con memoria".

3.2 ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas compuestas de 82 a 96 % de polipéptidos y de 4 a 18 % de carbohidratos.

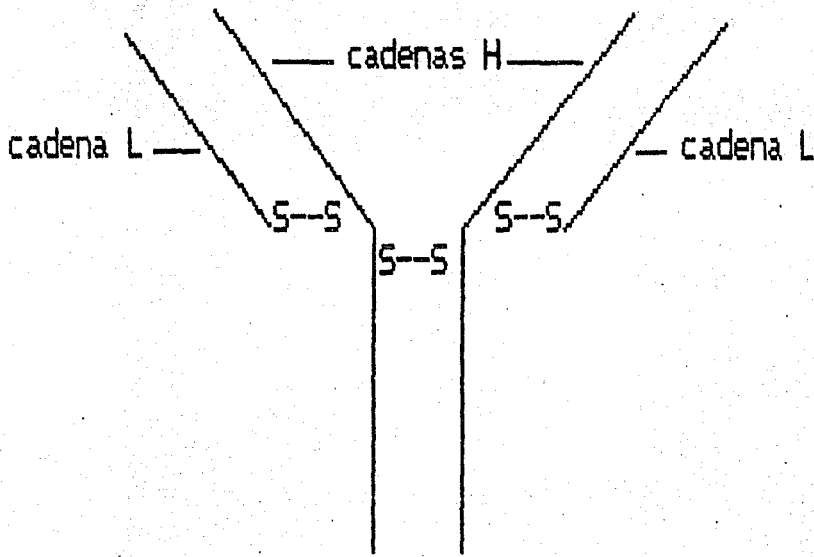
El componente polipeptídico posee todas las propiedades biológicas asociadas con las moléculas de anticuerpos.

Las inmunoglobulinas representan una de las clases más numerosas de las proteínas encontradas en la sangre, constituyen aproximadamente el 20 % de las proteínas totales del plasma. Se cree que hay aproximadamente 10^{12} moléculas de anticuerpos en el plasma, en los fluidos tisulares y en las secreciones.

Todas las moléculas de inmunoglobulinas están constituidas por dos cadenas pesadas (H) idénticas, cada una compuesta por aproximadamente 440 residuos de aminoácidos y por dos cadenas ligeras (L) también idénticas, cada una compuesta por aproximadamente 220 residuos de aminoácidos. Estas cuatro cadenas se mantienen unidas por medio de enlaces disulfuro (S-S) intercadena, como se aprecia en la figura 1.

Las moléculas de inmunoglobulina también presentan enlaces (S-S) intracadena, los que dividen a las cadenas en "dominios".

Cada dominio está constituido aproximadamente por 110



Sitio de unión a células cebadas o a basófilos

Figura 1. Diagrama de una molécula de inmunoglobulina en el que se muestran las cadenas pesadas (H) y las cadenas ligeras (L).

residuos de aminoácidos, como se aprecia en la figura 2.

Los dominios constantes (C) son aquéllos que presentan una secuencia de residuos de aminoácidos constante. Estos dominios conforman lo que se conoce como región Fc, llamada así porque es fácilmente cristizable, en tanto que los dominios variables (V) conforman la región variable; en estos dominios la secuencia de residuos de aminoácidos es variable, lo cual le confiere a esta región una gran plasticidad para reconocer y unir a la gran variedad de antígenos que existen. A un dímero que contiene una cadena L y un dominio C y otro V de la cadena H se le conoce como región Fab, porque en este fragmento está el sitio de unión para el antígeno.

Hay dos regiones Fab por cada molécula de inmunoglobulina, lo que le da un carácter bivalente, esto es, puede reaccionar con dos moléculas de antígeno a la vez.

Además, las moléculas de inmunoglobulina son susceptibles a los ataques proteolíticos; por ejemplo la degradación enzimática de una molécula de inmunoglobulina con papaina produce dos fragmentos Fab y un fragmento Fc, en tanto que la digestión con pepsina produce un fragmento F(ab)₂ y degrada la región Fc como se aprecia en la figura 3.

En los vertebrados superiores existen cinco clases diferentes de inmunoglobulinas que se conocen como Inmunoglobulina A (IgA), D (IgD), E (IgE), G (IgG) y M (IgM).

Cada clase de anticuerpo tiene una cadena H específica, siendo identificada cada una con la letra griega alfa (α), delta

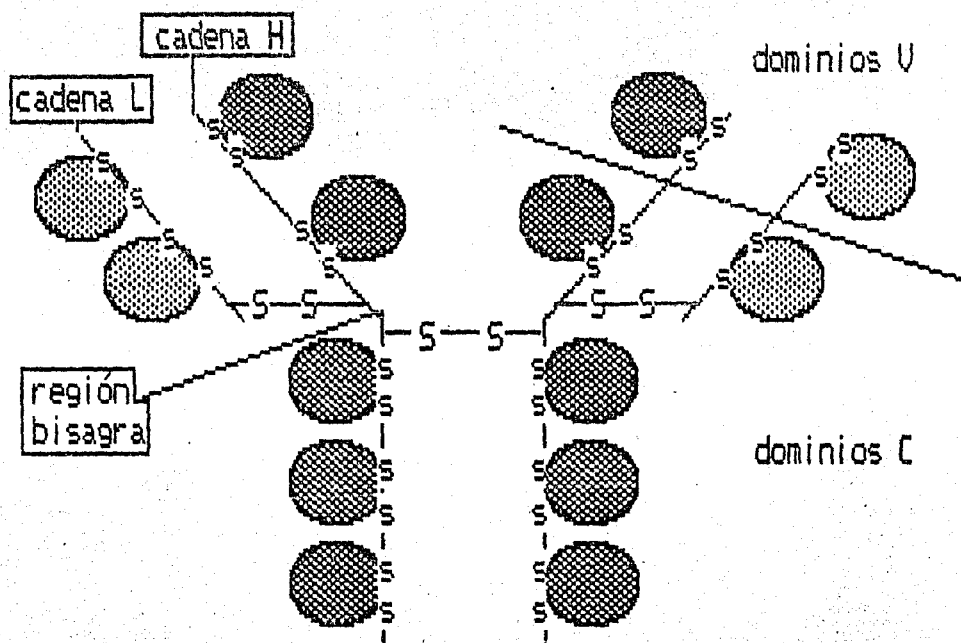


Figura 2. Diagrama de una molécula de IgE en la que se aprecian los dominios constantes (C) y variables (V).

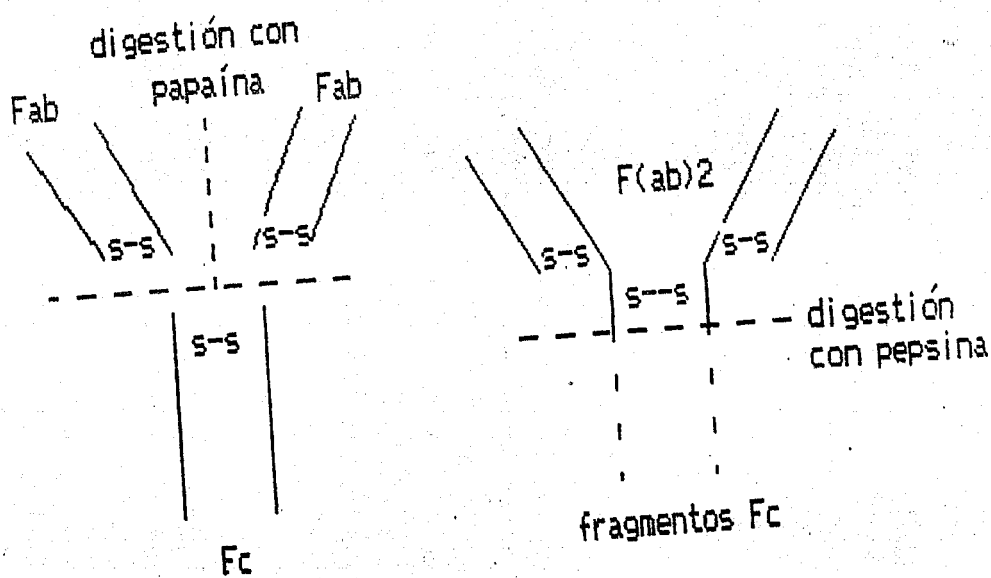


Figura 3. Diagrama donde se muestran los fragmentos obtenidos a partir de la digestión de una molécula de inmunoglobulina con papaína o con pepsina.

(δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ); así, la molécula de la IgA tiene su cadena H- α , la IgE tiene su cadena H- ϵ , y así sucesivamente.

Además de las cinco clases de cadena H, los vertebrados superiores tienen dos tipos de cadena L denominados por las letras griegas kappa (κ) o lambda (λ).

Las dos cadenas H de cualquiera de las diferentes clases de las inmunoglobulinas pueden asociarse con dos cadenas L del tipo κ o del tipo λ , pero no ocurre que tengan una cadena L del tipo κ y una del tipo λ .

En la tabla 1 se muestran las características más importantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

TABLE 1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS 5 CLASES DE
 INMUNOGLOBULINAS QUE SE CONOCEN.

PROPIEDADES	CLASE DE ANTICUERPO				
	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Clase de cadena H.	α	δ	ϵ	γ	μ
Clase de cadena L.	$K_0\lambda$	$K_0\lambda$	$K_0\lambda$	$K_0\lambda$	$K_0\lambda$
Fórmula molecular.	α_2L_2	δ_2L_2	ϵ_2L_2	γ_2L_2	$(\mu_2L_2)_2 J \ddagger$
	o $(\alpha_2L_2)CS\ddagger J \ddagger$				
Número de monómeros por cadena.	1,2	1	1	1	5
Coficiente de sedimentación.	6-7	7-8	8	6-7	19
Peso Molecular aproximado.	160 K §	180 K	190 K	150 K	900 K
Concentración en suero (mg/ml).	2	0.03	0.0003	12	1
Vida media en suero (días).	6	3	2	25	5
Paso a través de la placenta.	-	-	-	+	-
Activación del complemento.	-	-	-	++	+++
Actividad reagínica.	-	-	+	+	-
Unión a macrófagos.	-	-	-	+	-
Unión a células cebadas y/o basófilos.	-	-	+	-	-
Lisis bacteriana.	+	?	?	+	+
Actividad antiviral.	+++	?	?	+	+

‡ Para los monómeros de IgA en Suero.

§ Para la IgA secretoria.

† Componente secretorio.

‡ Cadena J.

K = 1,000 d

3.3 ASPECTOS HISTORICOS DE LAS REACCIONES ALERGICAS (4).

En 1819, John Bostock presentó a la Real Sociedad de Medicina de Londres su trabajo acerca de la "afección periódica de los ojos y pecho" a la que nombró Catarrus aestivus o "catarro de verano" y que también se conoció con el nombre de "fiebre del heno". Medio siglo después, Charles Blackley estableció en su libro Investigaciones experimentales sobre las causas y naturaleza del Catarrus aestivus (Londres. Bailliere y Tindall. 1873), que el polen tiene un papel importante en la producción de la fiebre del heno. Blackley se utilizó a si mismo como conejillo de Indias; tomó muestras de polen y lo frotó en un rasguño que se había producido en un brazo, ocasionando así un edema que media de 1.5 a 2.5 pulgadas. Con la ayuda de un microscopio óptico y empleando portaobjetos "pegajosos", él contó el polen en el aire y demostró que existía una correlación entre la cantidad de polen presente en el aire y sus síntomas.

Finalmente, él tomó muestras de polen con la ayuda de portaobjetos pegajosos unidos a una cometa y realizó un conteo aéreo a 500 m por encima del nivel del suelo. El resultado le explicó el por qué él padecía fiebre del heno en una gran ciudad.

Pero no solamente la fiebre del heno fue descrita durante el siglo XIX. En 1882 el Dr. Heinrich Quincke describió el angioedema (edema Quincke) y desde 1881 se tenían datos de la rinitis vasomotora. Aún cuando fué demostrado que estas

enfermedades y el asma bronquial pueden en algunos casos ser causadas por la exposición a sustancias extrañas no dañinas, los mecanismos por los que se producen los síntomas no fueron elucidados sino hasta principios del siglo XX.

En 1901, los científicos franceses Charles Richet y Paul Portier, a sugerencia del príncipe Alberto de Mónaco, estudiaron el efecto del veneno de la medusa de mar conocida como fragata portuguesa. Richet, por medio del método del rey Mithradates de Pontos (132 a 63 A.C.), trató de hacer inmunes a perros contra el veneno de la medusa. Uno de los animales experimentales fue un perro llamado "Neptuno", al cual 22 días después de la primera inyección, se le administró una segunda dosis aplicándose esta vez la décima parte de la dosis fatal. En el espacio de unos cuantos segundos el animal enfermó de gravedad y murió al cabo de 25 minutos.

Este resultado era opuesto a lo que Richet esperaba, él pensó que la resistencia natural contra la sustancia tóxica se había perdido. Como el fenómeno fué considerado lo opuesto a la profilaxis (protección), se denominó anafilaxis. Este término es ahora usado para la alergia inducida en animales y para severas reacciones alérgicas en el hombre.

Al año siguiente de los experimentos de Richet, Maurice Arthus demostró que las reacciones anafilácticas pueden ser provocadas por sustancias que no son tóxicas.

Para esto, Arthus inyectó suero de caballo en conejos sin causar ningún tipo de reacción la primera vez; cuando repitió

la inyección después de unas cuantas semanas, observó una fuerte reacción: el tejido se inflamó y en algunos casos se necrotizó. Esta reacción anafiláctica local se conoce como la reacción de Arthus.

En 1905 dos pediatras, el austriaco Clemens von Pirquet y el húngaro Bela Schick, reportaron que a niños a los que se les inyectó repetidamente suero de caballo con acción de antitoxina contra Streptococcus, en algunas ocasiones desarrollaron fiebre, hinchamiento de glándulas y urticaria. A este padecimiento se le denominó "enfermedad del suero".

En 1906 von Pirquet, en un artículo en la revista Münchener Medizinische Wochenschrift, propuso el término **alergia** en lugar del concepto reactividad cambiante. El usó las palabras griegas **Allos**, que significa diferente o cambiado y **Ergos** que significa trabajo o acción.

En 1923, los científicos americanos Robert A. Cooke y Arthur Fernandez Coca propusieron el término **atopia** para aquellas formas clínicas de alergia manifestadas por la fiebre del heno y el asma, en las cuales "los individuos como un grupo poseen una capacidad peculiar sensible a ciertas proteínas a las cuales frecuentemente están expuestos por su medio ambiente y sus hábitos de vida".

De este modo, una predisposición hereditaria para volverse sensible, es una característica distintiva de la atopia.

Posteriormente fue añadida otra característica, que es la presencia de reaginas.

En 1919, el Dr. Maximiliano Ramirez de Nueva York reportó un caso extraordinario de asma en el Journal of the American Medical Association. En su artículo, explicaba que fué consultado por un hombre que había tenido por primera vez un ataque de asma en un carruaje tirado por caballos en Central Park. El paciente había tenido una transfusión sanguínea por anemia y el Dr. Ramirez encontró que el donador de la sangre había sido una persona asmática, la cual fué examinada. Se demostró una reacción positiva en la piel causada por la caspa del caballo.

Esta fué la primera observación de que el asma podía estar mediada por un factor de la sangre.

Posteriormente en 1921, el Dr. Prausnitz confirmó que la alergia puede ser transferida por el suero de un individuo a otro, en su clásico experimento que hizo inmortales su nombre y el de su paciente alérgico.

Siendo el Dr. Küstner alérgico al pescado, el Dr. Prausnitz inyectó en su brazo suero del Dr. Küstner. Al día siguiente, el Dr. Prausnitz se inyectó extracto de pescado en el mismo sitio y por primera vez en su vida, observó una reacción positiva en su piel contra el pescado. Con base en esto, pensaron que el suero del Dr. Küstner contenía un factor que puede mediar una prueba positiva en la piel. El factor responsable para la reacción de Prausnitz-Küstner fué llamado "reagina" por A.F. Coca y R.A. Cooke.

Después de estos eventos, se encontró que las reaginas estaban asociadas con los anticuerpos, pero comparadas con los

anticuerpos contra microorganismos, el "anticuerpo reagínico" tenía algunas características distintivas. Primero, no podía ser demostrada su presencia en el suero por las reacciones de precipitación usuales. Segundo, era termolábil. Tercero, tenía una habilidad peculiar para fijarse a la piel por periodos prolongados y producir edemas y eritemas.

Una vez que fueron identificadas las diferentes clases de inmunoglobulinas, se intentó relacionar al anticuerpo reagínico con alguna de las clases como la IgG o la IgM pero sin éxito.

Por un tiempo se pensó que la IgA era el acarreador de la actividad reagínica, pero esta creencia fué refutada por la observación de alergias en pacientes con una deficiencia total de IgA.

Durante los años de 1950 y 1960 otros campos de la inmunología fueron rápidamente desarrollados, quedando la disciplina de la alergia relegada a un segundo plano.

La práctica establecida empíricamente de inyectar extractos de cojines de plumas, contenido de aspiradoras y caldo de carne dentro de la piel de pacientes asmáticos y con rinitis, no inspiraba mucho respeto en los demás colegas especialistas en alergias.

En 1967 la situación cambió dramáticamente gracias a los trabajos de los esposos Kimishige y Teruko Ishizaka, quienes trabajando en Denver, Colorado aislaron una fracción de suero rica en reaginas, de una persona con una alergia extrema para el pólen de la Ambrosía.

Por medio de la prueba de Prausnitz-Küstner, demostraron la presencia de reagentes en el suero, el cual fué usado para elaborar antisuero en conejos. Se añadieron IgG, IgM, IgA e IgD al antisuero para precipitar los anticuerpos anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA y anti-IgD.

Aunque el antisuero estaba "vacío", con respecto a las clases de inmunoglobulinas conocidas, podía producir una reacción de Prausnitz-Küstner positiva. La adición del suero original rico en reagentes produjo un pequeño precipitado y el sobrenadante obtenido quedó provisto de la actividad para sensibilizar la piel. Además, el precipitado unido al alérgeno de Ambrosia marcado con un isótopo radioactivo, indicaba que había actividad de anticuerpo.

De este modo Kimishige y Teruko Ishizaka aportaron evidencias de que los anticuerpos reagentes pertenecían a una clase de inmunoglobulina por descubrir y que ellos denominaron "gamma E globulina".

Al mismo tiempo que los Ishizaka pero independientemente de ellos, S.G.O. Johansson y Hans Bennich en Uppsala, Suecia, obtuvieron una proteína atípica a partir de un paciente con mieloma. Ellos establecieron que ésta era una inmunoglobulina diferente de la IgA, IgD, IgG e IgM. Como las iniciales del paciente eran N.D., la nueva inmunoglobulina fué llamada IgND.

Con un método extremadamente sensible de radioinmunoensayo ellos demostraron, en colaboración con L. Wide, la presencia de cantidades muy pequeñas de IgND en el suero normal. A partir de

esto, Johansson y Bennich demostraron que el suero de los pacientes alérgicos tenía altos niveles de IgND, y además, que pequeñas cantidades de IgND bloqueaba la reacción de Prausnitz-Küstner. Estas observaciones, junto con los hallazgos de las propiedades fisicoquímicas de la IgND, los llevaron a la conclusión de que las reáginas pertenecen a la clase IgND.

Cuando los dos grupos se encontraron en 1968, fué claro que habían estudiado la misma clase de inmunoglobulina, y estuvieron de acuerdo en llamarla inmunoglobulina E (IgE). Ahora está bien establecido que esta nueva clase de inmunoglobulina es el acarreador de las características biológicas de los anticuerpos reagínicos.

3.4 CLASIFICACION DE LAS REACCIONES ALERGICAS.

De acuerdo a Gell y Coombs, las reacciones alérgicas pueden ser clasificadas en cuatro tipos que son:

Reacción de Tipo 1. Anafiláctica.

Reacción de Tipo 2. Citotóxica.

Reacción de Tipo 3. Complejo-Immune.

Reacción de Tipo 4. Immune Celular.

La respuesta inmune se clasifica en humoral o en celular. Si los síntomas aparecen en minutos siguiendo una reacción inmune, ésta es llamada una reacción inmediata o reacción primaria. Si los síntomas empiezan después de horas se denomina reacción

tardía y si empiezan después de días es una reacción retardada.

En la tabla 2 se muestra una clasificación de las diferentes reacciones alérgicas:

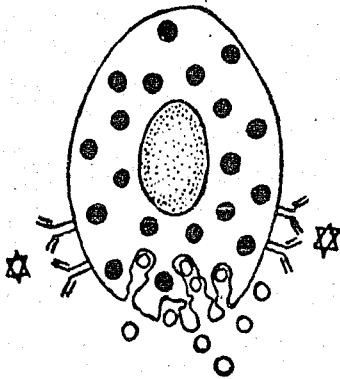
TABLA 2 CLASIFICACION DE LAS DIFERENTES REACCIONES ALERGICAS.

	}	Tipo 1	INMEDIATA
HUMORAL		Tipo 2	
		Tipo 3	TARDIA
CELULAR		Tipo 4	RETARDADA

Reacción de Tipo 1. Anafiláctica.

Esta es una reacción inmediata causada por anticuerpos reagínicos de la clase IgE (en algunos casos IgG). Los antígenos que provocan reacciones de tipo 1 son denominados "alergenos"; cuando el alergeno reacciona con la IgE unida a la superficie de células cebadas o de células basofílicas, las células se degranulan y liberan mediadores químicos como por ejemplo la histamina, sustancias de baja reactividad de anafilaxis (SRS-A), el factor eosinófilo quimotáctico de anafilaxis (ECF-A), el factor de agregación de plaquetas (PAF), que son responsables de los síntomas de enfermedades como son el estornudo, la tos, la comezón, la vasodilatación, la formación de edemas, la broncoconstricción, la hipersecreción, la rinitis, el asma, la

dermatitis atópica parcial, varios casos de choque anafiláctico, angioedema, urticaria, etc. (figura 4).



El alérgeno reacciona con la molécula de IgE unida a la membrana de la célula cebada.



La célula cebada se degranula y libera mediadores químicos (histamina, SRS-A, ECF-A, PAF).



Estornudo, tos, comezón, vasodilatación, edema, broncoconstricción, hipersecreción, etc.

Figura 4. Reacción de Tipo 1. Anafiláctica.

Reacción de Tipo 2. Citotóxica.

En esta reacción, el antígeno está localizado en la membrana celular, pudiendo ser una molécula sintetizada por la célula, o una molécula extraña unida a la célula. La membrana celular es dañada por la interacción entre el antígeno unido a la célula y el anticuerpo circulante de la clase IgG (o IgM). La activación del sistema del complemento resulta en la lisis de la célula.

La anemia hemolítica inducida por drogas y la agranulocitosis son ejemplos de reacciones de tipo 2 (figura 5).

Reacción de Tipo 3. Complejo-Inmune.

Se forman complejos entre el antígeno circulante y su anticuerpo específico, especialmente de la clase IgG.

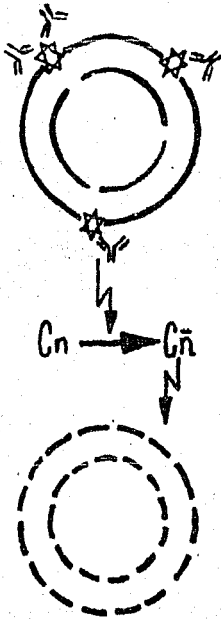
El sistema del complemento es activado, causando una infiltración local por neutrófilos, los cuales a su vez liberan enzimas que dañan tejidos (figura 6).

Los anticuerpos y los antígenos frecuentemente interactúan perivascularmente, ocasionando una vasculitis como en la enfermedad del suero. Una vasculitis necrótica inducida experimentalmente en la piel, se conoce como una reacción de Arthus.

La liberación de antígenos a partir del hongo Aspergillus fumigatus, que se encuentre creciendo en conductos de aire, puede provocar una reacción parecida a la de tipo 3, así como también

la inhalación de grandes cantidades de polvo orgánico lo que provoca una alveolitis alérgica extrínseca. Estas reacciones no cumplen todos los criterios de una reacción de tipo 3 y son por lo tanto conocidas como reacciones parecidas a tipo 3.

Las reacciones de tipo 3 en la piel y por medio de conductos de aire causan síntomas alrededor de 4 a 6 horas después de la exposición al antígeno, por lo que se conocen también como reacciones tardías.



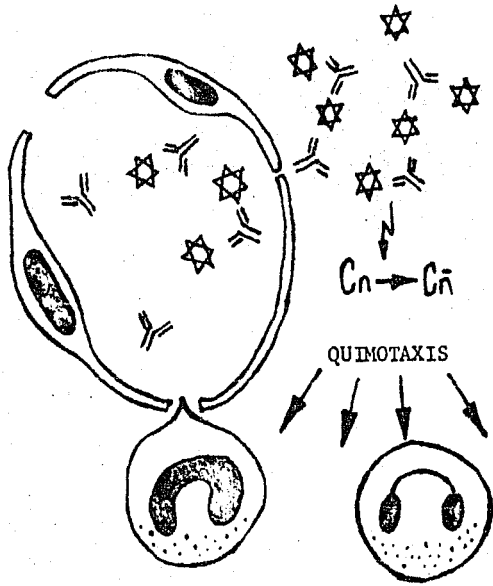
El antígeno en la membrana celular reacciona con un anticuerpo de IgG o de IgM circulante.

Activación del Sistema del Complemento.

Lisis de la célula (eritrocito).

Figura 5. Reacción de Tipo 2. Citotóxica.

Formación de complejos inmunes
entre el antígeno y el anticuerpo
IgG.



Activación del Sistema del Complemento.

Liberación de factores quimotácticos.

Neutrofilia local.

Liberación de enzimas lisosomales.

Daño de tejidos.

Figura 6. Reacción de Tipo 3. Complejo-Immune.

Reacción de Tipo 4. Inmune-Celular.

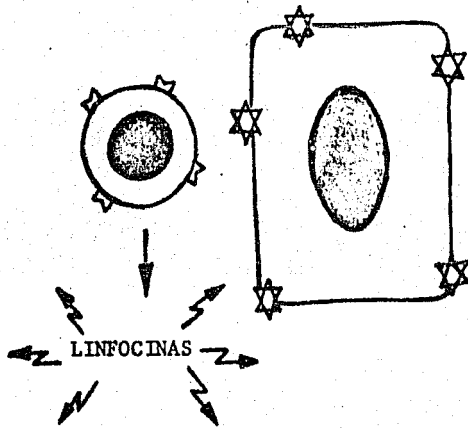
Esta es la clásica reacción retardada en la cual los síntomas aparecen después de 24 a 48 horas de la exposición al antígeno.

Los linfocitos T tienen estructuras similares a los anticuerpos en su membrana celular, los cuales son capaces de reconocer y de reaccionar con el antígeno. Cuando el antígeno es parte de una célula, la reacción inmune provoca la lisis de la célula. Los linfocitos T sensibilizados actúan también por la liberación de linfocinas, las cuales activan y movilizan a células no sensibilizadas para destruir al antígeno (figura 7).

Por sus efectos biológicos sobre otras células inflamatorias se han demostrado y caracterizado más de 20 linfocinas diferentes y algunas han sido también definidas químicamente.

En el edema de contacto alérgico, una sustancia no propia de bajo peso molecular, tal como el níquel, se une a una proteína propia en la piel. Un complejo de la sustancia de bajo peso molecular, el hapteno y la proteína acarreadora, es reconocido como no propio por el sistema inmune celular el cual es estimulado. Las células en la piel, que contienen al complejo hapteno-acarreador, son células blanco en una reacción de tipo 4, las cuales originan la inflamación y el edema.

El sistema inmune humoral también puede ser estimulado por un complejo hapteno-acarreador, como por ejemplo el formado entre



Un linfocito sensibilizado reacciona con un antígeno en una célula blanco.



La célula blanco es destruida por el linfocito "asesino" y por células activadas por linfocinas.

Figura 7. Reacción de Tipo 4. Inmune-Celular.

proteínas del suero y una droga o compuesto químico utilizado experimental o industrialmente.

Las manifestaciones producidas por la reacción anafiláctica de tipo 1, tienen una gran importancia clínica por la sintomatología que presentan aquellas personas que padecen de reacciones de hipersensibilidad del tipo 1 y que las lleva a situaciones bastante incómodas y molestas.

Es por esto que a principios de la década de 1970 en distintas partes del mundo se empezó a estudiar el mecanismo por el cual interactúan la molécula de IgE y su receptor celular.

Actualmente se han hecho varios avances, incluso a nivel molecular, de algunos de los mecanismos que se realizan durante la interacción de la IgE con su receptor celular, empleándose para este objetivo diferentes metodologías.

Antes de entrar a revisar estas metodologías es necesario conocer primeramente las regiones Fab, F(ab')₂ y Fc de la molécula de IgE. Estas regiones se ilustran en la figura 8.

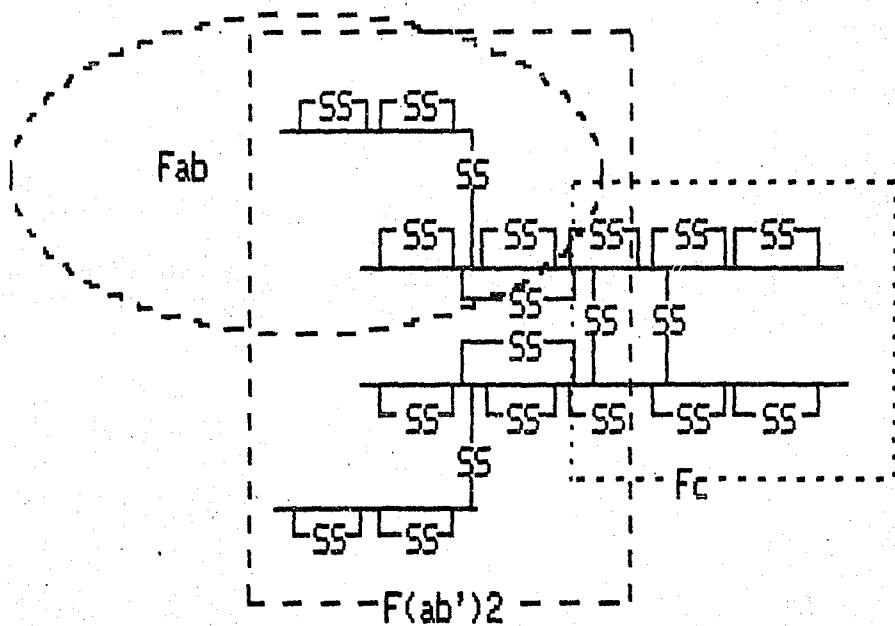


Figura 8. Diagrama en el que se muestran las regiones Fab, F(ab')₂ y Fc de una molécula de inmunoglobulina.

3.5 ASPECTOS HISTORICOS RECIENTES:

Stanworth y colaboradores (5) generaron fragmentos proteolíticos (Fab, F(ab')₂, Fc) a partir de la digestión de la molécula de IgE con papaina.

Los autores primeramente probaron la inhibición competitiva de la reacción de Prausnitz-Küstner (P-K) de los fragmentos obtenidos y encontraron que sólo el fragmento Fc tenía, al igual que la IgE intacta, la propiedad de inhibir la reacción de P-K en los sujetos experimentales.

En un segundo experimento, los autores inyectaron a los sujetos experimentales con los fragmentos obtenidos y con IgE intacta, 24 horas antes de realizar la prueba de P-K y encontraron nuevamente que el fragmento Fc inhibió la reacción.

En este caso los resultados de los autores indicaron que los fragmentos Fab y F(ab')₂ no tienen la capacidad de inhibir la reacción de P-K en tanto que el fragmento Fc sí la presenta y además que por medio de esta región se realiza la unión de la IgE con el receptor celular.

Ishizaka y colaboradores (6) también generaron fragmentos proteolíticos (Fab, F(ab')₂, Fc) por la digestión de la molécula de IgE con pepsina o con papaina.

Los autores probaron la actividad biológica de los fragmentos por medio de una sensibilización pasiva de la piel de monos, y encontraron que el fragmento Fc tenía la propiedad de inhibir la sensibilización, y que esta inhibición era comparable

a la de la IgE sin digerir.

Los autores también probaron la actividad biológica de los fragmentos que obtuvieron empleando para este caso la reacción de P-K en humanos, y también encontraron que el fragmento Fc inhibía la reacción casi al igual que la IgE sin digerir.

Estos resultados confirmaron los reportados por Stanworth y colaboradores (5) de que los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ no inhiben la reacción de P-K, en tanto que el fragmento Fc ^{Si} presenta esta propiedad.

Además, los autores japoneses estudiaron también el efecto que tiene la agregación de la IgE y de los fragmentos Fc sobre la liberación de histamina y de sustancias de reacción lenta de anafilaxis (SRS-A) en leucocitos. Observaron que cuando unían monómeros de IgE o de fragmentos Fc a los leucocitos, había una liberación muy pequeña de histamina y de SRS-A.

Por otro lado al unir agregados de IgE o de los fragmentos Fc, se producía un aumento en la liberación de histamina y de SRS-A por parte de los leucocitos.

Estos resultados sugieren que la liberación de los mediadores químicos por parte de los leucocitos durante las reacciones de hipersensibilidad de tipo I se realiza no por la formación del complejo IgE-receptor, sino por la agregación de los complejos antígeno-IgE-receptor.

Ishizaka e Ishizaka (7) han propuesto una hipótesis denominada por ellos como "hipótesis de puentes" para tratar de explicar los resultados anteriores.

Emplearon un anticuerpo anti-IgE así como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ de dicho anticuerpo y encontraron que el fragmento $F(ab')_2$ inducía la formación de un eritema en la piel de individuos sanos y de individuos atópicos, así como la liberación de histamina a partir de leucocitos humanos y de histamina y SRS-A de células cebadas a partir de tejidos pulmonares de mono.

Los autores observaron que cuantitativamente la habilidad de los fragmentos $F(ab')_2$ para inducir reacciones fué comparable con la habilidad del anticuerpo sin digerir.

Además los autores observaron que los fragmentos monoméricos monovalentes Fab no indujeron ningún tipo de reacción.

Otra evidencia que apoya la hipótesis de los puentes fué obtenida a partir de los estudios de los complejos antígeno-anticuerpo por parte de los mismos autores.

Ellos añadieron el antígeno de ambrosia en preparaciones de IgE, IgG o IgA y, una vez formados los complejos antígeno-anticuerpo, los inyectaron en la piel de individuos sanos y observaron que sólo los complejos IgE-antígeno indujeron eritemas en la piel de los sujetos.

El análisis de estos agregados moleculares demostró que los complejos formados por una molécula de IgE y dos moléculas de antígeno, no provocaron reacciones en la piel de los sujetos, en tanto que los complejos que contenían dos o más moléculas de IgE sí lo hacían. Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que las moléculas de IgE "acercadas" por el antígeno podían

interactuar unas con otras, y que la interacción IgE-IgE podía estar involucrada en la inducción de la actividad biológica.

La hipótesis fué apoyada por el hecho de que los agregados no específicos de IgE tenían la misma actividad que los complejos IgE-antígeno. La inyección intracutánea de la IgE agregada o de los fragmentos Fc agregados indujeron la formación de eritemas, y la incubación de estos agregados con leucocitos humanos provocó la liberación de histamina

Por otro lado, ni la IgE monomérica o los fragmentos Fc monoméricos, ni los fragmentos $F(ab')_2$ agregados indujeron tales reacciones.

Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que la interacción entre la región Fc de las moléculas de IgE podría estar involucrada en la activación de una secuencia de enzimas que provocaran la liberación de los mediadores químicos.

Actualmente se sabe que para que se lleve a cabo la liberación de los mediadores químicos por parte de las células cebadas y/o de basófilos, se requiere de la agregación de los complejos IgE-receptor, como lo demostró el trabajo de Fewtrell y Metzger (8) en el que los autores observaron que los dímeros de IgE fueron menos efectivos que los trímeros y oligómeros para activar la liberación de los mediadores químicos de células basofílicas leucémicas de rata.

En 1983 Metzger (9) y colaboradores presentaron un modelo para el receptor celular con alta afinidad por la IgE. El modelo

consiste de un tetrámero constituido por una cadena α , la cual contiene el sitio de unión para la IgE, una cadena β y dos cadenas idénticas γ unidas por un enlace (S-S) como se aprecia en la figura 9.

En la tabla 3 se muestran las propiedades de las subunidades del receptor celular para la IgE (Tomada de la referencia 12).

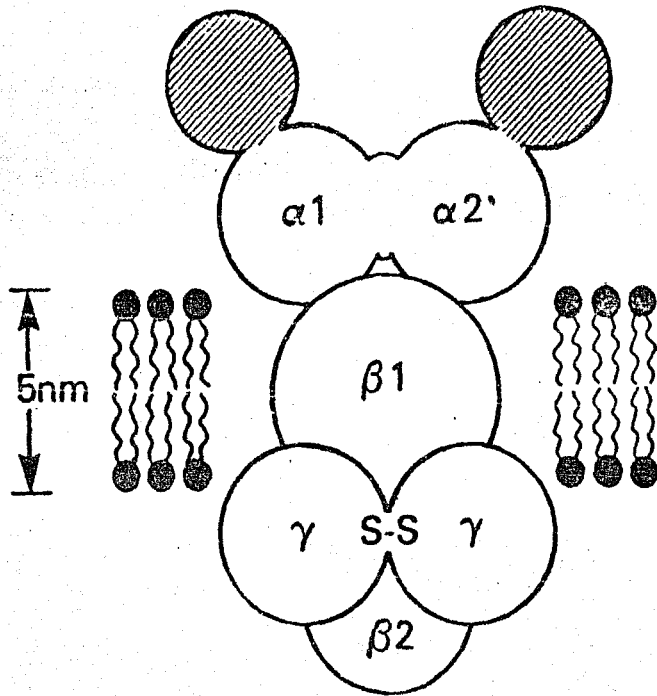


Figura 9. Modelo del receptor celular propuesto por Metzger y colaboradores (9), que consiste de una cadena α (45 kDa) que contiene el sitio de unión para la IgE, una cadena β (32 kDa) y dos cadenas idénticas γ (9 kDa) unidas por un enlace disulfuro (S-S).

TABLA 3 PROPIEDADES DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA LA IgE

PROPIEDADES	SUBUNIDAD		
	α	β	γ
Mol/mol de receptor	1	1	2
Peso molecular (kDa)	45	32	9
Propiedades de marcaje			
Extrínsecas			
Superficie			
Células intactas, Vesículas	+	-	-
Vesículas lisadas	-	+	+
Glucosamina	+	-	-
Fósforo	-	+	+
Acidos grasos	+	+	+
Composición			
Carbohidratos (peso %)	30	-	-
Aminoácidos (mol %)			
Básicos (Lis, Arg, His)	14.6	11.2	15.7
Acidos (Glu, Asp)	20.7	20.9	20.7
Hidrofílicos (Ser, Thr)	16.1	19.4	12.3
Hidrofóbicos (Val, Leu, Ile)	22.7	23.6	26.1
Aromáticos (Tir, Phe, Trp)	11.3	8.3	8.0
Otros			
Cis	2.36	2.05	1.92
Met	1.04	1.30	0.00
Gli, Ala, Pro	14.00	18.60	17.10

La estrategia general que han seguido los investigadores involucrados en el estudio de las reacciones de hipersensibilidad de tipo 1, es la de identificar y determinar el sitio en la IgE con el cual interactúa el receptor celular. El conocimiento preciso de esta región sería útil en la construcción de péptidos u otras moléculas que pudieran inhibir la unión de la IgE con el receptor celular, para evitar de esta manera que se lleven a cabo todas las manifestaciones clínicas de las reacciones de hipersensibilidad de tipo 1, que padecen aquellas personas que sufren de problemas de alergias.

Una de las estrategias para tratar de identificar las regiones en la IgE con las que se une el receptor celular es la de emplear anticuerpos monoclonales.

Baniyash y colaboradores (10 y 11) han descrito un anticuerpo monoclonal, el 51.3, que se une a la porción Fc de la IgE de ratón y que tiene algunas propiedades interesantes: el anticuerpo bloquea la unión de la IgE a células basofílicas leucémicas de rata pero solo parcialmente, de 55 a 60 % (10). Sin embargo, este anticuerpo reacciona con la IgE unida a las células, aunque con menor grado que la IgE que no está unida.

Cuando los fragmentos Fab del anticuerpo anti-IgE fueron preparados y la estequiometría de su unión probada, Baniyash y colaboradores (11) estimaron que se unen 3 moles de Fab por mol de IgE en solución y solo 2 moles por mol cuando la IgE está unida a la célula.

Metzger y colaboradores (12) sugieren que se puede tratar

de dos pares de epitopes, es decir, 4 sitios en la molécula de antígeno que estos anticuerpos reconocen.

Si los anticuerpos se unen a sitios de un lugar A primero, esto inhibe la unión de anticuerpos en un lugar B, pero no inhibe la unión de la IgE en la célula. Contrariamente, aquellas moléculas de IgE a las cuales se une el anticuerpo primero en el lugar B, son inhibidas para unirse al receptor celular y tienen una reducida capacidad para interactuar con los anticuerpos en el lugar A. Esto puede explicar la inhibición parcial de unión, un fenómeno basado en un evento estocástico, más que en la heterogeneidad de receptores, como Baniyash y colaboradores proponen (10).

La propuesta de Metzger y colaboradores puede también explicar el decremento en la unión de los anticuerpos a la IgE unida a la célula. Los sitios B antes mencionados, no están disponibles en la IgE unida a la célula, en tanto que el sitio A puede reaccionar con los anticuerpos.

Las diferencias en la radiactividad de la IgE libre y de la unida a las células y la aparente discrepancia en la observación de que el anticuerpo puede inhibir la unión, pero que puede reaccionar con la IgE unida a células, puede también ser explicada por cambios en la conformación de la IgE cuando está unida a las células.

Ishizaka e Ishizaka (7) propusieron que probablemente los puentes que forman las moléculas de IgE unidas al receptor celular por un antígeno divalente o por un anticuerpo anti-IgE,

permitan que se formen puentes entre las moléculas de los receptores y que esta interacción posiblemente induce la activación de enzimas asociadas con la membrana celular.

Si este fuera el caso, se podría esperar que hubiera una liberación de histamina por parte de las células sin que hubiera una participación de la IgE unida al receptor celular.

Para probar esta hipótesis los autores emplearon un anticuerpo anti-receptor (anti-r).

Un hallazgo importante fué que la unión de anti-r con el receptor se inhibía si la superficie de las células se saturaba con ^{125}I -IgE.

Los experimentos posteriores demostraron que los fragmentos $\text{F(ab}')_2$ de los anticuerpos anti-r inducían tanto reacciones en la piel de ratas normales, como la liberación de histamina en células cebadas, en tanto que los fragmentos monoméricos Fab no produjeron ninguna de estas reacciones. Los autores observaron que los fragmentos Fab inhibieron la unión de la ^{125}I -IgE con el receptor celular *in vitro*. Además, de que una inyección intracutánea del fragmento bloqueaba la sensibilización pasiva en la piel de ratas normales con IgE.

Estos resultados sugieren que la formación de puentes entre las moléculas de los receptores originados por la unión de anticuerpos anti-r divalentes provoca la liberación de histamina, pero que la unión de anticuerpos monovalentes no es suficiente para provocar la liberación de histamina (figura 10).

Los autores concluyen con base en los resultados obtenidos

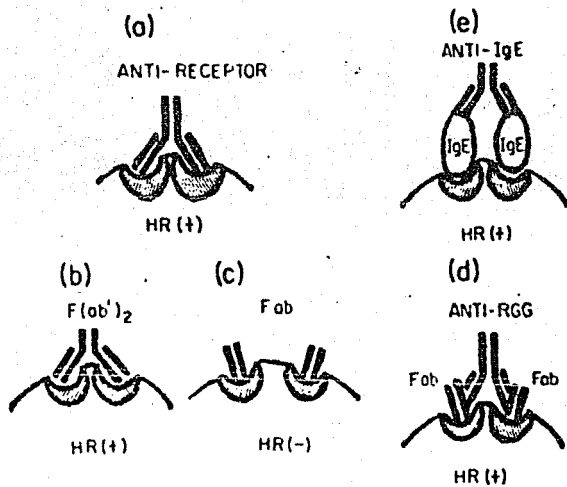


Figura 10. Modelo de los mecanismos de liberación de histamina (HR+), propuesto por Ishizaka e Ishizaka (7).

- (a) Liberación de histamina por el anticuerpo anti-receptor (anti-r).
- (b) Liberación de histamina por el fragmento F(ab')₂ de anti-r.
- (c) No liberación de histamina por los fragmentos Fab de anti-r.
- (d) Liberación de histamina por el anticuerpo anti-Fab de anti-r (ANTI-RGG).
- (e) Liberación de histamina por el anticuerpo anti-IgE.

con los anticuerpos anti-r, que la formación de puentes entre las moléculas de los receptores provoca la liberación de histamina por parte de las células sin la participación de la IgE, y que la formación de puentes entre las moléculas de los receptores, que equivale a la polimerización de la IgE, es responsable de la activación de enzimas asociadas con la membrana, las cuales a su vez, son las responsables de la liberación de histamina.

Un problema en esta línea de investigación ha sido la imposibilidad para obtener pequeños fragmentos de IgE que sean activos.

Hamburger (13) sintetizó un pentapéptido que tenía la capacidad para inhibir la unión de la IgE a células cebadas o a células basofílicas. Este pentapéptido corresponde a una secuencia en el dominio C_α2, el cual se a visto que no interviene en la unión de la IgE con el receptor celular (19 a 21).

También se han hecho intentos con los genes, en cuya secuencia se encuentra codificada la información de la región Fc, para tratar de determinar el sitio en la IgE que interactúa con el receptor celular. Kenten y colaboradores (14) y Liu y colaboradores (15), han introducido plásmidos en bacterias que llevan un inserto del ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) que codifica para la región Fc de la cadena épsilon humana. Estos produjeron fragmentos Fc sin glucosilar que se unieron a células cebadas humanas o a basófilos.

Los resultados anteriores confirmaron los datos de Kulczycki y colaboradores (16) de que los carbohidratos no contribuyen de manera importante en la unión de la IgE con su receptor.

El fragmento aislado por Liu y colaboradores (15) no tiene el tercio amino terminal de la región C₂, lo que sugiere que esta región no es necesaria.

Tanto el grupo de Kenten como el de Liu consideran que ahora puede ser posible hacer mutaciones sitio-específicas y estudiar su posible efecto sobre la unión de la IgE con su receptor celular. Tales mutaciones, sin embargo, pueden cambiar la sensibilidad debido a las condiciones desnaturalizantes usadas para preparar el material. Esto puede representar una dificultad para establecer si la pérdida de actividad se debe a estos efectos o si se debe a alteraciones en los sitios de unión.

Geha y colaboradores (17) también sintetizaron el fragmento C₂-4 en *E. coli* y observaron que este fragmento tiene la propiedad de inhibir la reacción de P-K, es decir, este fragmento compete efectivamente con la IgE del suero por el receptor celular.

Para corroborar sus resultados los autores compararon la duración de la inhibición de la reacción de P-K para el fragmento C₂-4 con respecto de la IgE del mieloma PS, y encontraron que a una concentración de 10^{-7} M, la duración en la inhibición fué de 12 y 14 días respectivamente, en tanto que a una concentración de 10^{-6} M fué de 17 y 21 días respectivamente lo que en ambos casos no es una diferencia significativa.

Otro dato interesante encontrado por los mismos autores es el hecho de que a una concentración molar en exceso de 200 veces molar del fragmento C₂₋₄ inhibe a la IgE del suero para unirse al receptor celular en un 90 % *in vivo*, en tanto que para una concentración molar de 100 veces en exceso del fragmento C₂₋₄ inhibe a la IgE (PS) en un 80 % *in vitro*. En estos términos, la capacidad del fragmento C₂₋₄ para inhibir la unión de la IgE al receptor celular tanto *in vivo* como *in vitro* es comparable.

Coleman y colaboradores (18) clonaron en *E. coli* el gen que codifica para la región Fc de la IgE correspondiente a los dominios C₂₋₄ y encontraron que el producto bacteriano inhibe la sensibilización antígeno específica de células cebadas humanas *in vitro*.

Los autores observaron que el fragmento Fc₂ tiene una capacidad inhibitoria del 50 % con respecto de la IgE nativa.

Ellos concluyen que el fragmento Fc₂ posee la función inhibitoria intacta, como lo demuestra su capacidad para bloquear la sensibilización de células cebadas humanas dependiente de la IgE.

Estos resultados complementan y amplían los reportados por Geha y colaboradores (17), demostrando que un fragmento Fc₂ sintetizado en *E. coli* inhibe la sensibilización pasiva de células cebadas *in vivo*.

Helm y colaboradores (19) sintetizaron pequeños fragmentos del gen que codifica para la cadena-ε en *E. coli* y probaron la

capacidad de cada uno para inhibir la sensibilización de células cebadas por anticuerpos de IgE in vivo y para inhibir la degranulación de basófilos con anticuerpos anti-IgE in vitro.

Los fragmentos obtenidos por los autores son los siguientes:

FRAGMENTO	SECUENCIA DE AMINOACIDOS	FORMACION DE DIMEROS (D) O MONOMEROS (M)
E2-4	(aa 218-547)	D
E2-3	(aa 219-439)	M
E4	(aa 440-547)	D
E2	(aa 218-336)	M
E3-4	(aa 340-547)	M/D
E2'-4	(aa 301-547)	M
E2'-3'	(aa 301-376)	M

(figura 11).

La inhibición de la reacción de anafilaxis pasiva cutánea (APC) en la piel de humanos, fué empleada por los autores para probar la actividad biológica de los péptidos generados en E. coli.

Los autores emplearon un suero que contenía IgE contra antígenos de ambrosía para sensibilizar sitios en la piel de un sujeto sano. 48 horas después inyectaron el antígeno en los sitios determinados en la piel del sujeto.

En los experimentos preliminares, una inyección previa con IgE o con los fragmentos E2-4, E2'-4, E2-3 o E2'-3' bloqueó

completamente la APC.

Los autores observaron que el fragmento E2'-3' tuvo un 30 % de efectividad con respecto de la IgE.

Los autores también midieron la duración del efecto del fragmento E2'-3' para inhibir la APC después de su inyección en la piel normal, y observaron que el efecto duró de 9 a 14 días.

El resultado fué favorable, ya que el efecto de la IgE fué de 14 y 19 días.

En este trabajo también se observó que el fragmento E2'-3' retiene la activación de las células blanco, que es una actividad característica de la IgE nativa.

Los autores concluyen que la secuencia Gln 301-Arg 376 (fragmento E2'-3') es suficiente para unirse con alta afinidad al receptor celular en células cebadas o basófilos, en tanto que las secuencias Gln 301-Val 336 (contenida en E2) y Leu 340-Arg 376 (contenida en E3-4) son inactivas.

Los autores también concluyen que los dímeros de la cadena-ε no son una condición necesaria para que haya unión con el receptor celular puesto que el fragmento E2'-3' fué un monómero durante todas las condiciones probadas.

Los resultados obtenidos por los autores sugieren que el sitio en la IgE que interactúa con el receptor celular se encuentra cerca o en la unión de los dominios C₂-C₃ porque los resultados demostraron que el fragmento E2'-3' (que corresponde a esta región, (ver figura 11) se une con alta afinidad al receptor celular, tiene la capacidad de bloquear la reacción de APC con

una duración de 9 a 14 días (que se compara favorablemente con el período de la IgE que fué de 14 y 19 días), y además este fragmento retiene la activación de las células blanco (células cebadas y/o células basofílicas).

Otra manera de abordar el problema fué iniciada por Dorrington y Bennich (20), quienes indujeron cambios estructurales en la IgE por calentamiento, y observaron que la capacidad de la molécula para unirse a la membrana de células basofílicas o de células cebadas disminuía al calentar la IgE a 56°C. Estos efectos eran parcialmente reversibles cuando enfriaban la molécula a 25°C.

Los autores observaron una transición irreversible en la región Fc de la IgE, de la cual se sabe posee el sitio citofílico.

Los autores concluyeron que el primer dominio C₄2 no es afectado por el tratamiento por calor y que no participa en reacciones citotrópicas, es probable que la actividad citotrópica corresponda a los dominios C₄3 y C₄4 y además que es en esta región donde se presentan las estructuras termolábiles.

Dorrington y Bennich correlacionaron también la inactivación de unión de la IgE humana con los cambios irreversibles inducidos por desnaturalizantes (21) y concluyeron que los dominios C₄3 y C₄4 -particularmente el primero- están involucrados.

También se han hecho estudios fisicoquímicos como los practicados por Holowka y Baird y sus colegas (22 a 25) en los cuales ellos emplean técnicas de transferencia de energía para

probar la interacción de la IgE con el receptor celular en células o en vesículas de membrana. Ellos insertan sondas aceptoras dentro de la bicapa vía apéndices hidrofóbicos y miden el apagamiento de las sondas donadoras fluorescentes atacadas químicamente por varios sitios en la IgE, o en anticuerpos para IgE y hapteno fluorescente en los sitios de combinación.

También se midió la transferencia de energía entre sondas en anticuerpos que se unen en o cerca del dominio C₄1 y algunas veces en el dominio C₄3 o C₄4 (25). Los datos de apagamiento pueden ser interpretados para proporcionar una distancia promedio entre el donador y el aceptor con una exactitud estimada de $\pm 20\%$. Estos resultados proporcionan sólo información indirecta y requieren un largo análisis interpretativo.

Los autores concluyen que la IgE se une sólo en un lado de la región Fc y emplea la interfase de los dominios C₄2-C₄3.

Es también sorprendente el hecho de que no hay cambios sustanciales en la flexibilidad de la IgE cuando ésta se une al receptor celular (27).

Es necesario realizar más estudios para confirmar el modelo de Holowka y colaboradores. Sin embargo, esto es consistente con la observación de que ocurren interacciones apartadas del punto distal de la región Fc y que las porciones terminales no están totalmente excluidas de la interacción con enzimas (28) o anticuerpos (26).

Perez-Montfort y Metzger (28) realizaron estudios de

digestión de la molécula de IgE de rata y de ratón con tripsina en ausencia y en presencia de su receptor celular, encontrando que la presencia del receptor celular disminuyó (pero no inhibió la digestión de los sitios que suponen están entre C_ε3-C_ε4 y C_ε3-C_ε4 en el caso de la IgE de ratón, o para C_ε3 y entre C_ε3-C_ε2 para la IgE de rata.

Estos resultados sugieren una región cercana a la unión de los dominios C_ε2-C_ε3 de cada cadena εpsilon que interactúa con el receptor celular.

Prevost y colaboradores (29) obtuvieron fragmentos proteolíticos a partir de la digestión por corto tiempo de la IgE de rata.

Los fragmentos obtenidos por los autores fueron el fragmento F(ab')₂ y el dominio C_ε4. Este último como resultado de una digestión asimétrica de la IgE en la cual se digirió el dominio C_ε3 de una de las cadenas pesadas.

Con los fragmentos F(ab')₂ y C_ε4 purificados, los autores estudiaron los dominios de la región Fc_ε que interactúan con el receptor celular en células cebadas de rata.

Los autores estudiaron la unión de estos fragmentos a células cebadas y encontraron que ninguno de estos fragmentos fue capaz de inhibir la unión de la IgE al receptor celular.

Estos resultados indicaron que ni el dominio C_ε2 ni el C_ε4 de la región Fc_ε se unen solos al receptor para la IgE, sugiriendo que el papel predominante sea para el dominio C_ε3, pero no excluyen la participación del dominio C_ε2 o del C_ε4 con

el sitio de unión.

Los autores emplearon también un anticuerpo monoclonal denominado MARE-1 y encontraron que éste inhibe en un 55 % la unión de la IgE con el receptor celular, además de que reacciona con la IgE pero no reconoce al fragmento $F(ab')_2$ ni al dominio C₄ por lo que consideran que el sitio que reconoce MARE-1 esté probablemente localizado en el dominio C₃.

A pesar de estos resultados, los autores no indican el sitio exacto en la IgE con el cual interactúa el receptor celular.

Cada uno de los intentos descritos hasta ahora proporcionan resultados que son difíciles de interpretar inequívocamente, por lo que es apropiado considerar otras estrategias. Una es comparar las secuencias de la IgE de diferentes especies y con secuencias de otros isotipos de inmunoglobulinas.

Dada la reactividad parcial de la IgE de ratón y de humano con los correspondientes receptores heterólogos es difícil establecer los objetivos. Algo notable es que la porción menos divergente de las cadenas épsilon de ratón y de humano es en el dominio C₄ (30) -que es una región que está implicada con una extensión menor que el dominio C₃.

Parece probable que el análisis comparativo de las secuencias puede proporcionar mejores bases para decidir sobre cuál mutación sitio-específica puede ser más útil el enfoque.

Metzger (31) sugiere una propuesta alternativa que justifique la exploración en esta área: (a) uso de reactivos de entrecruzamiento y (b) modificación de la IgE en ausencia y en

presencia del receptor celular.

Nuestro trabajo sigue la segunda proposición, que es la de modificar la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular.

3.6 OBJETIVO.

El objetivo de nuestro trabajo es el de Identificar los péptidos del sitio de la IgE que están protegidos de la iodinación por su receptor celular.

Dado que ninguna de las estrategias antes mencionadas ha aportado resultados claros acerca de sitio en la IgE que interactúa con el receptor celular, nosotros, siguiendo la sugerencia (b) de Metzger (31), empleamos una estrategia distinta para tratar de identificar el sitio en la IgE que interactúa con el receptor celular, y que en términos generales consiste en lo siguiente:

Primeramente marcamos radioactivamente la IgE con ^{125}I en ausencia y en presencia de su receptor celular, posteriormente se sometió la ^{125}I -IgE en ausencia y en presencia del receptor celular a una digestión proteolítica con quimotripsina o con tripsina para cada caso. Los péptidos resultantes en cada caso se analizaron bidimensionalmente.

Por medio de esta estrategia nosotros esperamos aportar datos más precisos acerca del sitio en la IgE que interactúa con el receptor celular.

La metodología empleada para la realización de este trabajo es la siguiente.

4 MATERIALES Y METODOS.

4.1 INMUNOGLOBULINA E (IgE).

Se utilizó IgE monoclonal H1-DNP- ϵ -26.82 de ratón con actividad anti-dinitrofenol obsequiada por el Dr. Henry Metzger.

Para la obtención de la IgE monoclonal H1-DNP- ϵ -26.82 de ratón con actividad anti-dinitrofenol a partir del líquido de ascitis de ratones de la cepa CAF₁, se sigue la técnica descrita por Holowka y Metzger (32), que en términos generales consiste en lo siguiente: se centrifuga el líquido de ascitis durante 30 minutos a 49,200 x g, se recupera el sobrenadante y se filtra en frío a través de fibra de vidrio; se precipita con una solución de sulfato de amonio ((NH₄)₂ SO₄) al 30 % de saturación toda la noche a 4°C.

Después se centrifuga la solución 30 minutos a 12,100 x g, se descarta el precipitado y el sobrenadante se vuelve a precipitar con una solución de (NH₄)₂ SO₄ al 55 % de saturación toda la noche a 4°C. Después, se centrifuga 30 minutos a 12,000 x g y se descarta el sobrenadante en tanto que el precipitado se resuspende en solución amortiguadora de boratos salina pH 8 (SABS) (H₃BO₃ 0.2 M, NaCl 0.16 M) (aproximadamente 1 ml por cada 2 ml del volumen del líquido de ascitis original). Esto se aplica a una columna de ϵ -N-trinitrofenil-lisina conjugado a Biogel A 0.5 m con Bromuro de Cianogeno (CNBr).

La columna se lava con SABS y después se eluye el anticuerpo con dinitrofenil-glicina 0.02 M.

El eluido se dializa 2 veces contra 10 volúmenes de p-nitrofenol 0.01 M y una vez contra SABS.

El hapteno libre se elimina con una columna de cromatografía de Dowex-1 en SABS a 40°C.

4.2 PREPARACION DEL ANTISUERO ANTI-IgE EN CONEJO Y PRECIPITACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Para producir los anticuerpos anti-IgE, se hizo una primera inmunización intramuscular en dos sitios diferentes en un conejo hembra, con aproximadamente 60 µg de IgE de rata.

La inyección para realizar la inmunización contenía 0.3 ml de la solución de IgE, la cual se emulsificó con 0.3 ml de adyuvante completo de Freund (ACF).

La segunda inmunización se hizo por vía intraperitoneal después de 17 días. En esta ocasión, se emplearon aproximadamente 100 µg de IgE de ratón en 1 ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.4.

La tercera inmunización, también intraperitoneal, se hizo después de 27 días, empleándose para ello aproximadamente 100 µg de IgE de rata en 1 ml.

Una semana después de la última inmunización se sangró a blanco el conejo, obteniéndose 125 ml de sangre.

Se separó el suero hasta lograr recuperar un volumen final aproximado de 60 ml. A este volumen de suero se le agregó medio volumen (30 ml) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.4 al 100 % de saturación,

obteniéndose una saturación final del 33 %. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 M y se dejó 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta.

Posteriormente, se centrifugó a 12,100 x g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió con PBS en el volúmen original del suero. Después se volvió a agregar medio volúmen de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 M y se dejó 1 hora con agitación a temperatura ambiente.

El procedimiento anterior se repitió dos veces más.

Después de esto, se disolvió el último precipitado en medio volúmen de PBS y se dializó 4 veces contra 100 volúmenes de PBS para eliminar el $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. A la solución dializada se le determinó concentración de proteína por el método de Biuret y se probó su actividad por doble inmunodifusión (D.I.D.), como se aprecia en la figura 12.

Posteriormente se utilizó en los experimentos como inmunoglobulinas anti-IgE.

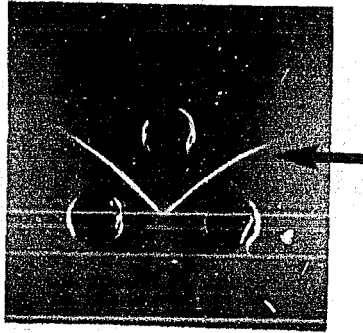


Figura 12. Doble inmuno difusión utilizada para comprobar la actividad de la IgG de conejo dirigida contra la IgE de rata, por medio de la aparición de la banda de precipitación (flecha), formada por la interacción antígeno (IgE)-anticuerpo (IgG).

4.3 CELULAS BASOFILICAS LEUCEMICAS DE RATA.

Las células basofílicas leucémicas de rata de la sublínea 2H3, empleadas en el presente trabajo fueron obsequiadas por el Dr. Henry Metzger.

Las células se mantuvieron en un cultivo de monocapa según la técnica descrita por Barsumian y colaboradores (33), con medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (In Vitro y Sigma) con una solución balanceada de sales de Earle, suplementado con 20 % de suero fetal de bovino de complementado por calor (30 minutos a 56°C) (Gibco), L-glutamina, 30 µg/ml; bicarbonato de sodio, 60 µg/ml; sulfato de gentamicina, 50 µg/ml (todos de Sigma), y agua bidestilada.

Las células se cultivaron en una incubadora Forma Scientific con una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37°C en cajas de cultivo (Costar) de 25 cm² (aproximadamente 4.1 x 10⁴ células por caja) para preservar la línea celular. Para experimentación, las células fueron transferidas a cajas de 80 cm² (aproximadamente 13.1 x 10⁴ células por caja) y a cajas de 175 cm² (aproximadamente 29 x 10⁴ células por caja). Tanto la transferencia como la manutención de las células se hicieron en forma estéril según el siguiente método, que es una versión ligeramente modificada del método descrito por Rivera (34).

Primeramente se decantó el medio de cultivo "viejo" de las cajas de cultivo. Después se añadieron 5 ml de tripsina-verseno (sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetracético) (tripsina

0.025 % (p/v), verseno 0.02 % (p/v) en PBS pH 7), para enjuagar la pared de cada caja en donde crecieron las células y se decantaron. Seguidamente se añadieron de 5 a 10 ml de tripsina - verseno a cada caja, se dejó que el líquido cubriera la monocapa de células y se incubaron 5 minutos a 37°C.

El desprendimiento de las células adheridas al plástico se realizó golpeando la caja de cultivo con la palma de la mano.

Después se añadieron de 20 a 30 ml de MEM suplementado con suero fetal de bovino para detener la acción de la tripsina.

Estas células se colectaron en tubos de 50 ml (Costar) para centrifuga y se centrifugaron 5 minutos a 200 x g a temperatura ambiente en una centrifuga Sorvall (RT 6000 B Du Pont). Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 40 ml de MEM suplementado con suero fetal de bovino y se repartieron en cajas de cultivo de 25 cm² (aproximadamente 1 x 10⁶ células por caja).

A cada caja se le agregó suficiente MEM suplementado con suero para que el volumen final fuera de 35 ml. Las cajas se colocaron en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Este procedimiento se repitió cada 72 horas.

4.4 PREPARACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD DE SEFAROSA-DINITROFENIL-LISINA (DNP-lisina).

Se pesó 1 gr de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianogeno (CNBr) marca Sigma, y se lavó con 250 ml de HCl 0.001 M. Posteriormente se disolvieron aproximadamente 10 mg de DNP-lisina en aproximadamente 5 ml de NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.3 y se incubó con la Sefarosa 4B-CNBr por 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavó con 5 ml de NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3 y se agregaron aproximadamente 10 ml de glicina 0.2 M, pH 8 y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavó con aproximadamente 500 ml de NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3 y con 250 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4 alternadamente.

Finalmente se lavó con aproximadamente 100 ml de SABS y se guardó a 4°C para su uso posterior.

4.5 PURIFICACION DE LA IgE UNIDA A SU RECEPTOR CELULAR.

En un experimento típico se tomaron 6 cajas de cultivo de 175 cm^2 con células de 72 horas de edad y se tripsinizaron, obteniéndose 1.745×10^6 células totales o 2.9×10^4 células por caja. Estas células se lavaron una vez con 50 ml de MEM amortiguado con N-2hidroxiethylpiperazina N-2 ácido etanosulfónico (Hepes) (Gibco) (MEM-Hepes), y se resuspendieron en 20 ml de MEM-Hepes. A estas células, se les agregaron 10 μg de IgE en SABS. Las células con la IgE se incubaron en un baño con

agitación rápida (Forma Scientific) durante 3 horas 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con 50 ml de PBS 0.015 M PO_4 , NaCl (0.15 M) pH 7.2 y se les agregaron 3 ml de amortiguador de solubilización que contenía el detergente 3-[[3colamido-propil-dimetil-amonio]-1-propano sulfonato (Chaps) 0.01 M (Calbiochem-Behring Corp.) y los inhibidores de proteasas fluoruro de fenil metil sulfonilo 0.001 M (Sigma), 1 unidad inhibitoria de tripsina/ml de aprotinina (Sigma); 10 $\mu\text{g/ml}$ de pepstatina (Sigma) y 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina (Boehringer) en SABS. La solubilización se llevó a cabo durante 15 minutos en frío y a una concentración aproximada de 5×10^7 células/ml. Pasado este tiempo se centrifugó el lisado 1 hora a 50,000 x g a 4°C. El sobrenadante que contenía más del 95 % del complejo IgE-receptor se incubó a 4°C con 0.2 ml de DNP-iisina acoplada a Sefarosa toda la noche con agitación lenta. Posteriormente la columna se lavó con 7 ml de amortiguador de solubilización y con 100 ml de un amortiguador A que contenía Tris (hidroximetil)-aminometano 0.04 M (Merck), cloruro de calcio 0.01 M (Baker) y 0.25 % de octilfenoxipoli(etoxietanol) (Tritón X-100) (Sigma) pH 8.1.

Se ha demostrado que este amortiguador disocia al receptor y deja unida a la IgE solo con la cadena α del receptor celular (35).

Después de lavar exhaustivamente la columna se eluyó la IgE y su receptor con un total de 0.5 ml de ácido- ϵ -dinitrofenil-caproico 0.01 M en el amortiguador A, haciendo 2 incubaciones con 0.25 ml de 40 minutos cada una.

4.6 IODINACION DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR

Se iodinaron por separado 200 μ l (con aproximadamente 34 μ g) de IgE en ausencia del receptor celular y el eluido de la columna de Sefarosa-DNF-lisina, con 1 mCi de Iodo 125 (^{125}I) (ICN) cada una, y con 3 perlas de iodo (Pierce Chemical Co.) para la IgE en ausencia del receptor celular y 5 perlas de iodo para la IgE en presencia del receptor celular, durante 45 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. Se separó el ^{125}I que no se unió a la IgE en columnas de Sefadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) de 1 ml, siguiendo la técnica descrita por Tuszyński y colaboradores (36) y se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada eluido en un contador de radiaciones gamma (Beckman gamma 5500). La IgE en ausencia del receptor celular tuvo 7.69×10^6 cpm y la IgE en presencia del receptor celular tuvo 1.79×10^6 cpm. Se tomaron 50 μ l de la IgE en ausencia del receptor celular, conteniendo 1.92×10^6 cpm y los 200 μ l de la IgE en presencia de su receptor celular, ambas muestras con aproximadamente 1.8×10^6 cpm y se diluyeron a 500 μ l con SABS. Cada una se colocó en un tubo Eppendorf de 1 ml, y se les agregaron 300 μ l de inmunoglobulinas de conejo con actividad anti-IgE de ratón y se incubaron 3 horas en el refrigerador.

Posteriormente se les agregaron 300 μ l de Pansorbin (Staphylococcus aureus) con proteína A (Calbiochem) equilibrado

con SABS y se incubaron 90 minutos en el refrigerador.

El precipitado se lavó 13 veces con 1 ml del amortiguador A y finalmente 5 veces con SABS. Se diluyó en 300 µl de amortiguador de muestra que contenía dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2 % de concentración final (Bio Rad), Tris (hidroximetil)-aminometano 0.08 M, pH 6.8, glicerol 10 %, agua destilada desionizada y β-mercaptoetanol al 10 % (Bio Rad), ambas preparaciones se dividieron en 4 partes cada una (aproximadamente 10⁴ cpm en cada una) para hacer la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

4.7 SEPARACION DE LA IgE EN AUSENCIA Y PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR POR MEDIO DE SDS-PAGE.

Las cadenas H y L de la IgE marcada con ¹²⁵I en ausencia y en presencia del receptor celular se separaron en un gel de poliacrilamida (12.5 %) con SDS (0.1 % concentración final).

Posteriormente el gel se tiñó con una solución de isopropanol (Baker) al 25 %, ácido acético (Merck) al 10 %; azul de Coomasie R-250 (Bio Rad) al 0.025 % y agua, durante 3 horas y se destiñó con ácido acético al 10 %. El gel se secó en una secadora Dry gel Sr. model SE 1160. (Hoefer Scientific Instruments) y las bandas iodinadas correspondientes a las cadenas H y L de cada preparación se pusieron en evidencia por

medio de autorradiografía usando una película de rayos-x (XK-1, Kodak) y una pantalla Quanta III (Cronex de Du Pont) en un cassette, durante 30 minutos aproximadamente, a -80°C .

La digestión de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular, así como el análisis bidimensional de los péptidos resultantes se hicieron siguiendo la técnica reportada por Pecoud y Conrad (37) modificada en nuestro laboratorio.

4.8 DIGESTION DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR

Después de haber hecho la autorradiografía, se delimitaron y se cortaron las bandas correspondientes a las cadenas H iodadas de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular y se procedió a rehidratar las bandas cortadas, primeramente con 50 ml de 2-propanol (Merck) al 25 % (dos veces) durante 6 horas y después con 50 ml de metanol (Merck) al 10 % durante 2 días.

Después se colocaron los pedazos del gel con las cadenas H de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular por separado en tubos de 1 ml y se secaron los geles en una centrifuga concentradora por vacío (Speed vac concentrator, marca Savant); seguidamente se añadió a cada tubo 1 ml de carbonato de amonio (NH_4CO_3) (Baker) 0.05 M pH 8.6, con 50 μg de tripsina (Worthington) o 50 μg de quimotripsina (Worthington) y se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C con agitación lenta. Cuando hubo transcurrido el tiempo de incubación se separó el líquido con los

péptidos y se descartaron los geles. Los péptidos resultantes se concentraron de la siguiente manera: se centrifugó la solución de $\text{NH}_4 \text{CO}_3$ que contenía a los péptidos en la centrifuga concentradora durante 3 horas 30 minutos aproximadamente hasta secarlos completamente; después se resuspendieron los péptidos en 500 μl de agua destilada desionizada y se centrifugaron 2 horas aproximadamente hasta secarlos completamente. Luego se resuspendieron en 200 μl de agua destilada desionizada y se secaron por centrifugación en aproximadamente 1 hora 30 minutos, este paso se realizó 3 veces. Finalmente, se resuspendieron en 100 μl de amortiguador de electroforesis (ácido acético: ácido fórmico: agua 15: 5: 80) y se concentraron por centrifugación en 1 hora aproximadamente.

4.9 ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LOS PEPTIDOS DE LA CADENA H DE LA IgE EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL RECEPTOR CELULAR GENERADOS POR LA DIGESTION CON PROTEASAS.

Una vez concentrados los péptidos para cada caso, se resuspendieron en 20 μ l de amortiguador para electroforesis. Cada una de las muestras se puso sobre una placa de cromatografía de capa fina de celulosa de 20 x 20 cm (Aldrich Chemical Company, Inc.). Se escogió como punto de aplicación uno localizado en la esquina superior derecha de un cuadrado de 5 x 5 cm formado con la esquina básica inferior izquierda de la placa. Se utilizó fuchsina básica como marcador y se colocó a 2 cm de distancia de la muestra (a 7 cm del borde izquierdo de la placa).

Una vez aplicadas la muestra y el colorante en cada placa se procedió a rociar la placa con amortiguador de electroforesis y posteriormente se hicieron electroforesis de alto voltaje (1,000 V: 151 mA: 201 W) en un aparato para electroforesis (LKB 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit) alimentado con una fuente de poder (LKB 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply). Durante las electroforesis se dejó que el marcador migrara 5 cm para los péptidos obtenidos con tripsina (aproximadamente 45 minutos) y 7 cm para los péptidos obtenidos con quimotripsina (aproximadamente 60 minutos). Una vez realizadas las electroforesis para cada caso, se realizaron cromatografías en capa fina en una segunda dimensión colocándose cada placa en una cámara de cromatografía perteneciente a un aparato de

cromatografía Kodak Chromatogram Developing Apparatus y empleándose una mezcla de solventes para cromatografía, que consistía de : butanol: piridina: ácido acético: agua 32.5: 25: 5: 20. El frente de los solventes se dejó migrar aproximadamente 18 cm, y una vez terminada la cromatografía, se dejó secar la placa a temperatura ambiente. Se realizó una autorradiografía de cada placa.

5 RESULTADOS Y DISCUSION.

Las cadenas pesada (H) y ligera (L) de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular fueron separadas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5 %) en presencia de SDS (0.1 % concentración final), como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 13 muestra la separación obtenida para las cadenas H (peso molecular aproximado de 80 kDa) y L (con un peso molecular aproximado de 25 kDa) de la IgE para cada caso.

Las bandas iodinadas de pesos moleculares superiores a 80 kDa probablemente representen agregados de IgE no disociados.

Se recortaron las regiones correspondientes a la cadena H en cada caso y se sometieron a una digestión proteolítica con tripsina o con quimotripsina (ver Materiales y Métodos).

La digestión de la cadena H de la IgE con tripsina genera 6 péptidos iodinados que denominamos "1, 2, 3, 4, 5 y 6", mientras que la digestión de la cadena H de la IgE con quimotripsina genera 7 péptidos iodinados que se denominaron "A, B, C, D, E, F, y G". En ambos casos, los péptidos fueron visualizados por medio de autorradiografías.

En las figuras 14-A y 14-B, se muestran los mapas peptídicos obtenidos por autorradiografía para las cadenas H digeridas con tripsina de la IgE en ausencia (14-A I, 14-B IV y VI) y en presencia (14-A II y III y 14-B V y VII) del receptor celular.

Para el caso de la IgE en presencia de su receptor celular,

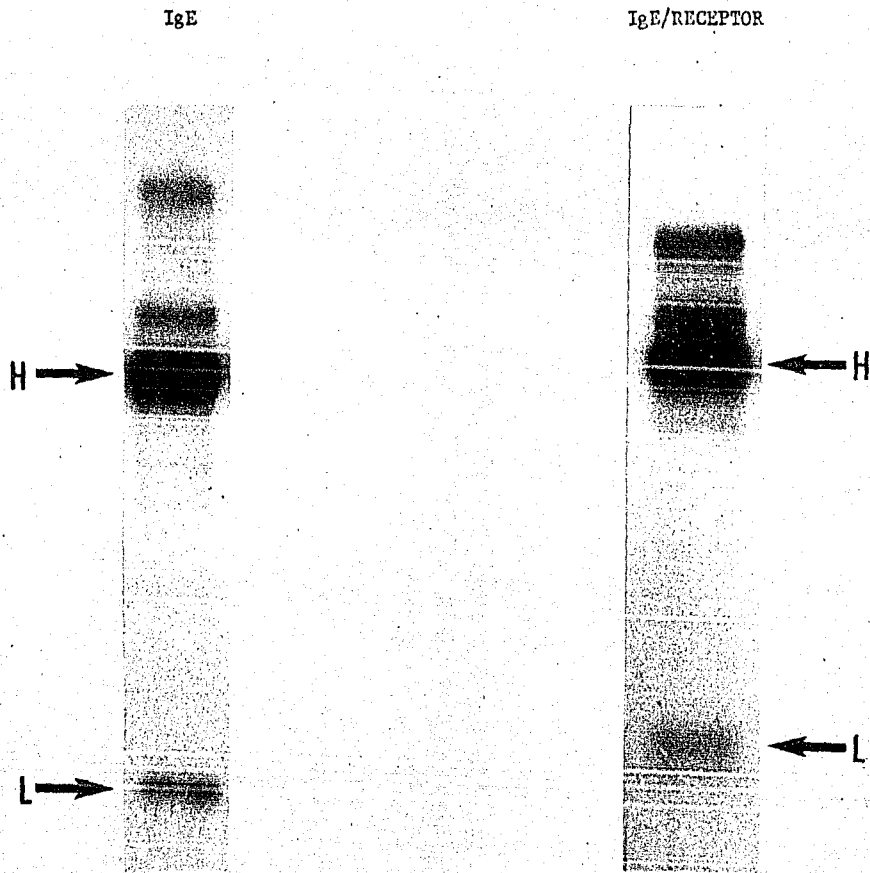


Figura 13. Las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de la IgE en ausencia (IgE) y en presencia (IgE/RECEPTOR) del receptor celular, fueron separadas en un gel de poliacrilamida (12.5 %) en presencia de SDS (0.1 % concentración final), obteniéndose una banda H (peso molecular aprox. 80 kDa) y una banda L (peso molecular aprox. 25 kDa) las cuales en ambos casos están señaladas por flechas.

PEPTIDOS TRIPTICOS IODINADOS DE LA CADENA EPSILON

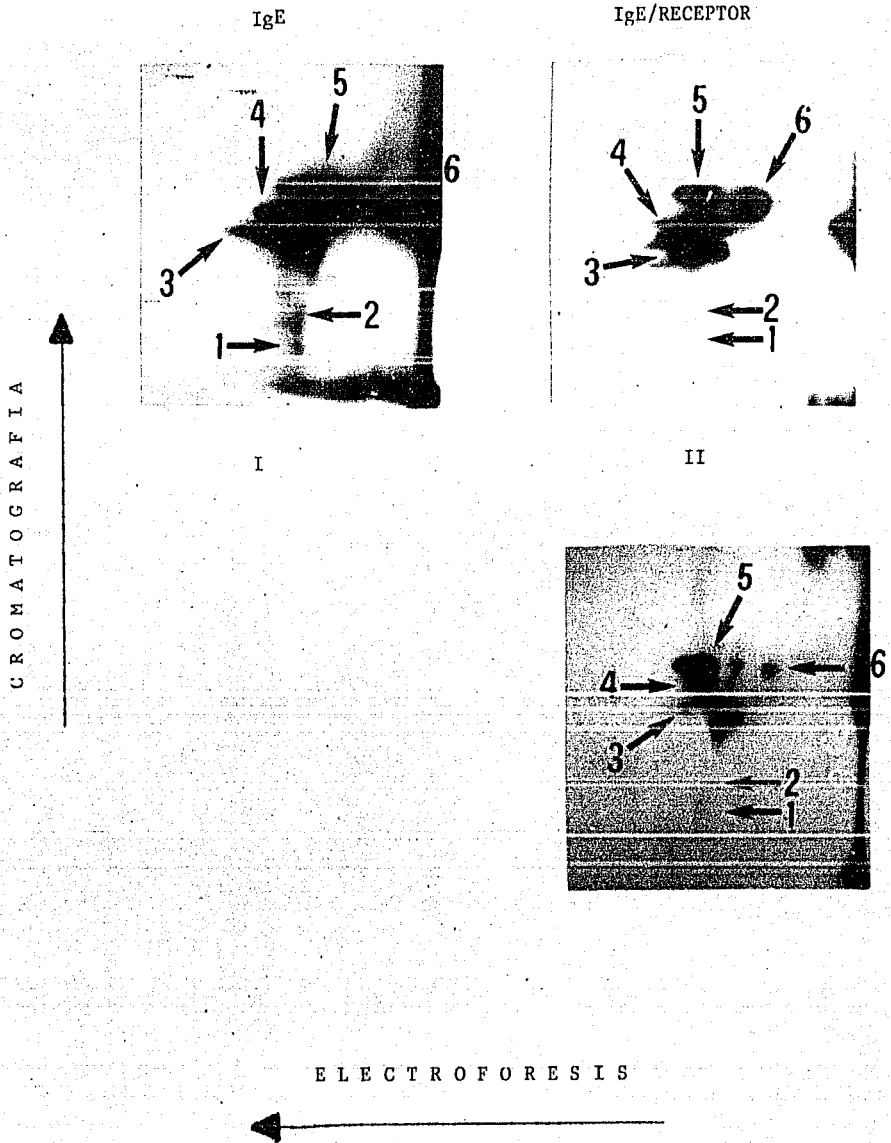


Figura 14-A

PEPTIDOS TRIPTICOS IODINADOS DE LA CADENA EPSILON

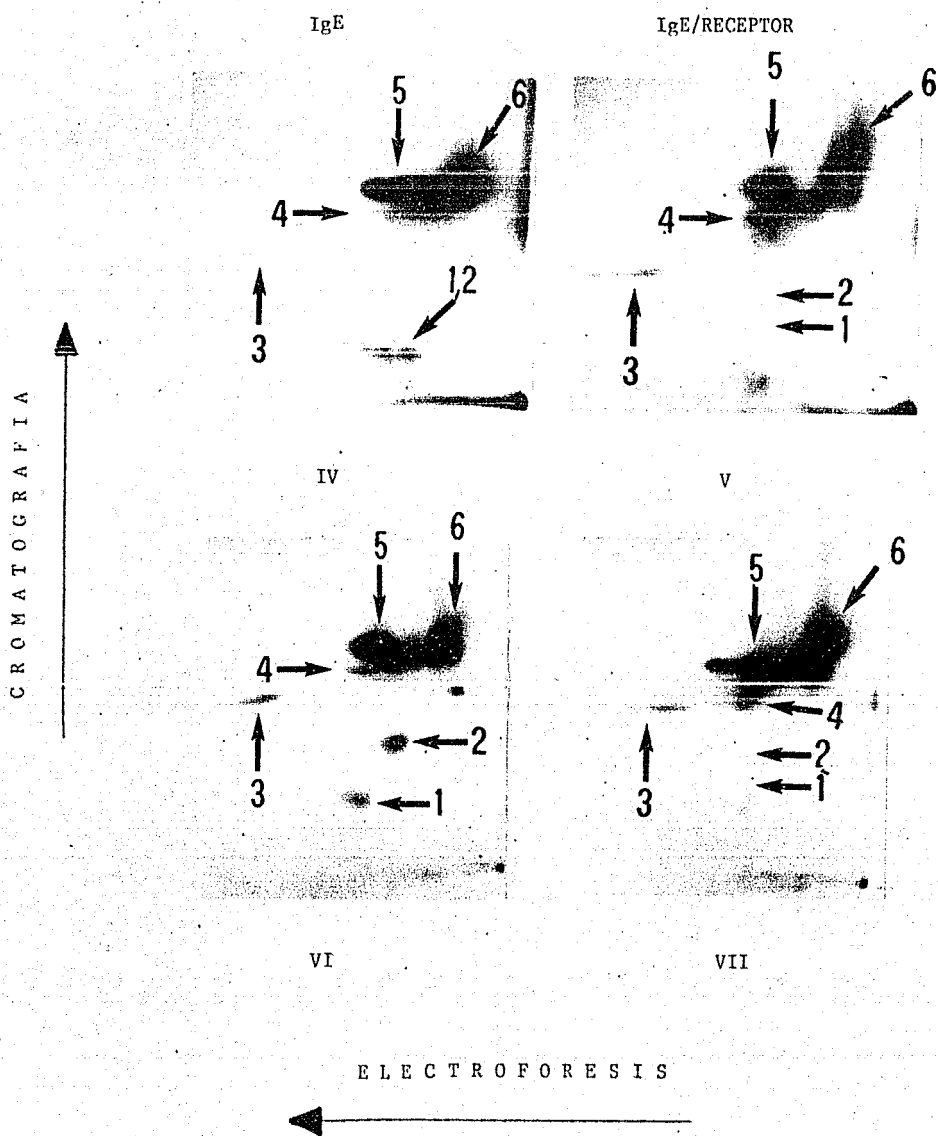


Figura 14-B

(figuras 14-A II y III y 14-B V y VII) se aprecia que hay una disminución en el grado de iodinación de los péptidos denominados "1 y 2" (flecha) con respecto de los mismos péptidos en el caso de la IgE en ausencia del receptor celular (figuras 14-A I y 14-B IV y VI) (flecha).

En la figura 15, se observan los mapas peptídicos obtenidos por autorradiografía para las cadenas H de la IgE digerida con quimotripsina en ausencia (figura 15 VIII) y en presencia (figura 15 IX) del receptor celular. En el caso de la IgE en presencia del receptor celular se observa que hay una disminución en el grado de iodinación de los péptidos denominados "A y G" (flecha).

Suponemos que los péptidos que disminuyen de intensidad en las autorradiografías están protegidos de la iodinación porque probablemente están cercanos a o son los que interactúan con el receptor celular.

Para comprobar la reproducibilidad de los patrones obtenidos por medio de autorradiografía para las cadenas H de la IgE en ausencia y en presencia de su receptor celular digeridas con tripsina o con quimotripsina, se elaboraron mapas peptídicos promedio para cada caso, empleando los valores de Rf para electroforesis y cromatografía de cada péptido. El valor Rf se calculó de la siguiente manera: se tomó el valor de la distancia recorrida por cada péptido y se dividió entre el valor de la distancia total recorrida por el frente para cada caso.

$$Rf = \frac{\text{valor recorrido por cada péptido}}{\text{valor recorrido por el frente}}$$

PEPTIDOS QUIMOTRIPTICOS IODINADOS DE LA CADENA EPSILON

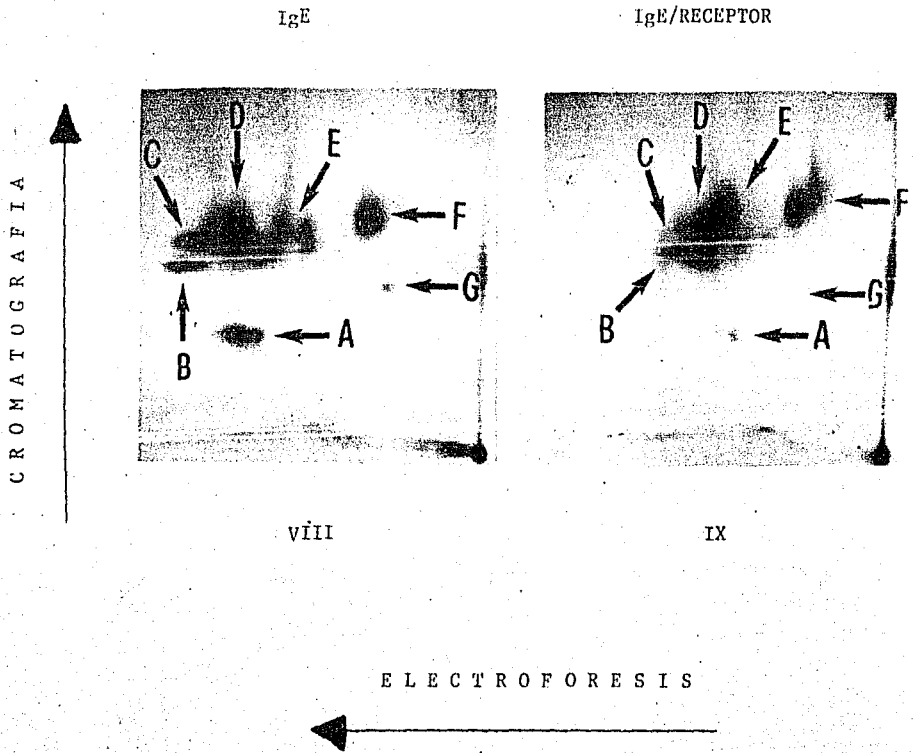


Figura 15

(NOTA: En las figuras 16 a 19 el eje que corresponde a la electroforesis está invertido con respecto al mismo eje en las figuras 14-A, 14-B y 15. Esto se debe a la impresión de las gráficas y no afecta en nada los patrones de distribución de los péptidos).

En las figuras 16 y 17, se muestran los mapas peptídicos promedio resultantes de la digestión de las cadenas H de la IgE con tripsina en ausencia (figura 16) y en presencia (figura 17) de su receptor celular. En tanto que en las figuras 18 y 19, se muestran los mapas peptídicos promedio resultantes de la digestión de las cadenas H de la IgE con quimotripsina en ausencia (figura 18) y en presencia (figura 19) de su receptor celular.

Al comparar las figuras 16 y 17, se observa que el patrón de distribución de los péptidos para los valores promedio de R_f de electroforesis y de cromatografía es muy parecido, en tanto que la desviación estándar promedio para cada péptido es muy pequeña.

En la figura 19 (IgE en presencia del receptor celular digerida con quimotripsina), se observa que la desviación estándar para cada péptido es muy pequeña por lo que es bastante reproducible el patrón obtenido por autorradiografía, y además la posición de cada péptido concuerda con la posición de los péptidos en la figura 18 (IgE en ausencia de su receptor celular digerida con quimotripsina), sólo que en este caso los péptidos carecen de desviación estándar por tratarse solo de un mapa peptídico.

Figura 16

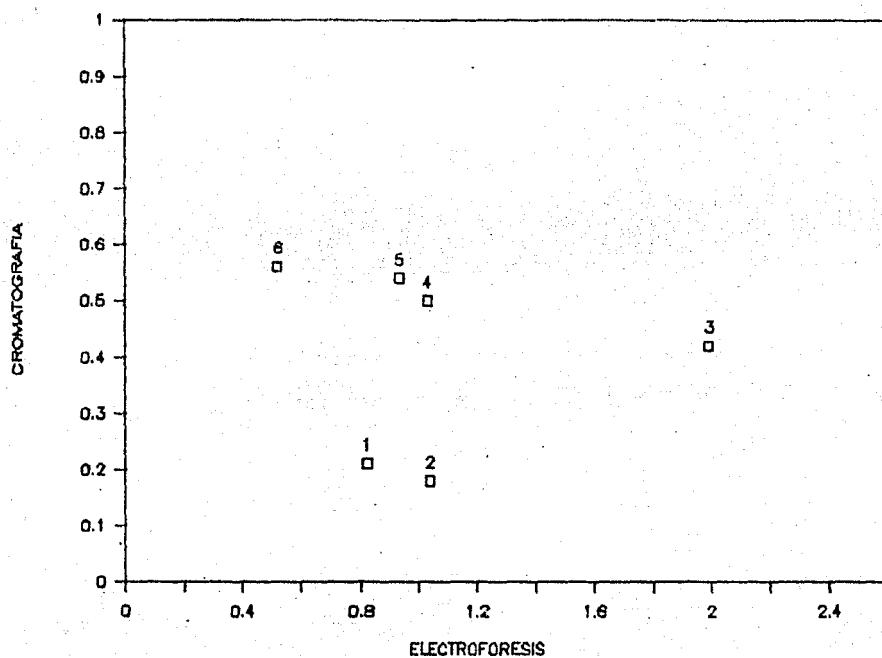


Figura 16

Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodinados de la cadena épsilon digeridos con tripsina en ausencia de su receptor celular.

IgE-T

Péptido	Rf. Electroforesis ($\bar{X} \pm D.E.$)	Rf. Cromatografía ($\bar{X} \pm D.E.$)
1	0.82 \pm 0.26	0.21 \pm 0.11
2	1.04 \pm 0.4	0.18 \pm 0.06
3	1.99 \pm 0.79	0.42 \pm 0.04
4	1.03 \pm 0.33	0.5 \pm 0.09
5	0.93 \pm 0.37	0.54 \pm 0.07
6	0.52 \pm 0.16	0.56 \pm 0.04

Figura 17

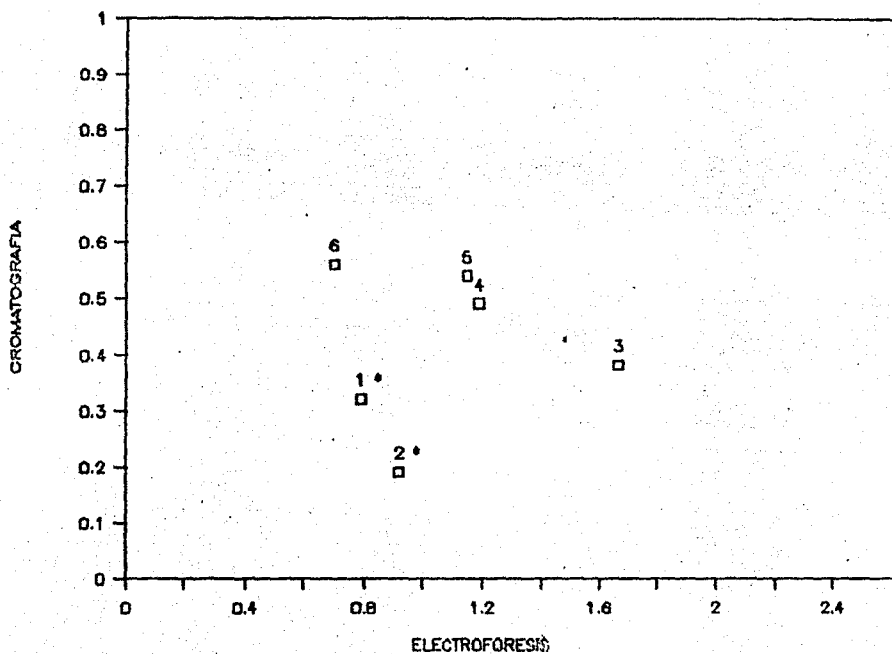


Figura 17
 Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodados de la cadena épsilon digeridos con tripsina en presencia de su receptor celular.

R-T

Péptido	Rf. Electroforesis ($\bar{X} \pm D.E.$)	Rf. Cromatografía ($\bar{X} \pm D.E.$)
1 *	0.79 *	0.32 *
2 *	0.92 *	0.19 *
3	1.66 \pm 0.04	0.38 \pm 0.09
4	1.19 \pm 0.33	0.49 \pm 0.05
5	1.15 \pm 0.4	0.54 \pm 0.01
6	0.7 \pm 0.3	0.56 \pm 0.02

(*) Péptidos en los que disminuye su grado de iodación.

Figura 18

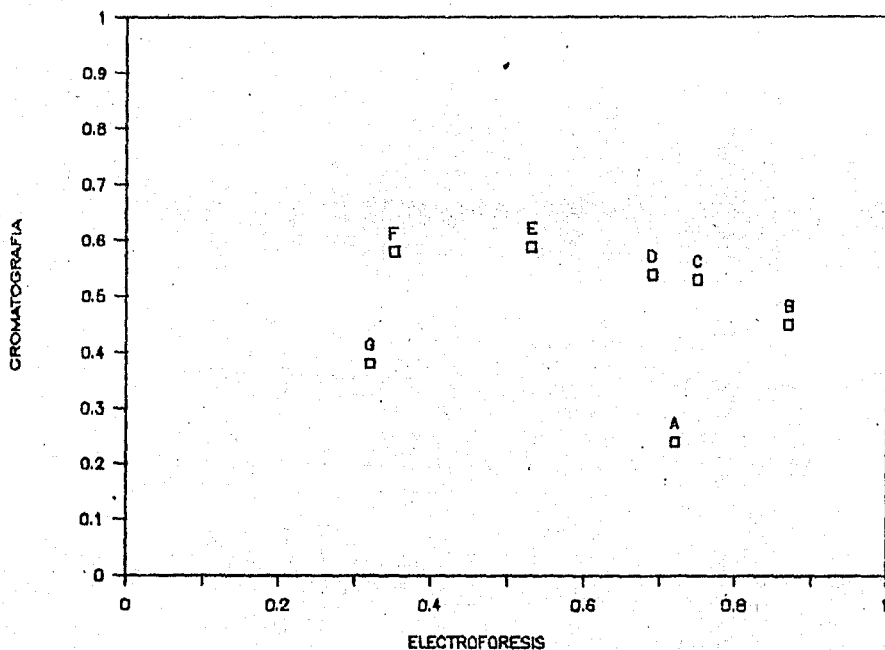


Figura 18
Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodinados de la cadena ϵ digeridos con quimotripsina en ausencia de su receptor celular.

IgE-Q

Péptido	Rf. Electroforesis ($\bar{X} \pm D.E.$)	Rf. Cromatografía ($\bar{X} \pm D.E.$)
A	0.72 \pm 0.08	0.24 \pm 0.1
B	0.87 \pm 0.08	0.45 \pm 0.02
C	0.75 \pm 0.14	0.53 \pm 0.01
D	0.69 \pm 0.1	0.54 \pm 0.04
E	0.53 \pm 0.02	0.59 \pm 0.06
F	0.35 \pm 0.01	0.58 \pm 0.04
G	0.32 \pm 0.05	0.38 \pm 0.07

Figura 19

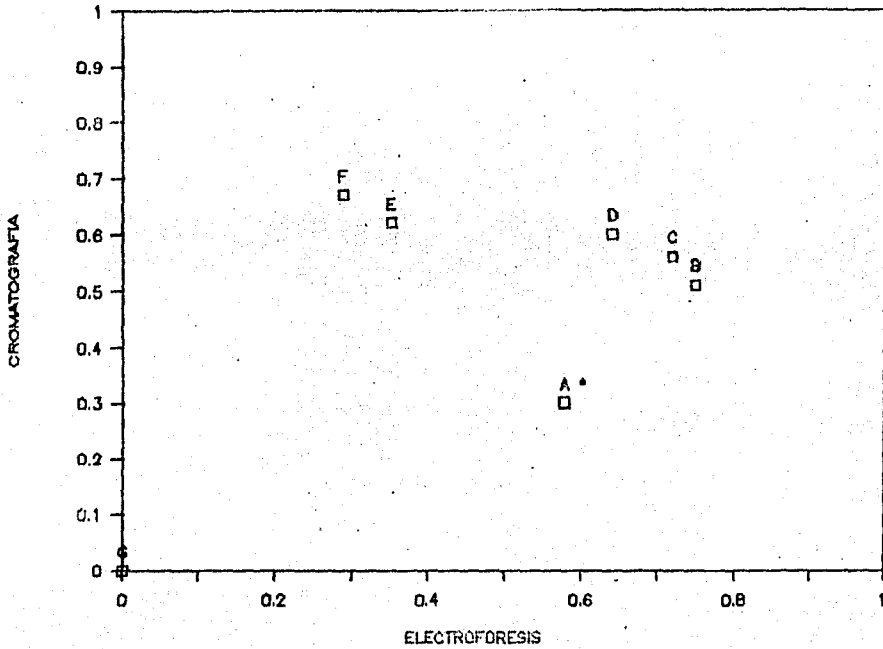


Figura 19
 Mapa de los promedios de migración de los principales péptidos iodinados de la cadena épsilon digeridos con quimotripsina en presencia de su receptor celular.

R-Q **

Péptido	Rf. Electroforesis (X ± D.E.)	Rf. Cromatografía (X ± D.E.)
A *	0.58 *	0.3 *
B	0.75	0.51
C	0.72	0.56
D	0.64	0.6
E	0.35	0.62
F	0.29	0.67
G	---	---

(*) Péptidos en los que disminuye su grado de iodinación.

(**) Péptidos sin D.E. por tratarse de un solo mapa.

Para asegurarnos que los péptidos denominados "1 y 2" y "A y G" efectivamente disminuyen su grado de iodación, se midió directamente la radioactividad para cada una de las regiones correspondientes a los péptidos en las placas de cromatografía en capa fina, raspando el área correspondiente de celulosa y por el análisis en un contador de radiaciones gamma. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Los resultados muestran que es claro que hay una disminución importante de cpm para el caso del péptido 1 y de los péptidos A y G.

En el caso del péptido 1 la disminución es por lo menos del 80.50 % ya que sólo hubo un mapa peptídico en el que hubo radioactividad en la región ocupada por este péptido y que está considerado en la tabla 4. El péptido 2 por lo menos disminuye en un 30.77 %. Se observa en la tabla 4 que hay una diferencia entre las desviaciones estandar de los péptidos 1 y 2 para el caso de la IgE en ausencia (IgE) y en presencia del receptor celular (R-T) digeridas con tripsina; suponemos que dicha diferencia se debe primero a que se trata de experimentos independientes en cada caso y segundo a que el número de experimentos en cada caso es de dos. La razón para esto último se debe a que se tomaron los experimentos más cercanos en cuanto a fecha de realización para poder hacer una estimación más real en cuanto a la disminución de cpm se refiere.

Si se observan las figuras 14-A y B que corresponden a las autorradiografías obtenidas de la digestión de la IgE en ausencia

CE
did
en

Péptido	IgE-T (cpm \bar{x} + D)
1	220.22 +
2	126.69 +
3	166.76 +
4	339.44 + 24
5	1904.27 + 9
6	1144.59 + 4

Péptido	IgE-Q (cpm)
A	296.07
B	189.03
C	320.68
D	564.03
E	735.94
F	259.00
G	98.32

(*) Disminución signific

(**) Sin D.E. por trata

CPM promedio de los principales péptidos iodados de la cadena épsilon digeridos con Tripsina (T) o con Quimotripsina (Q) en ausencia (IgE) o en presencia (R) de su receptor celular.

Péptido	IgE-T	% de cpm	R-T		% de cpm	% de disminución (-)	
	(cpm \bar{x} \pm D.E.)	totales	(cpm \bar{x} \pm D.E.)		totales	o aumento (+)	
1	220.22 \pm 13.53	5.64	41.04 \pm 58.04		1.10	(-)	80.50*
2	126.69 \pm 7.80	3.25	83.50 \pm 51.38		2.25	(-)	30.77*
3	166.76 \pm 33.59	4.27	190.52 \pm 60.34		5.14	(+)	20.37
4	339.44 \pm 246.54	8.70	334.94 \pm 60.10		9.05	(+)	4.02
5	1904.27 \pm 98.13	48.80	1142.09 \pm 192.70		30.86	(-)	36.76*
6	1144.59 \pm 47.75	29.33	1908.73 \pm 1008.72		51.57	(+)	75.83

Péptido	IgE-Q**	% de cpm	R-Q**		% de cpm	% de disminución (-)	
	(cpm)	totales	(cpm)		totales	o aumento (+)	
A	296.07	12.02	30.27		3.29	(-)	72.63
B	189.03	7.67	761.54		31.18	(+)	306.52
C	320.68	13.02	494.64		20.23	(+)	55.38
D	564.03	22.90	547.98		22.44	(-)	2.01
E	735.93	29.88	348.32		14.26	(-)	52.28
F	259.00	10.52	210.22		8.61	(-)	18.16
G	98.32	3.99	-----		-----	(-)	100.00

(*) Disminución significativa por Prueba de T de Student.

(**) Sin D.E. por tratarse de un solo mapa peptídico en cada caso.

TABLA 4.

y en presencia del receptor celular con tripsina se aprecia que efectivamente los péptidos 1 y 2 disminuyen en su grado de iodación para el caso de la IgE en presencia del receptor celular con respecto de los mismos péptidos en el caso de la IgE en ausencia del receptor celular. Además, en las figuras 16 y 17 se muestran los mapas peptídicos promedio obtenidos para los péptidos generados por la digestión de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular con tripsina. Se observa que en ambos casos, los péptidos guardan una posición muy similar en cuanto al patrón de migración se refiere. Asimismo, las desviaciones estandar para cada uno de los péptidos en ambos casos son muy pequeñas. Con base en estos mapas nosotros suponemos que los patrones de migración obtenidos por medio de autorradiografías para los péptidos resultantes de la digestión de la IgE en ausencia y en presencia del receptor celular son reproducibles.

Al hacer el tratamiento estadístico de t de Student para los péptidos que disminuyen su grado de iodación (1 y 2), se encontró que esta disminución es estadísticamente significativa desde el punto de vista del criterio biológico, aunque este resultado se debe considerar como tentativo o preliminar por tratarse de sólo dos experimentos para cada caso.

También se observa que otros péptidos cambian su grado de iodación; por ejemplo, el péptido 5 disminuye en un 36.76 % y el péptido 6 aumenta un 75.83 %.

Por medio del análisis estadístico de t de Student, se

comprobó que la disminución en el grado de iodación del péptido 5 fué estadísticamente significativa, aunque en las figuras 14-A y B no se observa que haya un decremento apreciable en la región ocupada por el péptido 5, en el caso de la IgE en presencia del receptor celular, con respecto del mismo péptido para el caso de la IgE en ausencia del receptor celular.

Por lo anterior no se puede considerar que este péptido esté involucrado con el sitio de la IgE que interactúa con el receptor celular. Sin embargo, tomando en cuenta el resultado obtenido con la prueba de t de Student para este péptido (disminución estadísticamente significativa) ($p > 0.05$), no podemos descartarlo por completo, dado que no conocemos aún la secuencia de los residuos de aminoácidos de cada uno de los péptidos obtenidos en cada caso, con lo cual se podría determinar a que sitio o a que dominio de la región Fc_4 pertenecen.

Para el caso de los péptidos 3 y 4, no parece haber una modificación significativa en cuanto a su grado de iodación.

En el caso de los péptidos obtenidos con quimotripsina, se pueden hacer aseveraciones sólo basadas en un experimento, que está mostrado en la tabla 4.

Los péptidos A y B disminuyen su grado de iodación en un 72.63 y un 100 % respectivamente, para el caso de la IgE digerida con quimotripsina en presencia del receptor celular (R-Q) con respecto a los mismos péptidos en el caso de la IgE en ausencia del receptor celular (IgE) digerida con la misma enzima.

Otro péptido que parece reducir su grado de iodación es el

péptido E, mientras que los péptidos C y B lo incrementan de manera importante.

Con base en todos estos resultados, suponemos que los péptidos denominados 1, A y B son los que tienen una mayor probabilidad de estar en el sitio de la IgE que interactúa con el receptor celular, por ser los péptidos que presentan un porcentaje de disminución mayor a su grado de iodación.

Ahora bien, no puede descartarse la posibilidad de que los péptidos 2, 5 y E, estén también interactuando con una pequeña parte de su secuencia o a que se encuentren cerca del sitio de la IgE que interactúa con el receptor celular, dada su disminución en el grado de iodación.

Con respecto de los péptidos que aumentan su grado de iodación (6, B y C), suponemos que dicho aumento puede ser debido a que la interacción de la IgE con el receptor celular produzca un cambio conformacional parcial o total en la IgE que permitiera que estos péptidos quedaran más expuestos a la marca radiactiva.

El inconveniente de esta proposición es que no se puede apoyar en ningún resultado publicado, porque hasta ahora ningún autor ha reportado que se produzca un cambio conformacional en la IgE al interactuar con el receptor celular.

Por el momento, es la única explicación a nuestro alcance.

Otra cosa que nosotros no podemos descartar es la posibilidad de que los péptidos que disminuyen su grado de iodación (1, A y B), tal vez no interaccionen con el receptor

celular y que la disminución observada se deba también a cambios conformacionales en la IgE, que hicieran que estos péptidos quedaran ocultos o protegidos de la iodinación por tales cambios.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Se puede considerar este trabajo como un inicio en la identificación de péptidos involucrados en la unión de la IgE a su receptor celular.

De los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir dos cosas:

1) Que los péptidos que disminuyen de intensidad en las autorradiografías están protegidos de la iodinación porque probablemente son los que interactúan con el receptor celular y

2) Que, con base en trabajos previamente publicados (12, 18 y 28), suponemos que los péptidos que disminuyen su grado de iodinación están en el dominio C_ε3, o muy cercanos a él.

El siguiente paso en la identificación de sitios importantes para la unión de la IgE a su receptor, es demostrar *in vitro* que aquellos péptidos cuyo grado de iodinación disminuye, son capaces de unirse al receptor y de inhibir la unión de la IgE al receptor en células basofílicas leucémicas de rata. Esta fase del trabajo involucraría el aislamiento y purificación en gran escala de dichos péptidos. Si los resultados de esta fase son positivos, se podría seguir a las siguientes fases que sería probarlos en un sistema *in vitro*, que consistiría en la realización de pruebas de Prausnitz-Küstner, y en la secuenciación de dichos péptidos para localizar exactamente de qué región de Fc_ε provienen.

En caso de que las pruebas *in vivo* sean positivas y

conociendo el, o los sitios de donde provienen las secuencias, se podría proceder a sintetizar péptidos que las contengan para probarlas en los sistemas mencionados anteriormente.

La ventaja que ofrece la ruta que se inició en esta tesis para resolver el problema del sitio de interacción de la IgE con su receptor celular, sobre las otras formas que se hicieron o se están realizando actualmente (ver Introducción), es que se pueden conocer directamente el, o los sitios de interacción, aunque estos estén separados por secuencias de residuos de aminoácidos que no interactúen. Por ejemplo, que el sitio de interacción estuviera formado por dos secuencias separadas, una en el dominio C₂ y otra en el dominio C₃.

Este camino, aunque significa más trabajo y es de mayor dificultad que otros caminos que tratan de resolver el mismo problema, parece tener mejores posibilidades de dar una respuesta concluyente al mismo.

7 REFERENCIAS.

- 1) Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. 1986. MOLECULAR CELL BIOLOGY. 1a. Scientific American Books Inc. New York, U.S.A. 1081-123.
- 2) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, D.J. 1983. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. 1a. Garland Publishing Inc. New York, U.S.A. 951-1012.
- 3) Fudenberg, H.H., Stites, P.D., Caldwell, L.J. y Wells, V.J. 1978. BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY. 2a. Lange Medical Publications. Los Altos California, U.S.A. 23-39.
- 4) Mygind, N. 1986. ESSENTIAL ALLERGY. 1a. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England. 1-54.
- 5) Stanworth, D.R., Humphrey, H.J., Bennich, H. y Johansson, O.G.S. 1968. INHIBITION OF PRAUSNITZ-KUSTNER REACTION BY PROTEOLYTIC CLAVAGE FRAGMENT OF A HUMAN MYELOMA PROTEIN OF IMMUNOGLOBULIN CLASS E. Lancet. 2: 17-18.
- 6) Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Lee, H.E. BIOLOGICAL FUNCTION OF THE Fc FRAGMENTS OF E MYELOMA PROTEIN. Immunochem. 7: 687-702.
- 7) Ishizaka, K. e Ishizaka, T. 1978. MECHANISMS OF REAGINIC HIPERSENSITIVITY AND IgE ANTIBODIES RESPONSE. Immunol. Rev. 41: 109-48.

8) Fewtrell, C. y Metzger, H. 1980. LARGER OLIGOMERS OF IgE ARE MORE EFFECTIVE THAN DIMERS IN STIMULATING RAT BASOPHILIC LEUKEMIA CELLS. J. Immunol. 125(2): 701-10.

9) Metzger, H., Kinet, P-J., Perez-Montfort, R., Rivnay, B. y Wank, A. 1983. A TETRAMERIC MODEL FOR THE STRUCTURE OF THE MAST CELL RECEPTOR WITH HIGH AFFINITY FOR IgE. Prog. Immunol. V. 493-501.

10) Baniyash, M. y Eshhar, Z. 1984. INHIBITION OF IgE BINDING TO MAST CELLS AND BASOPHILS BY MONOCLONAL ANTIBODIES TO MURINE IgE. Eur. J. Immunol. 14: 799-807.

11) Baniyash, M., Eshhar, Z. y Rivnay, B. 1986. RELATIONSHIPS BETWEEN EPITOPES ON IgE RECOGNIZED BY DEFINED MONOCLONAL ANTIBODIES AND BY THE Fc ϵ RECEPTOR ON BASOPHILS. J. Immunol. 136(2): 588-93.

12) Metzger, H., Alcaraz, G., Holiman, R., Kinet, P-J., Pribluda, V. y Quarto, R. 1986. THE RECEPTOR WITH HIGH AFFINITY FOR IMMUNOGLOBULIN E. Ann. Rev. Immunol. 9: 115-45.

13) Hamburger, N.R. 1975. PEPTIDE INHIBITION OF THE PRAUSNITZ-KUSTNER REACTION. Science. 189: 389-90.

14) Kenten, J., Helm, B., Ishizaka, T., Cattini, P. y Gould, H. 1984. PROPERTIES OF A HUMAN IMMUNOGLOBULIN ϵ -CHAIN FRAGMENT SYNTHESIZED IN Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 2955-59.

15) Liu, T.F., Albrandt, A.K., Bry, G.Ch. e Ishizaka, T. 1984. EXPRESSION OF A BIOLOGICALLY ACTIVE FRAGMENT OF HUMAN IgE ϵ -CHAIN IN *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 5369-73.

16) Kulczycki, Jr. A. y Vallina, V.L. 1981. SPECIFIC BINDING ON NON-GLYCOSYLATED IgE TO Fc ϵ RECEPTOR. Mol. Immunol. 18: 723-31.

17) Geha, S.R., Helm, B. y Gould, H. 1983. INHIBITION OF THE PRAUSNITZ-KÜSTNER REACTION BY AN IMMUNOGLOBULIN ϵ -CHAIN FRAGMENT SYNTHESIZED IN *E. coli*. Nature. 315: 577-78.

18) Coleman, W.J., Helm, A.B., Stanworth, R.D. y Gould, J.H. 1985. INHIBITION OF MAST CELL SENSITIZATION IN VITRO BY A HUMAN IMMUNOGLOBULIN ϵ -CHAIN FRAGMENT SYNTHESIZED IN *Escherichia coli*. Eur. J. Immunol. 15: 966-69.

19) Helm, B., March, P., Vercelli, D., Padlan, E., Gould, H. y Geha, R. 1988. THE MAST CELL BINDING SITE ON HUMAN IMMUNOGLOBULIN E. Nature. 331: 180-83.

20) Dorrington, K.J. y Bennich, H. 1973. THERMALLY INDUCED STRUCTURAL CHANGES IN IMMUNOGLOBULIN E. J. Biol. Chem. 248(24): 8378-84.

21) Dorrington, K.J. y Bennich, H. 1978. STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN HUMAN IMMUNOGLOBULIN E. Immunol. Rev. 41: 3-25.

22) Holowka, D. y Baird, B. 1983. STRUCTURAL STUDIES ON THE MEMBRANE-BOUND IMMUNOGLOBULIN E-RECEPTOR COMPLEX. 1. CHARACTERIZATION OF LARGE PLASMA MEMBRANE VESICLES FROM RAT BASOPHILIC LEUKEMIA CELLS AND INSERTION OF AMPHIPATHIC FLUORESCENT PROBES. Biochem. 22: 3466-74.

23) Holowka, D. y Baird, B. 1983. STRUCTURAL STUDIES ON THE MEMBRANE-BOUND IMMUNOGLOBULIN E-RECEPTOR COMPLEX. 2. MAPPING OF DISTANCES BETWEEN SITES ON IgE AND THE MEMBRANE SURFACE. Biochem. 22: 3475-84.

24) Holowka, D., Conrad, H.D. y Baird, B. 1985. STRUCTURAL MAPPING OF MEMBRANE-BOUND IMMUNOGLOBULIN E-RECEPTOR COMPLEXES: USE OF MONOCLONAL ANTI-IgE ANTIBODIES TO PROBE THE CONFORMATION OF RECEPTOR-BOUND IgE. Biochem. 24: 6260-67.

25) Baird, B. y Holowka, D. 1985. STRUCTURAL MAPPING OF Fc RECEPTOR BOUND IMMUNOGLOBULIN E: PROXIMITY TO THE MEMBRANE SURFACE OF THE ANTIBODY COMBINING SITE AND ANOTHER SITE IN THE Fab SEGMENTS. Biochem. 24: 6252-59.

26) Conrad, D.H., Studer, E., Gervasoni, J. y Mchanakumar, T. 1983. PROPERTIES OF TWO MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE Fc AND Fab REGIONS OF RAT IgE. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 70: 352-60. TOMADO DE LA REFERENCIA 12.

27) Slattery, J., Holowka, D., y Baird, B. 1985. SEGMENTAL FLEXIBILITY OF RECEPTOR-BOUND IMMUNOGLOBULIN E. Biochem. 24:

28) Perez-Montfort, R. y Metzger, H. 1982. PROTEOLYSIS OF SOLUBLE IgE-RECEPTOR COMPLEXES: LOCALIZATION OF SITES ON IgE WHICH INTERACT WITH THE Fc RECEPTOR. Mol. Immunol. 19(9): 1113-25.

29) Prevost, R.R., Rousseaux, J. y Bazin, B. 1987. STUDIES OF THE IgE BINDING SITES TO RAT MAST CELL RECEPTOR WITH PROTEOLYTIC FRAGMENTS AND WITH A MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED AGAINST EPSILON HEAVY CHAIN: EVIDENCE THAT THE COMBINING SITES ARE LOCATED IN THE C₃ DOMAIN. Mol. Immunol. 24(2): 187-96.

30) Ishida, N., Voda, S., Hayashida, H., Miyata, T. y Honyo, T. 1982. THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE MOUSE IMMUNOGLOBULIN EPSILON GENE: COMPARISON WITH THE HUMAN EPSILON GENE SEQUENCE. E.M.B.O. J. 1: 1117-23. TOMADA DE LA REFERENCIA 12.

31) Metzger, H. 1983. THE RECEPTOR ON MAST CELLS AND RELATED CELLS WITH HIGH AFFINITY FOR IgE. Cont. Top. Mol. Immunol. 9: 115-45.

32) Holowka, D. y Metzger, H. 1982. FURTHER CHARACTERIZATION OF THE β -COMPONENT OF THE RECEPTOR FOR IMMUNOGLOBULIN E. Mol. Immunol. 19(2): 219-27.

33) Barsumian, E.L., Isersky, Ch., Petrino, G.M. y Siraganian, P.R. 1981. IgE-INDUCED HISTAMINE RELEASE FROM RAT BASOPHILIC LEUKEMIA CELLS LINES: ISOLATION OF RELEASING AND

NONRELEASING CLONES. Eur. J. Immunol. 11: 317-23.

34) Rivera, J. MANUAL FOR MAINTENANCE OF RAT BASOPHILIC LEUKEMIA CELL LINE IN TISSUE CULTURE. Section on Chemical Immunology Arthritis and Rheumatism Branch. National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases. MANUAL NO PUBLICADO.

35) Kinet, P-J., Alcaraz, G., Leonard, A., Wank, S. y Metzger H. 1985. DISSOCIATION OF THE RECEPTOR FOR IMMUNOGLOBULIN E IN MILD DETERGENTS. Biochem. 24: 4117-24.

36) Tuszynski, G.P., Knight, L., Piperno, J.R. y Walsh, P.N. 1980. A RAPID METOD FOR REMOVAL OF [¹²⁵I] IODIDE FOLLOWING IODINATION OF PROTEIN SOLUTIONS. Anal. Biochem. 106: 118-22.

37) Pacouo, R.A. y Conrad, H.L. 1981. CHARACTERIZATION OF THE IgE RECEPTOR BY TRYPTIC MAPPING. J. Immunol. 127(6): 2208-14.