

14  
Rej<sup>o</sup>



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE  
ANTICUERPOS (IgG1 E IgG4) ENTRE PACIENTES  
ALERGICOS Y SUS CONVIVIENTES CONTRA  
DIFERENTES EXTRACTOS DE  
Dermatophagoides pteronyssinus"**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE :

**QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**FELIPE RAUL DONIS HERNANDEZ**

DIRECTOR: M en C VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON  
ASESOR: DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio comparativo de los niveles de anticuerpos (IgG1 e IgG4)  
entre pacientes alérgicos y sus convivientes contra diferentes  
extractos de Dermatophagoides pteronyssinus.

que presenta el pasante: Felipe Raúl Doris Hernández  
con número de cuenta: 8408865-1 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán, Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Junio de 1996

PRESIDENTE Dr. Marco A. Vena López

VOCAL A.B.P. Antonio Sánchez Ortega

SECRETARIO M. en C. Victor H. Zendejas Eutron

PRIMER SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Ángel Germán Martínez Bosa

**El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología  
Básica del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de  
Ciencias Biológicas del I.P.N. y en el Laboratorio de Inmunología de la  
Sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios  
Superiores "Cuautitlán" de la U.N.A.M.**

## DEDICATORIAS

**A MIS PADRES.** Con todo mi amor, respeto, admiración y gratitud. Por darme la vida y permitirme alcanzar una de mis metas, ser un profesional, así como por mostrarme que todo empieza como un sueño y que para llegar al final, no importan los obstáculos en el camino.

**A MIS HERMANOS.** Por su apoyo total, pues en cada momento que compartimos juntos de alguna manera aprendí de ustedes, además de que me hicieron sentir la unión de nuestra familia para que en los momentos difíciles pudiera salir adelante.

**A MIS SOBRINOS.** Por enseñarme a reír de los problemas, porque con su inocencia logran hacer los momentos más agradables.

**A TI.** Por estar conmigo en todo momento compartiendo derrotas, logros y satisfacciones. Por que la amistad y el amor son sentimientos compartidos.

**A todas las personas** que por las circunstancias reales de su vida no logran alcanzar sus metas, que tienen que dedicarse a una familia o que no tienen un aliciente personal que les permita vivir más libres, con voluntad e ideales propios.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis directores de tesis; M. en C. Victor Manuel Zendejas Bultrón y Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por su valiosa ayuda, amabilidad, tiempo y conocimientos transmitidos en la realización del presente trabajo.**

**Al Dr. Marco Antonio Vega López, M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa, Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega y M. en C. Andrés Romero Rojas, por el interés mostrado en la revisión del escrito, así como por sus asesorías y comentarios que enriquecieron este estudio.**

**A mis compañeros de profesión con quienes logramos conformar un equipo de trabajo, Q.F.B. Carlos Moya Ochoa y Q.F.B. Marco Antonio Martínez Cordero.**

**A mis compañeros de carrera y amigos de profesión. Por hacer los momentos más agradables dentro de las aulas y laboratorios, así como fuera de los centros de estudio.**

**A la facultad y profesores de la misma. Por su valiosa contribución en la formación académica recibida.**

**A todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron.**

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>ii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iii</i>
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
Epidemiología	5
Fisiología de la producción de alergen	8
Alergenos de los ácaros	9
Propiedades enzimáticas de los alergen	11
Extracción, estandarización y caracterización de alergen	12
Respuesta inmune a alergen del ácaro de polvo casero	15
Tratamiento desensibilizante	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO	26
OBJETIVOS	27
II. MATERIAL Y METODOS	28
Esquema general de trabajo	28
Material biológico	31
Selección de pacientes y convivientes	31
Material químico y equipo	33
Preparación de los extractos para los ensayos	34
Extracción de antígenos del cultivo de ácaros del polvo casero	34
Extracción de proteínas del medio de cultivo de ácaros	35
Concentración y diálisis de los extractos	36
Determinación de proteínas por el Método de Lowry	37
Separación de los componentes de los extractos mediante SDS-PAGE	38
Ensayo inmunoenzimático	38
III. RESULTADOS	42
IV. DISCUSION	64
V. CONCLUSIONES	73
VI. BIBLIOGRAFIA	75
VII. APENDICE	85

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
CD4	Expresión del antígeno de diferenciación del grupo 4
CD8	Expresión del antígeno de diferenciación del grupo 8
Der. pl	Alergeno principal de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der. fl	Alergeno principal de <i>Dermatophagoides farinae</i>
D. p.	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
D. f.	<i>Dermatophagoides farinae</i>
ECA	Extracto de cultivo de ácaros
ECO	Extracto comercial de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
EMC	Extracto de medio de cultivo
HLA	Antígeno leucocitario humano
ID	Inmunodifusión
IEF	Inmunolectroforesis
IET	Inmunolectrotransferencia
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
kDa	kilodaltones
KLH	Hemocianina del molusco <i>Megathura crenulata</i>
LAR	Respuesta anafiláctica tardía
NEM	N-metilendiamina
PBS	Regulador salino de fosfatos
PBS-T	Regulador salino de fosfatos con Tween 20 al 0.05%
PHMB	Acido p-hidroximercuribenzóico
PLA2	Fosfolípasa A2
PMSF	p-hidroximetilsulfonilfluoruro
QP	Químicamente puro
RCIE	Radiocoinmunolectroforesis
TD	Tratamiento desensibilizante
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA I. Principales alérgenos de los ácaros y su actividad enzimática.	13
TABLA II. Concentración de proteínas de los extractos utilizados en los ensayos.	43
TABLA III. Características clínicas de los pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante.	44
TABLA IV. Características clínicas de los pacientes alérgicos sin tratamiento desensibilizante.	45
TABLA V. Comparación de la composición proteica de los extractos.	48
TABLA VI. Condiciones que se seleccionaron para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG4 por el método de ELISA.	49
TABLA VII. Resumen de los resultados de la respuesta de anticuerpos IgG1 en sueros de pacientes alérgicos y sus convivientes contra un extracto de cultivo de ácaros, un extracto de medio de cultivo y un extracto comercial "Laboratorios Freeman".	53
TABLA VIII. Resumen de los resultados de la respuesta de anticuerpos IgG4 en sueros de pacientes alérgicos y sus convivientes contra un extracto de cultivo de ácaros, un extracto de medio de cultivo y un extracto comercial "Laboratorios Freeman".	53
TABLA IX. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 (promedio por grupo) hacia un extracto de cultivo de ácaros, un extracto de medio de cultivo y un extracto comercial "Laboratorios Freeman".	60
TABLA X. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG4 (promedio por grupo) hacia un extracto de cultivo de ácaros, un extracto de medio de cultivo y un extracto comercial "Laboratorios Freeman".	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Análisis electroforético donde se compara el corrimiento de los componentes de los diferentes extractos utilizados y Der p1 recombinante.	47
Figura 2. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 (valores individuales) en el grupo de pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante en contra de los tres diferentes extractos.	51
Figura 3. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG4 (valores individuales) en el grupo de pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante en contra de los tres diferentes extractos.	55
Figura 4. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG4 (valores individuales) en el grupo de pacientes alérgicos sin tratamiento desensibilizante en contra de los tres diferentes extractos.	56
Figura 5. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG4 (valores individuales) en el grupo de los convivientes de los pacientes alérgicos en contra de los tres diferentes extractos.	57
Figura 6. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG4 (promedio por grupo) en los pacientes alérgicos con y sin tratamiento y sus convivientes en contra de los diferentes extractos.	62

## RESUMEN

Los padecimientos atópicos son una condición común en muchas partes del mundo, por lo cual han cobrado una gran importancia en la actualidad pues se estima que de un 10-20% de la población general presenta problemas de esta índole. Las reacciones de hipersensibilidad tipo I al *Dermatophagoides spp.* del polvo casero, son las alergias más comunes en la clínica y son la causa más importante de enfermedades tales como rinitis atópica y perenne, asma y dermatitis atópica.

Estudios epidemiológicos realizados en la ciudad de México reportan la presencia de la especie *D. pteronyssinus* tanto en casas de pacientes alérgicos como en la de individuos sanos. Por otra parte entre 60-70% de los pacientes que acuden a los servicios de alergia de los hospitales de la ciudad presentan reacción dérmica positiva a extractos de polvo y/o ácaros.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune humoral de individuos alérgicos con tratamiento desensibilizante y de pacientes no tratados y hacer una comparación de dicha respuesta con algunos de los convivientes de estos pacientes, los cuales, son personas que habitan en el mismo domicilio, tienen características genéticas comunes, están expuestos a los mismos alérgenos, pero no manifiestan síntomas de enfermedad.

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, los convivientes de los pacientes alérgicos no reconocen con IgG1 e IgG4 a los antígenos de los diferentes extractos, lo cual es una respuesta diferente respecto a la de los pacientes con y sin tratamiento que si los reconocen, con una  $p < 0.005$ . Por otra parte, se detecta mayor reconocimiento hacia los antígenos de los diferentes extractos con la subclase IgG1 y en menor grado con IgG4, en relación al número de individuos con respuesta positiva, como en los niveles de anticuerpo. Además, el tratamiento desensibilizante sí modifica la respuesta de anticuerpos IgG4, ya que en el grupo tratado se incrementa a más del doble su respuesta de anticuerpos en comparación al grupo no tratado, con una  $p < 0.005$ . El hecho de que la mayoría de los pacientes alérgicos presenten reconocimiento hacia el extracto de cultivo de ácaros, plantea la posibilidad de su aplicación en el diagnóstico y/o tratamiento de estas enfermedades.

## I. INTRODUCCIÓN

Los padecimientos atópicos han cobrado en la actualidad mayor importancia, se estima que entre un 10-20% de la población general presenta problemas de esta naturaleza, por lo que es necesario un nuevo enfoque en el manejo de dichas enfermedades (Crowle et al, 1988).

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I a ácaros (*Dermatophagoides spp.*) de polvo doméstico, son las alergias más comunes en la clínica. Los alérgenos derivados de estos ácaros han mostrado ser los más frecuentes, afectando principalmente a grupos susceptibles de la población infantil y juvenil, y son la causa más importante de enfermedades alérgicas como asma, dermatitis y rinitis atópica (Bonini et al, 1994).

La atopía es una condición muy común en casi todos los países y puede ser vista en general como una susceptibilidad "no comprometida", caracterizada por la capacidad del individuo para producir altos niveles de anticuerpos IgE e IgG4 y para regular positivamente los procesos inflamatorios. En la atopía los factores ambientales tales como calidad, intensidad, ruta y duración de la exposición al alérgeno pueden ser más relevantes que los factores genéticos en causar una respuesta efectiva a los alérgenos (Bonini et al, 1994).

El polvo de la casa es una mezcla de fibras vegetales y animales, productos de descamación, epidermis del hombre y animales domésticos, y una gran variedad de materias orgánicas, algunas de ellas incluyen proteínas solubles, restos de alimentos, plantas, hongos y bacterias. Cuando estas proteínas son inhaladas, pueden producir fenómenos de hipersensibilidad inmediata en personas susceptibles. Los ácaros de la familia *Pyroglyphidae* del género *Dermatophagoides* viven en íntima asociación con el hombre y son la principal fuente de alérgenos en el polvo de la casa (Cunnigton et al, 1987; Geissler et al, 1986).

Kern (1921) y Cooke (1922) fueron los primeros investigadores que dedicaron su atención a las propiedades alérgicas de los factores caseros, al descubrir casos de asma bronquial condicionados por la sensibilización al polvo casero (Frandkin et al, 1988).

Castellani en 1921, reporta por primera vez varios casos de enfermedades de la piel con complicaciones pulmonares ocasionados por ácaros. También por esas fechas Ston van Leewen describió algún caso de asma bronquial causada por la inhalación de polvo infestado por *Acarus ciro* (Novoa et al, 1975).

Diferentes enfermedades han sido asociadas con la sensibilización a los alérgenos derivados de ácaros de polvo casero, siendo las más importantes, la rinitis perenne, la dermatitis atópica y el asma (Anderson et al, 1989). Para muchos alérgenos, la evidencia más convincente de que la exposición causa la enfermedad, viene de la

asociación temporal entre la exposición al alérgeno y los síntomas; sin embargo, la asociación no es clara en todos los casos (Platts-Mills et al, 1988).

Los ácaros tienen interés médico por ser productores de enfermedades, ser vectores de otras y dar reacciones de hipersensibilidad cutánea o asmática. De estos los géneros involucrados son: *Tyroglyphus*, *Glyciphagus*, *Acarus* y *Dermatophagoides* (Platts-Mills et al, 1989).

En la literatura de la alergología de los años 60, aparecieron una serie de trabajos que indican la importancia de los microácaros en el desarrollo de la sensibilización y las manifestaciones de las reacciones al polvo casero en los pacientes con enfermedades alérgicas y de los órganos del oído, nariz y laringe. Voorhorst et al, (1964); encuentran la presencia de ácaros del género *Dermatophagoides* en el polvo casero y sugiere que son la fuente más importante de antígenos contenidos en el polvo (Frantkin et al, 1988). El registro de reacciones alérgicas surgido en respuesta a la aplicación de un extracto de ácaros cultivados en un medio especial fue realizado hace más de 60 años, Varekam (1925) (Frantkin et al, 1988; Haida et al, 1985).

El papel de los ácaros de la familia *Pyroglyphidae* como la fuente más importante de alérgenos del polvo casero fue establecido en los años 70. Desde aquel tiempo, evidencias para la sensibilización con alérgenos de ácaros en pacientes con asma han sido reportadas en varias partes del mundo. Por consiguiente, se ha progresado en el entendimiento de la forma en la cual los alérgenos contribuyen al desarrollo de

patologías alérgicas. En los últimos años varios alergenos de ácaros se han identificado, caracterizado, purificado y de algunos de ellos se ha clonado su secuencia génica; además, el conocimiento actual de la biología de los ácaros también ha permitido el desarrollo de protocolos para reducir la cantidad de ácaros y alergenos en el polvo casero. Finalmente, es posible medir alergenos de ácaros en el polvo casero con ensayos lo suficientemente sencillos para su uso en la investigación y en la práctica clínica (Platts-Mills et al, 1989).

## EPIDEMIOLOGIA

Desde el descubrimiento de los alergenos del polvo casero alrededor de 1920, hasta el trabajo clásico de Voorhorst, et al (1964), en el cual concluyeron que el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* es el origen de los alergenos del polvo casero. En muchas partes del mundo se ha aceptado la asociación entre los ácaros del polvo y la alergenidad del mismo.

Se ha encontrado que un 10% de la población abierta y más del 90% de los asmáticos, dan reacciones dérmicas usando extractos de cultivos del ácaro *D. pteronyssinus* (Tovey et al, 1981).

Dos géneros de la familia *Pyroglyphidae*, *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, son comunes y predominan en regiones templadas y tropicales del mundo. A su vez, dos especies del género *Dermatophagoides* se reportan como la fuente más importante de

alergenos en el polvo casero, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* (Yamashita et al, 1989).

El *Dermatophagoides* no es la única especie de ácaros que se observa en el polvo casero, pero su proporción constituye el 70% ó más de toda la población de ácaros y según Pepys, Chan y Hargreave (1968); en el 88% de los casos se trata de la especie *pteronyssinus*. Con menos frecuencia se encuentran: *D. farinae*, *D. microceras* y *D. euroglyphus*, en algunas muestras se encuentran cantidades pequeñas de ácaros de otras especies. De acuerdo con datos de la literatura en el polvo casero pueden encontrarse hasta un total de 30 especies de ácaros y en un gramo de polvo su número alcanza varios miles (Frandsen et al, 1988).

Las especies de ácaros, *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, son generalmente las más abundantes en Europa y Sudamérica, de predominancia ligera en Norte América y en algunas partes de Asia. Otra especie identificada, el *D. microceras* fue descrito como una forma morfológica muy similar a *D. farinae*. El *D. microceras* se ha identificado en países como: Gran Bretaña, Holanda, España y Estados Unidos, pero es posible que tenga una distribución más amplia y frecuentemente sea identificado como *D. farinae* (Cunnington et al, 1987).

Estudios en diferentes países han demostrado una alta prevalencia de alergia a ácaros de la familia *Pyroglyphidae* que se encuentran extensamente distribuidos en los hogares; la prevalencia reportada en sujetos con asma es de 45-85% y en sujetos

control de 5-30%. Dichos porcentajes dejan un poco de duda para que la presencia sea considerada como factor de riesgo para el asma, aunque existen casos formales de control y estudios de población que han confirmado la asociación entre los ácaros del polvo, la alergenicidad del mismo y la presencia de alguna patología alérgica (Platts-Mills et al, 1989).

Existen factores ecológicos que son necesarios para permitir el desarrollo de los ácaros: humedad del aire, temperatura, disponibilidad de alimento y actividad de mascotas (Lind et al,1986). Se piensa que los dos primeros son los mas importantes, debido a que el cuerpo del ácaro pierde agua con facilidad y esto influye en la reproducción y en el ciclo de vida. Las condiciones óptimas de crecimiento son una humedad relativa entre el 75-80% y una temperatura entre 25-30°C, lo cual resulta en un incremento de 8 veces en la población de ácaros en una semana (Warner et al, 1974).

Existen 3 factores principales que pueden afectar el nivel de la humedad ambiental: a) el clima, b) la altitud y la producción de vapor de agua de origen mecánico y humano c) la construcción y situación de la casa, donde la humedad en el terreno puede pasar a través de los cimientos a los pisos y a las paredes. Diversos estudios han indicado que al disminuir la humedad se reduce el número de ácaros (Lind et al, 1986).

Existe una buena evidencia de que los niveles de ácaros dentro de los hogares puede cambiar con las variaciones estacionales y tipo de construcción de los hogares y que

estos cambios sean lo suficientemente grandes para modificar el nivel de riesgo. Los ácaros presentan predominancia estacional en los meses de agosto a diciembre (Platts-Mills et al, 1988).

Estudios realizados en la Cd. de México reportan sólo haber encontrado a la especie *D. pteronyssinus*, tanto en las casas de pacientes alérgicos como en la de los no atópicos. Se encontraron en mayor cantidad en los meses más húmedos: de septiembre a noviembre y la población disminuyó hasta casi desaparecer en la época de secas: de febrero a abril (Servín et al, 1979).

Los ácaros del polvo casero son capaces de sobrevivir en amplios límites de temperatura y humedad (Warner et al, 1974). A temperaturas de 15°C los ácaros llegan a enquistarse por más de 100 días, tanto en estado protoninfal como tritoninfal, los adultos llegan a enquistarse 50 días. Por lo tanto no es sorprendente que estén muy adaptados para colonizar nuestras casas (Servín et al, 1979).

## **FISIOLOGÍA DE LA PRODUCCIÓN DE ALERGENOS**

Existen tres formas diferentes por las cuales los ácaros pueden secretar o excretar productos: a) poner huevos, b) secreción de aceites y feromonas y, c) producción de heces que incluye la secreción de Guanina. No existen evidencias comunes de que los huevos contribuyan a los alergenicos; las secreciones de las glándulas laterales no han demostrado ser una fuente de alergenicos y su química necesita estudios posteriores.

Uno de los principales alérgenos, Der p1 es una proteasa probablemente relacionada con la digestión del ácaro, la cual tiene una gran homología con las enzimas de la familia de las cisteína proteasas como la catepsina B y H, y las enzimas vegetales papaína y actidina (Platts-Mills et al, 1989; Stewart et al, 1989).

La guanina es un producto final de la digestión y excreción púrica, la cual puede ser utilizada como un marcador específico de infestación por ácaros. La nutrición de los ácaros y la química de sus heces en diferentes hábitats dentro de una casa podrían ser de utilidad para dilucidar la distribución de posibles alérgenos (Platts-Mills et al, 1989).

#### **ALERGENOS DE LOS ÁCAROS DEL POLVO CASERO**

Las especies de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* son las más intensamente estudiadas y en el presente los principales alérgenos de ambas especies se dividen en varios grupos. (Kauffman et al, 1985; Yamashita et al, 1989).

Los alérgenos del grupo I. de *D. pteronyssinus* (Der p1); de *D. farinae* (Der f1), y de *D. microceras* (Der m1); son glicoproteínas con peso molecular de 24 a 26 kDa. Der p1 es reconocido por más de tres cuartas partes de los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos, representando el 12% de la IgE sérica total. Está presente en una gran proporción, en la proteína de un extracto crudo del ácaro (10-20%). Más del 95% del Der p1 es secretado o excretado en las heces, estas partículas tiene un diámetro entre

10-40  $\mu\text{m}$  y su tamaño es proporcional al ácaro, el cual varía en longitud de 170-350  $\mu\text{m}$  (Tovey et al, 1981). La mayor parte del alérgeno de un cultivo total es eluido muy rápidamente en solución salina al cabo de una hora (Kauffman et al, 1985). Mientras que el Der pI del ácaro es eluido muy lentamente. El Der pI y Der fI, son estructuralmente muy similares en su secuencia de aminoácidos, termolábiles 10 minutos a 100°C (Ford et al, 1985), con pI de 4.7 a 7.4, sensibles a condiciones de acidez o alcalinidad extremas, (pH=2 y 12); y los tratamientos en condiciones desnaturizantes (guanidina 6M, urea 6M) disminuyen de 10 a 100 veces la unión a anticuerpos IgE (Heymman et al, 1989; O'Hehir et al, 1989; Votero de la Cima et al, 1989).

Los alérgenos del grupo II. Der pII y Der fII, son proteínas con peso molecular de 12.5 a 15 kDa, son estructuralmente homólogas, con pI heterogéneo, similares en su secuencia de aminoácidos (difieren solamente en 4 de los primeros 35 aminoácidos de la secuencia amino terminal), son estables a temperatura ambiente y a condiciones desnaturizantes (guanidina 6M) y se encuentran relativamente más concentrados en el cuerpo del ácaro (Heymman et al, 1989; Platts-Mills et al, 1989; Stewart et al, 1989).

Los alérgenos del grupo II no están relacionados estructural y antigénicamente con los alérgenos del grupo I, ni con los del grupo III de 29 kDa de PM (Platts-Mills et al, 1989). La reducción y la alquilación destruyen los sitios de unión en ambos grupos de alérgenos generándose formas de mayor peso molecular (28-31 kDa), fenómeno también observable al utilizar 2-mercaptoetanol (Lombardero et al, 1990).

Un tercer grupo de alergenos poco estudiado de *Dermatophagoides farinae*, el Der fIII de 29 kDa de peso molecular, fue purificado por repetidas filtraciones en gel y esta proteína no está relacionada con el Der fI ni con Der fII (Heymman et al, 1989). Aunque física y químicamente estos alergenos son similares, manifiestan diferentes propiedades inmunoquímicas cuando son identificados con anticuerpos IgE humanos, anticuerpos policlonales de conejo y/o anticuerpos monoclonales de ratón (Cunnington et al, 1987).

La localización y características de los alergenos determinan el tipo de respuesta que el paciente está generando en contra de los mismos. La concentración de anticuerpos IgE contra el cuerpo del ácaro (Der pII) fue más alta en aquellos pacientes con eczema, que en aquellos que padecen sólo asma, aunque la concentración de anticuerpos IgE contra el alergeno fecal (Der pI) no fue significativamente diferente en ambos grupos. Alergenos menores del cuerpo del ácaro son también importantes en pacientes con eczema (Carswell et al, 1986; Thompson et al, 1988).

#### **PROPIEDADES ENZIMÁTICAS DE LOS PRINCIPALES ALERGENOS DE LOS ÁCAROS**

Se han identificado actividades enzimáticas en extractos de polvo casero ricos en materia fecal; actividades de esterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, lipasa, leucinaminopeptidasa, fosfamidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y carboxipeptidasa B. Los

extractos de cuerpos de ácaros contienen menos glicosidasas activas. A las dos primeras enzimas no se les ha encontrado actividad alérgica, para las demás faltan por realizarse estudios enfocados a fenómenos de hipersensibilidad tipo I. A cinco de los siete principales alérgenos de los ácaros se les ha encontrado homología con enzimas. Ver tabla I (Stewart et al, 1985; Stewart et al, 1992).

La actividad enzimática de un alérgeno puede ser una propiedad biológica requerida para que induzca una respuesta alérgica persistente. Los mecanismos propuestos pueden ser: aumentando la permeabilidad del epitelio bronquial por digestión enzimática, afectando la migración celular, actuando directamente sobre la transducción de señales en las células (Collof et al, 1992 y Thomas et al, 1993), o induciendo la proteólisis de anticuerpos IgG (Collof et al, 1992). El hecho de que algunos alérgenos son enzimas, que en el caso del ácaro al ser secretadas por la digestión y al ser incorporadas en las heces, se facilita su diseminación y se favorece su llegada a la mucosa respiratoria en altas concentraciones (Thomas et al, 1993).

## **EXTRACCIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALERGENOS**

El punto más importante en la extracción de los alérgenos, es encontrar un procedimiento que dé una óptima actividad alérgica. Además, este procedimiento debe proporcionar un extracto que sea representativo dependiendo del material utilizado en el estudio de su composición. El tiempo de extracción óptimo debe ser aquel en el que se evite una posible degradación proteolítica (Geissler et al, 1986).

**TABLA I. PRINCIPALES ALERGENOS DE LOS ÁCAROS Y SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

Alergeno	Peso Molecular (kDa)	Función	Frecuencia de unión de IgE (% de sueros)	Secuencia obtenida por
Der p I	25	Cisteína proteasa	80-100	cDNA
Der p II	14	Probablemente lisozima	80-100	cDNA
Der p III	28/30	Serina proteasa	70-100	N-terminal
Der p IV	56-60	Amilasa	40	N-terminal
Der p V	15	¿ ?	40	cDNA
Der p VI	25	Quimiotripsina	40	N-terminal
Der p VII	22, 26 y 28	¿ ?	40	cDNA provisional

Tomado de Thomas, W.R., 1993.

Aunque hay una aceptación general de la necesidad para la estandarización de extractos de alérgenos utilizados en el diagnóstico o en el tratamiento desensibilizante (TD), tanto para los alergólogos, fabricantes, investigadores y autoridades de control nacional, los procedimientos para efectuarla están lejos de ser los ideales (Ford et al, 1985; van der Zee et al, 1986). Hay dos principales razones para ello, en primer lugar pocos alérgenos de las muchas fuentes sensibilizantes se han identificado, aislado y caracterizado. En segundo lugar, es necesario una mejoría en los métodos utilizados para proporcionar estimaciones de la potencia biológica y para la obtención de datos cuantitativos y cualitativos de los extractos de alérgenos (Tovey et al, 1984). El requerimiento principal para una adecuada estandarización de extractos de alérgenos, es aquel extracto que pueda contener todos los alérgenos producidos por la fuente de origen (Tovey et al, 1987).

En general, la mayoría de los componentes de un extracto de cultivo y de los estándares internacionales que son reconocidos por IgE, se sitúan en la región de 14 a 35 kDa, mientras que extractos de cuerpos de ácaros y un extracto de cultivo total contiene más componentes de unión a IgE de alto peso molecular. Las diferencias en el número y distribución de alérgenos identificados en extractos se debe a la utilización de varias técnicas para su detección, además de que la actividad alérgica de los extractos es debida a que existe un número de distintos alérgenos y no a un solo alérgeno principal (Krilis et al, 1984; Tovey et al, 1987).

La caracterización de extractos alérgicos con respecto a su reactividad a IgE específica se ha facilitado con el uso de antisueros. El método más utilizado para la detección de proteínas que unen IgE en extractos alérgicos es la radiocontrainmunolectroforesis (RCIE), en la cual los alérgenos son fijados por precipitación con anticuerpos de conejo, seguido de una incubación con sueros de pacientes y su posterior autorradiografía. Otra técnica útil y conveniente para la caracterización de antígenos y anticuerpos es la inmunodetección en un soporte como la nitrocelulosa. La inmunodetección de los componentes del extracto de ácaros separados por electroforesis en geles de poliacrilamida- duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras, seguido de una prueba con diferentes sueros de individuos alérgicos al ácaro del polvo casero, resulta en la resolución de 17 y 14 componentes que son reconocidos por IgE respectivamente (Anderson et al, 1989; Bengtsson et al, 1986; Bruynzeel et al, 1988).

Bilioti y cols, usando inmunodifusión (ID) e inmunolectroforesis (IEF) encontraron fuertes reacciones a antígenos de ácaro y a componentes del medio de cultivo con un antisuero de conejo anti-ácaro, lo que indica que dicho antisuero también reacciona fuertemente con los componentes del medio (Lind et al, 1979).

### **RESPUESTA INMUNE A ALERGENOS DE ÁCARO DEL POLVO CASERO**

La sensibilización a alérgenos de ácaros del polvo doméstico en muchas partes del mundo está comunmente asociada a asma y rinitis. Hasta hace poco tiempo la llamada

alergia atópica en el hombre con sus diferentes expresiones clínicas, era considerada un tipo particular de manifestación de hipersensibilidad que liberaba mediadores químicos, siendo responsable de estas patologías alérgicas ciertos anticuerpos termolábiles, no precipitantes y solo con capacidad de transmitirse pasivamente (Aalberse et al, 1983; Platts-Mills et al, 1988).

Los estudios de la respuesta inmune hacia alergenios de ácaros son de interés al examinar los factores que pueden influir en las diferencias de producción de anticuerpos IgE y pueden incluir: 1) diferencias en las propiedades estructurales de cada alergenio, 2) diferencias genéticas o inmunorreguladoras de los individuos, y 3) exposición a diferentes concentraciones de cada alergenio (Heymman et al, 1989).

En el humano, debido a una exposición natural existe una sensibilización temprana a los alergenios inhalados del *D. pteronyssinus*. Esta respuesta está restringida a la subclase IgG1, cuyos niveles, después de una caída inicial debida a la pérdida progresiva de los anticuerpos maternos, observa un repunte a los 3 meses de edad y siendo más significativo el aumento a los 12 meses. No se observa reconocimiento por anticuerpos IgG4 (Mariani et al, 1992), lo cual concuerda con otros estudios en humanos donde las respuestas de IgG4 contra el antígeno KLH aparecen tardíamente en una respuesta secundaria (6 meses) al mismo tiempo cuando los anticuerpos IgG1 empiezan a decaer (Bird et al, 1990).

Un estudio de la hipersensibilidad al ácaro *Dermatophagoides* realizada en 63 pacientes con asma demostró que el 68% de los pacientes daban una reacción dérmica positiva. Un 38% presentó anticuerpos IgE séricos específicos al ácaro, 63% presentó anticuerpos IgG totales específicos y un 10% de los pacientes presentó anticuerpos IgG4 séricos específicos al ácaro. En contraste, estas pruebas resultaron positivas en el 10-11% de sujetos no alérgicos. El 41% de los pacientes presentó reacción dérmica positiva y anticuerpos en suero. Un 24% presentó altos títulos de IgG total en ausencia de una prueba dérmica positiva, un 27% presentó una prueba dérmica positiva y bajos títulos de IgG y sólo un 8% presentó negativas las reacciones dérmicas y ausencia de anticuerpos en suero. En total el 94% del grupo asmático exhibió una respuesta inmune positiva al menos a una de las pruebas específicas a los ácaros del polvo (Soliman et al, 1986).

Al comparar una población de asmáticos adultos alérgicos a el *D. pteronyssinus* en Papua, Nueva Guinea; donde esta enfermedad está confinada a los adultos a diferencia de la que se presenta en climas templados donde aparece tempranamente en la niñez, se observó que sus niveles séricos de IgE, IgG e IgA son significativamente más altos que en los no asmáticos, condición semejante a la encontrada en poblaciones caucásicas (Stewart et al, 1988).

Tratando de determinar cuales eran los alérgenos principales de los ácaros, los primeros estudios se enfocaron a los alérgenos de bajo peso molecular, Der pI y Der pII (Chapman et al, 1980 y Thompson et al, 1988). Posteriormente, estudiando la

respuesta de anticuerpos de sujetos con asma y rinitis hacia 6 diferentes fracciones de *D. pteronysinnus* (190, 95, 53, 32, 25 y 15 kDa) se encontró una respuesta de anticuerpos IgE muy parecida en ambos grupos hacia todas las fracciones y esta respuesta siempre fue significativamente mayor con respecto a la de los no atópicos. En cambio, en las respuestas de anticuerpos IgG se encontró; primero, que los pacientes con asma presentaron valores más elevados en comparación con los de rinitis y segundo, que el reconocimiento es mayor hacia las fracciones de alto peso molecular (190 y 95 kDa) que con respecto a los de bajo peso molecular (32, 25 y 15 kDa) tanto en los pacientes con asma, como con rinitis, aunque la diferencia sólo es estadísticamente significativa para estos últimos. Las fracciones de 190 y 15 kDa presentaron el mayor reconocimiento de anticuerpos IgG. Esto indica que tanto fracciones de alto (190 y 95 kDa) y de bajo (14 kDa) peso molecular pueden ser los alérgenos principales del antígeno de *D. pteronysinnus* (Saito et al, 1992).

Otros estudios con pacientes asmáticos y no atópicos mostraron que aunque ambos grupos reconocen con IgG sérica a los antígenos de *D. pteronysinnus*, sólo el reconocimiento hacia la proteína Der pII por los asmáticos hace una diferencia en cuanto al porcentaje de sueros que reconocen a esta proteína, en relación con los no atópicos (72 y 20% respectivamente). Sin embargo, el reconocimiento hacia proteínas de alto peso molecular (95 kDa) (77 y 50%), no es estadísticamente significativo (Oshika et al, 1992).

En las etapas finales de la vida, la concentración de anticuerpos IgE es significativamente más baja en gente de edad (>70 años) que en gente joven (<40 años); esto es más pronunciado en hombres que en mujeres y las respuestas dérmicas son significativamente de menor intensidad. Aunque el trabajo no fue realizado en individuos atópicos sugiere una desensibilización natural asociada con la edad o bien incapacidad de respuesta del sistema inmune ocasionada por el envejecimiento (Delespesse et al, 1977).

El papel de los linfocitos T en la inducción y regulación de las enfermedades respiratorias alérgicas no está completamente definido. El reconocimiento de los linfocitos T a alérgenos del ácaro ha conducido a un análisis de los alérgenos y la regulación de la inmunidad por dichos linfocitos. Dicho reconocimiento se da de manera estricta y está restringida por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) (O'Héhir et al, 1989).

Estas observaciones ponen de manifiesto la posibilidad de una diferencia étnica en el reconocimiento de los alérgenos por linfocitos T ya que existe una diversidad extrema en la composición del HLA, lo que da como resultado que al comparar los datos de reconocimiento de los linfocitos T a ácaros en diferentes grupos étnicos se tengan individuos atópicos e individuos no atópicos, es decir, que tengan o no predisposición genética para el desarrollo de alergia al polvo casero (Kimura et al, 1990).

Se ha encontrado que clonas de células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica específicas a antígenos de *D. pteronysinnus* de un donador alérgico, son capaces de producir IL-4 al ser estimuladas con este antígeno; a diferencia de células T de un sujeto no atópico. El reconocimiento está restringido por genes HLA-DR (Wierenga et al, 1990); otros estudios también han mostrado restricción por estos mismos genes al bloquear la estimulación de clonas de células T con un anticuerpo anti-HLA-DR. Además, se observó una mayor proliferación hacia fracciones de 9-13 kDa y en menor grado hacia fracciones de 26, 29 y 42 kDa, las cuales coinciden con el mayor reconocimiento por parte de anticuerpos IgE hacia los antígenos de *D. Farinae* (O'Hehir et al, 1989).

Células T de donadores atópicos con rinitis mostraron una fuerte respuesta proliferativa hacia proteínas de alto peso molecular (95 kDa). Los linfocitos de un grupo de sujetos sin síntomas, pero con una prueba dérmica positiva a *D. pteronysinnus* también presentaron proliferación hacia proteínas entre 45-190 kDa de P.M; a diferencia de sujetos sanos con prueba dérmica negativa al Dp. Muchos pacientes atópicos presentaron una respuesta proliferativa máxima a la fracción de 95 kDa, pero no a Der pI o Der pII, lo cual coincide con la capacidad para inducir la producción de IL-2. La fracción de 7.5-20 kDa, comparable a Der pII tiene la capacidad de inducir la IL-2, pero no así la proliferación. Lo cual sugiere que la capacidad de proliferación e inducción de citocinas no son necesariamente paralelas (Kimura et al, 1990).

La participación de células CD8+ en la regulación de IgE es apoyada por estudios con la lectina ricina que actúa eliminando preferentemente a células CD8+, lo cual conduce a una elevación en la producción de anticuerpos IgE de hasta 1000 veces y a una menor capacidad de las células T de bazo para producir IFN- $\gamma$ , cuando es administrada simultáneamente con la fosfolipasa A2 (PLA2) (Kemeny et al, 1993).

## TRATAMIENTO DESENSIBILIZANTE

La desensibilización o tratamiento desensibilizante (TD) de individuos alérgicos es realizada principalmente por la inducción de anticuerpos de bloqueo de la clase IgG y dá buenos resultados en la mayoría de los casos. Es un hecho bien conocido que alergenos asociados a adyuvante incompleto de Freund (AIF) inducen la síntesis de IgG (Votero de la Cima et al, 1989).

En la actualidad se conoce que los pacientes alérgicos producen anticuerpos del isotipo IgE, IgG e IgA contra los alergenos del *Dermatophagoides spp.* Además, se han realizado estudios con respecto a las subclases de IgG ya que también participan en el reconocimiento de los alergenos y su concentración se modifica en los pacientes sujetos a TD.

El TD aplicado a los pacientes alérgicos tiene una eficacia de aproximadamente 70%, con un cierto porcentaje de recidivas. No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales ocurre la desensibilización, lo que si es evidente es que presentan una

disminución en su respuesta inflamatoria frente a los alérgenos. El TD parece funcionar en general para alergias producidas por aeroalérgenos y picaduras de insectos, aunque no se conoce porque no parece funcionar para alergias alimentarias (Creticos et al, 1989)

El TD en pacientes alérgicos consiste en aplicar subcutáneamente de 2-3 dosis semanales en forma creciente de los mismos alérgenos que por vías respiratorias causan problemas. En el caso de presentarse efectos adversos a una dosis dada, se debe regresar a la dosis inmediata anterior, al término de la cual se vuelve a intentar con la dosis que causa estos efectos (Creticos et al, 1989).

En pacientes con rinitis, uno de los cambios observados con el TD es un significativo aumento en la IgG total e IgG1 específica a Dp y Df durante los primeros 3 meses (Mc Hugh et al, 1990 y Einarson et al, 1992), alcanzando un valor de meseta a los 6 meses, seguido de una ligera disminución durante la terapia de mantenimiento (Nakagawa et al, 1987, Einarson et al, 1992). Durante la fase temprana del tratamiento la concentración de anticuerpos IgG1 e IgG4 se eleva, aunque domina el incremento de los anticuerpos IgG4 (Einarsson et al, 1992). Los niveles aumentados de anticuerpos IgG4 correlacionaron bien en el grupo de pacientes en los cuales hubo una mejoría clínica y contrariamente aquellos con bajos niveles de IgG4 correlacionaron con una falla en la misma. Es posible que un nivel de umbral para los anticuerpos IgG4 sea necesario para inducir mejoría y este se alcance al tercer mes de tratamiento. Los valores de anticuerpos IgE se incrementan significativamente a los tres meses en

comparación con un grupo de pacientes no tratados y luego declinan gradualmente hasta los 12 meses, con niveles semejantes a los del pre-tratamiento (Mc Hugh et al, 1990; Nakagawa et al, 1987).

Midiendo el número de células secretoras de anticuerpos de sangre periférica hacia los alérgenos Dp y Df, se encontró un incremento significativo de células que producen IgM e IgA después del TD (Sparholt et al, 1992).

Pacientes con asma sujetos a TD presentaron un marcado aumento de anticuerpos IgG4 en comparación con IgG1 (Whan et al, 1988; Nakagawa et al, 1983). Es interesante notar que los pacientes asmáticos con mejoría clínica presentaron una proporción más alta de la relación IgG4/IgG1, que aquellos que no respondieron al TD (Nakagawa et al, 1987).

En una revisión de los estudios de pacientes con asma, se encontró que en casi todos estos trabajos (11/12) no se observa una disminución significativa en los niveles de anticuerpos IgE (Ohman et al, 1989). Sólo se encontraron reducciones modestas de IgE, después de 2 años del curso del TD (Whan et al, 1988). Sin embargo, los cambios observados generalmente no se asociaron con una disminución en la respuesta en las vías respiratorias o en piel, lo cual generalmente se observa entre los meses 3-12 del curso del TD (Whan et al, 1988; Ohman et al, 1989).

Pacientes asmáticos sometidos a una prueba de desafío bronquial, presentaron una respuesta bimodal, la cual consistió en una respuesta asmática inmediata y algunas horas después una respuesta anafiláctica tardía (LAR). Actualmente se asume que esta respuesta asmática tardía es producida por una reacción localizada de tipo III en la mucosa bronquial involucrando células inflamatorias como eosinófilos, macrófagos y neutrófilos, los cuales son activados por complejos inmunes conteniendo anticuerpos IgG1. La frecuencia y magnitud de la LAR después de las pruebas de desafío bronquial disminuyen después del TD. Por lo tanto, considerando que los anticuerpos IgG1 están involucrados en la LAR y que los Ac IgG4 se vuelven más predominantes en la fase tardía de el TD, es razonable especular que los cambios en la proporción entre las cantidades de IgG4 e IgG1 pueden afectar la disminución de la LAR (Nakagawa et al, 1987).

El TD también tiene un efecto inhibitorio, aunque no significativo, en la respuesta proliferativa de linfocitos específicos a Dp y en la respuesta a IL-2 de células proliferantes, lo cual también puede ser responsable para el efecto anti-inflamatorio al suprimir la LAR (Van Bever et al, 1993).

Identificando por IET los cambios provocados por el TD hacia proteínas específicas, se identificaron por electroforesis en PAGE-SDS más de 50 proteínas, aunque sólo 8 de ellas son reconocidas por anticuerpos IgE e IgG4 (110, 60, 55, 43, 33, 27, 16 y 14 kDa). Las bandas que reaccionaron con IgG4 son similares a aquellas que reaccionaron con IgE, excepto para una proteína de 27 kDa que no es reconocida por

IgG4. Los anticuerpos IgG4, particularmente aquellos contra las proteínas de 110 y 16 kDa se incrementan en el 72% de los pacientes asmáticos después de 6 meses de TD. Sin embargo, con los anticuerpos IgE no existió un patrón constante, pues estos pueden aumentar, disminuir o permanecer sin cambios. Clínicamente, aquellos pacientes que presentaron un aumento continuo en anticuerpos IgG4 a las proteínas de 110, 55 y 16 kDa y simultáneamente una disminución de anticuerpos IgE a esos alérgenos tienen las mejores respuestas terapéuticas. Aquellos pacientes que no presentaron cambio en anticuerpos IgE, IgG4 e IgG tienen una ligera mejoría. El único paciente que no presentó cambios en anticuerpos IgG4, pero además presentó un aumento de anticuerpos IgE, tuvo la respuesta clínica más pobre (Keh et al, 1991).

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

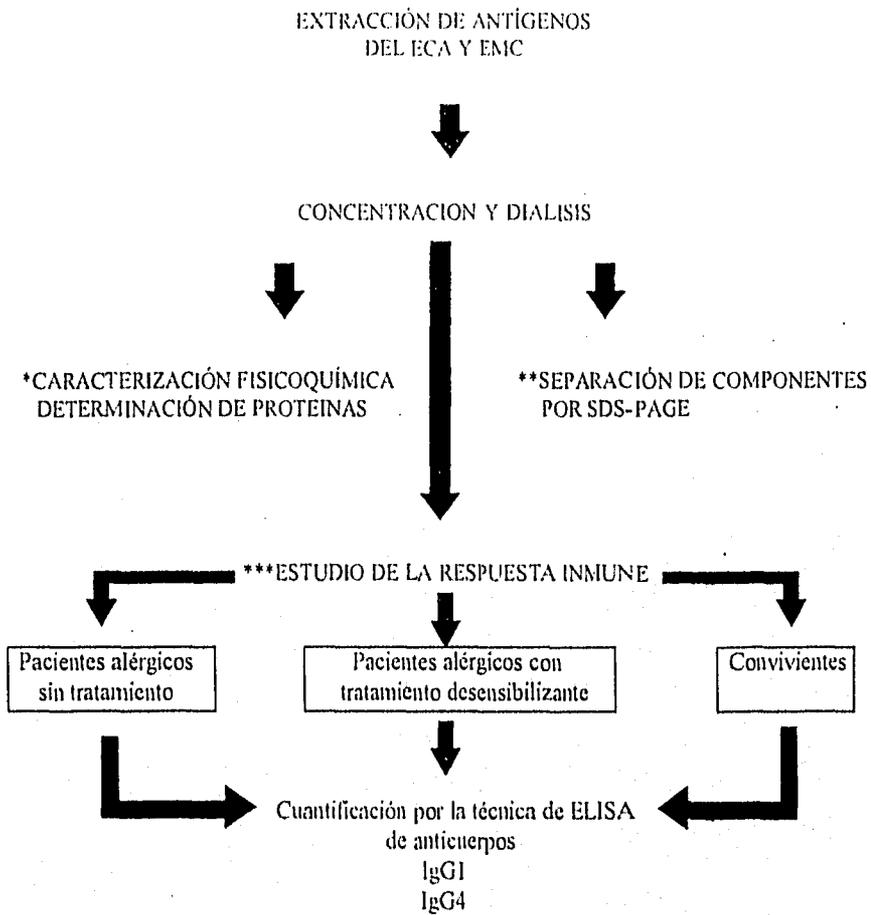
Si los convivientes de los pacientes alérgicos cohabitan en el mismo medio ambiente junto con los pacientes alérgicos, existirá entonces un tipo de respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG4 diferencial entre ambos grupos, que explique la manifestación o no de síntomas en dichos padecimientos.,

## OBJETIVOS

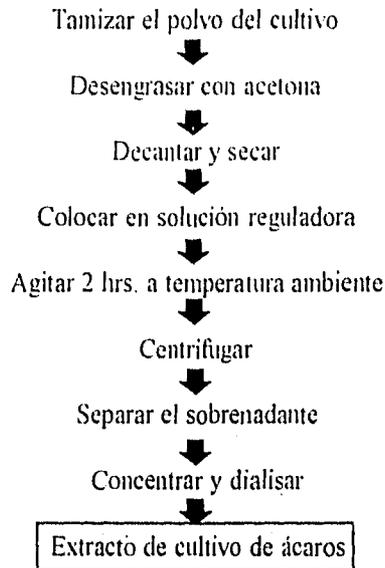
1. Obtener extractos de cultivo de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) del polvo casero y de medio de cultivo de los mismos.
2. Estandarizar las condiciones del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG4.
3. Conocer si los convivientes de los pacientes alérgicos producen o no anticuerpos que reconozcan antígenos de los extractos analizados.
4. Determinar el grado de reconocimiento de las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos hacia antígenos de los mismos extractos.
5. Estudiar, con la misma técnica, el efecto del tratamiento desensibilizante en pacientes alérgicos en relación a la producción de anticuerpos IgG1 e IgG4; así como la respuesta de estas subclases en individuos sin antecedentes de tratamiento.
6. Comparar la respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG4 en los diferentes grupos de estudio en contra de un extracto de cultivo de ácaros, un extracto de componentes de medio de cultivo y un extracto comercial de *D. pteronyssinus*.

## II. MATERIAL Y METODOS

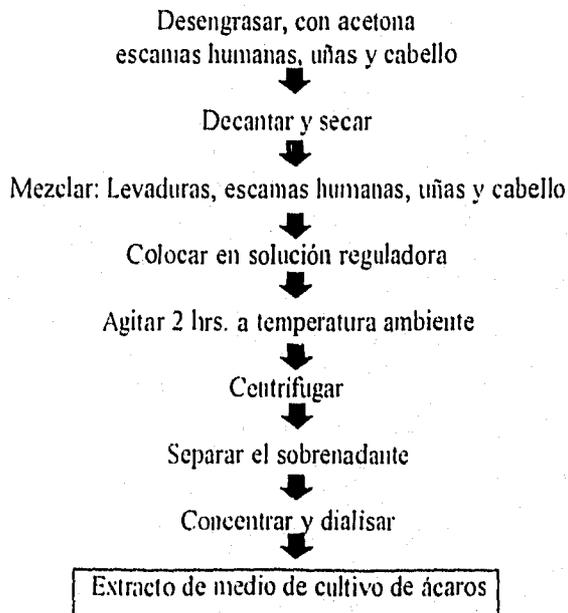
### ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS DEL CULTIVO DE ACAROS



## EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS DE MEDIO DE CULTIVO DE ACAROS



**INMUNOENSAYO ENZIMATICO  
"ELISA INDIRECTO"**

Sensibilizar la placa con antígeno (\*\*)

↓  
Incubar y lavar

↓  
Bloquear con leche descremada

↓  
Incubar y lavar

↓  
Agregar el suero (‡‡)

↓  
Incubar y lavar

↓  
Agregar el Mab de ratón (++)

↓  
Incubar y lavar

↓  
Agregar el conjugado

↓  
Incubar y lavar

↓  
Colocar el sustrato

↓  
Detener la reacción

↓  
Leer a 492 nm

**\*\*ANTÍGENOS**

EXTRACTO DE CULTIVO DE ACAROS (ECA)  
EXTRACTO DE MEDIO DE CULTIVO (EMC)  
EXTRACTO COMERCIAL DE LAB. FREEMAN (ECO)

**‡‡SUEROS**

PACIENTES ALÉRGICOS CON TRATAMIENTO  
PACIENTES ALÉRGICOS SIN TRATAMIENTO  
CONVIVIENTES DE PACIENTES ALÉRGICOS

**++ANTICUERPO MONOCLONAL DE RATON (Mab)**

anti-IgG1 Humana  
anti-IgG4 Humana

## **A) MATERIAL**

### **I) MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **Selección de pacientes y sus convivientes**

La selección de los pacientes alérgicos con y sin tratamiento desensibilizante y la realización de las pruebas dérmicas con la técnica de escarificación se realizaron en el Servicio de Alergia del Hospital Juárez de México, a cargo del Jefe de Servicio Dr. Daniel Aguilar Angeles y por el Jefe de Laboratorio Q.F.B. Misael González Ibarra.

**Criterios de inclusión:** Presentar manifestaciones clínicas de algún padecimiento alérgico y haber presentado tres cruces o más de respuesta dérmica, utilizando un extracto comercial de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Laboratorios Freeman, México).

**Criterios de exclusión:** Para la toma de muestra se les solicito a los pacientes evitar la administración de cualquier medicamento en las 48 horas previas. No fueron incluidos pacientes con medicación de esteroides, así como convivientes que presentaron síntomas alérgicos.

#### **a) Sueros humanos**

**Convivientes (20).** En la selección se prefirió familiares de primer y segundo grado. Solo en pocos casos se aceptó como convivientes a personas no consanguíneas a falta de algún familiar, pero en todos los casos tenían que vivir en el mismo domicilio del paciente. El grupo se conformó con 6 hombres y 14 mujeres, 2 niños y 18 adultos. En 16 casos se trató de cualquiera de los dos progenitores, en 2 fueron hermanos y en otros 2 se trató del cónyuge.

**Pacientes alérgicos sin tratamiento desensibilizante (25).** El grupo se integró con 9 hombres y 16 mujeres, 12 niños, 2 adolescentes, 10 adultos a uno no se determinó la edad. Las entidades clínicas diagnosticadas fueron: 3 presentaron sólo rinitis alérgica, 16 asociación asma-rinitis y 4 con asma-rinitis-eczema.

**Pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante (24).** El grupo se conformó con 11 hombres y 13 mujeres, 10 niños, 2 adolescentes, 12 adultos. Las entidades clínicas diagnosticadas fueron: 4 presentaban sólo asma, 4 sólo rinitis, 7 la asociación asma-rinitis, 1 la asociación rinitis-dermatitis y tres pacientes la triple asociación asma-rinitis-eczema.

#### **b) Anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón anti-IgG humana**

Inmunoglobulina G (IgG) de ratón anti-IgG1 y anti-IgG4 humana marca SIGMA.

**c) Conjugado**

Inmunoglobulina (IgG) de cabra anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa marca SIGMA.

**d) Extractos**

Extracto de cultivo de ácaros de polvo de casas de pacientes alérgicos.

Extracto de medio de cultivo de ácaros.

Extracto comercial de *Dermatophagoides pteronyssinus* de Laboratorios Freeman, México.

**II. MATERIAL QUÍMICO Y EQUIPO**

a) Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE en condiciones no reductoras. (Apendice I)

b) Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de ELISA. (Apendice I)

Todos los reactivos se obtuvieron de SIGMA CHEM. Co. y todos los solventes de la marca BAKER S.A.

## **B) METODOS**

### **I. Preparación de los extractos para los ensayos.**

#### **a) Extracción de antígenos del cultivo de ácaros del polvo casero.**

1. Se tamizaron porciones de cultivos totales de ácaros del polvo casero mediante el uso de tamices de diferente tamaño.
2. Se pesó una muestra de 10 g de polvo tamizado.
3. Se desengrasó el polvo fino con 50 ml de acetona QP manteniendo en agitación continua durante 5 minutos, transcurrido el tiempo la acetona se eliminó por decantación. El procedimiento se realizó en dos ocasiones para eliminar la mayor cantidad posible de lípidos de la muestra.
4. Se extendió la muestra y se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar la acetona residual.
5. A la muestra se le adicionó 100 ml de solución reguladora de boratos pH 8.5, con inhibidores de proteasas (95 ml de regulador + 5 ml de solución de inhibidores de

proteasas, ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB) a una concentración de 146 µg/ml, N-etilmaleimida (NEM) a 50 µg/ml y fluoruro de p-metilsulfóxido (PMSF) a 50 µg/ml)

6. Se mantuvo en agitación durante 2 hrs a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se denominó ECA.

**b) Extracción de proteínas del medio de cultivo de ácaros.**

1. Se desengrasaron escamas humanas, uñas y cabello de un individuo normal con 10 ml de acetona QP manteniendo la mezcla en agitación continua durante 5 minutos, transcurrido el tiempo la acetona se eliminó por decantación. El procedimiento se realizó en dos ocasiones para eliminar la mayor cantidad posible de lípidos de la muestra.
2. La mezcla se extendió y se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar toda la acetona residual.

3. Se pesaron 2 g de escamas y uñas humanas + 1 g de cabello + 12 g de levaduras de cerveza (*Sacharomyces cerevisiae*).
4. A la muestra se le adicionó 100 ml de solución reguladora de boratos pH 8.5, con inhibidores de proteasas (95 ml de regulador + 5 ml de solución de inhibidores de proteasas, ácido p-hidroximercuribenzóico (PHMB) a una concentración de 146 µg/ml, N-etilmaleimida (NEM) a 50 µg/ml y fluoruro de p-metilsulfóxido (PMSF) a 50 µg/ml).
5. Se mantuvo en agitación durante 2 hrs a temperatura ambiente transcurrido el tiempo se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se denominó EMC.

## **II. Concentración y diálisis de los extractos ECA y EMC.**

1. Se cortaron las bolsas de diálisis (10 kDa de tamaño de corte de SIGMA, Chem Co.) e la longitud deseada y se hirvieron 10 min en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$  el 2%, EDTA 1mM, se enjuagaron perfectamente con agua bidestilada y se hirvieron en

EDTA 1mM durante 10 min. Se dejaron enfriar, se enjuagaron con agua bidestilada y se utilizaron inmediatamente. Las bolsas sobrantes se guardaron en refrigeración.

2. Los extractos ECA y EMC se colocaron en las bolsas de diálisis y se pusieron a 4°C, para que se concentraran por pervaporación (Curtis, A.W., 1967) hasta tener aproximadamente 1/3 del volumen colocado.
3. Los extractos ECA y EMC concentrados por pervaporación se colocaron en solución reguladora de boratos pH 8.5, se realizaron dos cambios de solución reguladora, para eliminar la mayor cantidad de sales y moléculas de menos de 10 kDa de peso molecular.
4. Los extractos una vez dialisados, se guardaron en congelación en alicuotas de 5 ml hasta su uso.

### **III. Determinación de proteínas de los extractos**

La determinación de proteínas de los extractos se realizó por el método de Lowry (1951). Se determinó antes de la diálisis de los mismos para obtener el rendimiento y

después de la diálisis para ajustar concentraciones y utilizar la cantidad adecuada de proteína en los ensayos posteriores.

#### **IV. Separación de los componentes de los extractos mediante PAGE SDS**

Las muestras se prepararon para el corrimiento electroforético colocando 50  $\mu$ l de regulador de muestra 2X (Tris HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.02%) a 150  $\mu$ g de proteína de el extracto y se calentó a ebullición durante 2 min. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) en una cámara de electroforesis marca Bio Rad por el método de Laemmli (1970) colocando 50  $\mu$ l de muestra por carril. Después del corrimiento se realizó la tinción del gel con azul de coomasie para visualizar las bandas de proteína.

#### **V. Ensayo inmunoenzimático (ELISA INDIRECTO)**

1. Las placas que se utilizaron fueron de pozos removibles (Immulon tipo II, Dynatech). Los pozos de la microplaca se sensibilizaron según el caso, colocando 100  $\mu$ l de cada una de los tres tipos de extracto a una concentración de 100  $\mu$ g de proteína por pozo en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. A otros

pozos, que correspondieron a los testigos sin antígeno se les colocaron 100 µl de regulador de carbonatos. Se incubaron a 37°C durante 1 1/2 h para permitir el acoplamiento a la fase sólida.

2. Se eliminó el contenido de los pozos por inversión de la placa y el líquido remanente fué desechado sacudiendo la placa fuertemente sobre papel adsorbente.
3. A continuación se efectuaron dos lavados a las placas, con el fin de eliminar el antígeno no acoplado a la fase sólida agregando 300 µl de solución de lavado (PBS-T) y dejando en reposo 3 min , al cabo de ese tiempo la solución se eliminó de la manera descrita en el paso anterior.
4. Se agregaron a todos los pozos 300 µl de regulador de bloqueo, incubándose a continuación a 37°C durante 1 1/2 h para permitir el bloqueo de los sitios a los que no se adsorbió el antígeno.
5. Se repitieron los pasos 2 y 3.
6. Enseguida a cada par de pozos se les adicionaron 100 µl de los sueros a probar diluídos (1:10) en PBS-T, a continuación se incubaron a temperatura ambiente 14 h

(toda la noche) para permitir que se llevase a cabo la reacción del anticuerpo con el antígeno que está unido a la fase sólida

7. Se repitieron los pasos 2 y 3 para eliminar los anticuerpos que no se unieron al antígeno.
8. Según el caso se adicionaron 100 µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 o anti-IgG4 humana a todos los pozos diluido (1:2000) en PBS-T, a continuación se incubó a 37°C por 1 h con el fin de permitir la reacción.
9. Se realizaron los pasos 2 y 3 para eliminar el exceso de anticuerpos que no reaccionaron.
10. Se adicionaron en todos los casos y a todos los pozos 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Fab específico) diluido (1:100) en PBS-T, se incubó a 37°C durante 1 h.
11. Se llevaron a cabo los pasos 2 y 3 para eliminar el conjugado que no reaccionó.
12. A continuación se agregaron a cada pozo 100 µl de una solución recién preparada del sustrato de la enzima, incubando enseguida en la oscuridad durante 30 min

para permitir la reacción enzimática y el desarrollo de color. Para preparar 20 ml de reactivo: mezclar 3.5 ml de metanol, 16.6 ml PBS, 17  $\mu$ L de  $H_2O_2$  y 10 mg de orto-fenilendiamina.

13. La reacción fué detenida adicionando una gota de  $H_2SO_4$  8N a todos los pozos.

14. Posteriormente las lecturas fueron realizadas a una absorbancia de 492 nm de longitud de onda, ajustando el lector de microplacas a cero de absorbancia con un blanco de reactivos (solución de sustrato).

### **III. RESULTADOS**

#### **1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

El estudio clínico de los pacientes alérgicos seleccionados se realizó en el servicio de Alergia e Inmunología del Hospital Juárez de México SS, el criterio de inclusión fue una reacción dérmica positiva a extractos de ácaros con 3 cruces o de mayor intensidad, algunos de estos parámetros se resumen en las tablas III y IV.

De los pacientes incluidos: 34 manifestaban asma, 39 rinitis, 8 eczema; 24 presentaban síntomas de dos padecimientos, 7 cursaban con los tres padecimientos. El rango de edad fue de 4 a 60 años y se incluyeron 20 Hombres y 29 Mujeres, lo cual concuerda con las observaciones hechas por Nakagawa, quien afirma que el ácaro del polvo casero juega un papel importante en la manifestación y progresión de varios desórdenes alérgicos como asma bronquial extrínseca, rinitis alérgica, asma crónica, urticaria y dermatitis atópica (Nakagawa et al 1983, Nakagawa et al, 1987).

#### **2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TRABAJO**

La toma de muestras de polvo de las casas de los pacientes alérgicos, la identificación y cultivo de los ácaros fue realizada por Zendejas-Buitrón V.M. 1996. La cantidad de proteínas extraídas a partir de 10 g de polvo tamizado "fino" del cultivo de ácaros o 10

g de medio de cultivo, fue de 4.2 mg/ml con un rendimiento del 3.15% para el primero y 4.92 mg/ml con un rendimiento de 3.87% para el segundo. Ver tabla II.

**TABLA II. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS**

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS mg/ml	RENDIMIENTO (%)
EXTRACTO DE CULTIVO DE ÁCAROS (ECA)	4.2	3.15
EXTRACTO DE MEDIO DE CULTIVO (EMC)	4.9	3.87
EXTRACTO COMERCIAL (ECO)	11.76	---

**3. IDENTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTEÍCA DE LOS EXTRACTOS POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.**

Posterior al corrimiento electroforético en un sistema de geles discontinuos al 12% de poliacrilamida, se comparó la composición protéica del extracto de cultivo de ácaros (ECA), un extracto de medio de cultivo (EMC), un extracto comercial de laboratorios Freeman (ECO) y de una proteína recombinante purificada de uno de los antígenos principales del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* el alérgeno Der p1 proporcionado por el Institute Research DNAX, Palo Alto, CA. EE.UU.

**TABLA III. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS  
CON TRATAMIENTO DESENSIBILIZANTE.**

Pacientes	Edad (Años)	Sexo	Síntomas	Tpo. Trat.
1	18	F	R	2 meses
2	7.8	M	AR	1 año
3	7	M	A	1 mes
4	13	F	NE	1 mes
5	28	M	R	6 meses
6	20	M	AR	2 meses
7	48	F	AR	Homeopático.
8	55	F	R	< 1 año
9	11	F	NE	< 2 meses
10	10	F	ARE	< 1 mes
11	15	M	AR	1 mes
12	8	M	A	1 mes
13	10	M	AR	< 2 meses
14	53	F	R	< 1 año
15	34	M	ARE	< 1 año
16	11	M	AR	10 meses
17	7.9	M	A	< 1 mes
18	60	F	NE	< 1 año
19	35	F	NE	NE
20	23	F	RE	2 meses
21	40	F	A	2 meses
22	15	M	ARE	< 1 mes
23	7	F	AR	1 mes
24	35	F	NE	NE

A:Asma; R:Rinitis; E:Eczema; NE: No Establecido; ARE: asma, rinitis y eczema.

**TABLA IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS  
SIN TRATAMIENTO DESENSIBILIZANTE.**

Pacientes	Edad (Años)	Sexo	Síntomas
1	9	M	AR
2	54	F	ARE
3	22	F	AR
4	39	F	AR
5	7	F	AR
6	9	F	AR
7	6	M	R
8	14	M	AR
9	23	F	AR
10	7	M	AR
11	19	F	AR
12	16	F	AR
13	4.8	F	ARE
14	43	F	R
15	4.9	F	AR
16	26	F	ARE
17	12	M	R
18	12	M	AR
19	19	F	AR
20	4	F	ARE
21	23	M	AR
22	--	F	NE
23	57	F	AR
24	10	M	AR
25	5	M	R

A:Asma; R:Rinitis; E:Eczema; NE: No Establecido.

De dicho análisis se observó que existen 6 proteínas con peso molecular similar entre los tres primeros extractos. Se encontró una mayor homología entre el ECA (preparado por nosotros) y el ECO, los cuales tienen 13 proteínas similares. El ECA comparte 10 proteínas del mismo peso molecular con el EMC; y entre el ECO y EMC comparten 8 proteínas.

Para la molécula recombinante se identificaron 2 dobletes de proteína, uno con 68 y 72 kDa y otro de 29.5 y 33 kDa. En el ECA y el ECO se encuentran proteínas con similar peso molecular que la molécula recombinante y el EMC no tiene proteínas de peso molecular similar a esta molécula. Ver tabla V y figura 1.

#### **4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA**

Una vez obtenidos los extractos de trabajo (ECA, EMC y ECO) se procedió a la estandarización del ELISA con el objeto de poder evaluar la respuesta de anticuerpos de los individuos de los diferentes grupos de estudio hacia los antígenos de los extractos.

Para la optimización de la determinación de los niveles séricos de anticuerpos (IgG1 e IgG4) se utilizaron diferentes tipos de placas, bloqueadores, reguladores de recubrimiento, temperaturas y tiempos de incubación, así como la determinación de los títulos de los anticuerpos monoclonales anti-IgG1 y anti-IgG4 y del conjugado, de los resultados de varios experimentos se eligieron las condiciones de trabajo. Ver tabla VI.

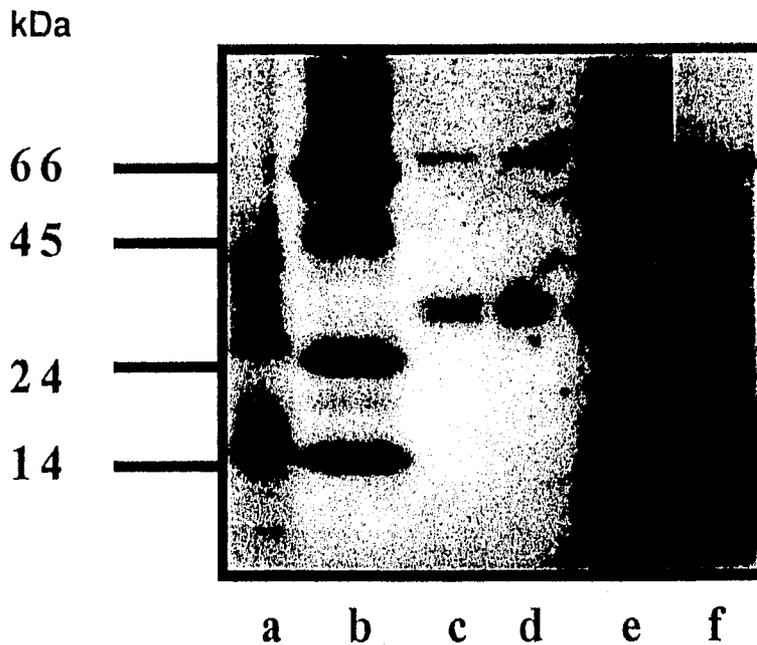


Figura 1. Análisis electroforético donde se compara el corrimiento de las proteínas de los diferentes extractos y Der pI recombinante. Carril a) Extracto comercial de *D. pteronyssinus*; b) Marcadores de peso molecular; c y d) Der pI recombinante; e) Extracto de cultivo de ácaros; f) Extracto de medio de cultivo. La separación electroforética se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reductoras y se realizó una tinción con azul de coomasie para visualizar las bandas de proteína.

TABLA V. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTÉICA DE LOS EXTRACTOS

EXTRACTO CULTIVO ACAROS PM (kDa)	DE DE	EXTRACTO MEDIO CULTIVO PM (kDa)	DE DE	EXTRACTO COMERCIAL PM (kDa)	rDer p I PM (kDa)
> 100 (2)		> 100 (2)		> 100 (2)	
(2)				(2)	
83		83		83	
72				68	72
					68
56.8		56.8			
53.7				53.7	
43.5				43.5	
40				40	
37.8				37.8	
				33.4	33.4
31.5				31.5	
29					29
		26.5		26.5	
25		25			
20.3		20.3			
17.5		17		17	
15.8		15.8		15.8	
		11.5		11.5	
11.3				11.3	
<10		<10		<10	

NOTA: Únicamente se colocaron las proteínas que tienen peso molecular similar por lo menos en dos extractos.

**TABLA VI. CONDICIONES QUE SE SELECCIONARON PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG1 e IgG4 POR EL MÉTODO DE ELISA.**

TIPO DE PLACA	IMMULON II
REGULADOR DE RECUBRIMIENTO	SOLN. AMORTIGUADORA DE CARBONATOS 0.1M pH 9.6
CONCENTRACIÓN DE ANTIGENO	100 µg/pozo 1:30 h a 37°C
SOLUCIÓN DE BLOQUEO	LECHE DESCREMADA 2% EN PBS-T 1:30 h
SUEROS HUMANOS	DIL. 1:10 EN PBS/T TODA LA NOCHE A T.A.
mAb ANTI-IgG HUMANA	DIL. 1:2000 EN PBS/T 1 h A 37°C
CONJUGADO	DIL. 1:2000 EN PBS/T 1 h A 37°C
CROMOGENO	OFD EN CPB pH 5.0 30 min A T.A.
LECTURA EN D.O.	492 nm

OFD = orto-fenilendiamina

CPB = solución amortiguadora de citratos fosfatos

#### **5. NIVELES SÉRICOS DE IgG1 E IgG4 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO CONTRA LOS DIFERENTES EXTRACTOS.**

El punto de corte para considerara un valor positivo se considero a partir de los testigos sin antígeno tomando el promedio de estos más dos valores de la desviación estándar, dicho valor en densidad óptica es de 0.85. Los valores individuales representados en las gráficas son el promedio de los resultados de tres ensayos independientes que se efectuaron por duplicado.

Para comparar los valores de IgG1 específica determinada por ELISA, se seleccionaron los datos obtenidos contra un extracto (ECA) en el grupo de pacientes con tratamiento desensibilizante. Las lecturas en densidad óptica (D.O) fueron acomodadas de mayor a menor grado de reconocimiento (Figura 2). Este análisis se realizó con la finalidad de ver alguna semejanza o diferencia en la respuesta de anticuerpos en contra de los antígenos de los diferentes extractos en un mismo grupo de estudio.

Otro tipo de análisis que se realizó fué aquel en el que se compararon los valores de IgG1 e IgG4 en contra de los tres extractos en los tres grupos de estudio Figuras 3, 4, y 5).

#### **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES INDIVIDUALES DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL ECA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.**

El comportamiento en la respuesta de anticuerpos IgG1 es un tanto similar para los pacientes con tratamiento y aquellos no tratados. Hay un número un poco mayor de pacientes positivos con tratamiento 17/24 (70.83%), que los pacientes sin tratamiento 15/25 (60%), aunque los niveles de reconocimiento de anticuerpos fueron mayores para los segundos. Los convivientes de los pacientes alérgicos presentan el menor reconocimiento 2/20 (10%) hacia el ECA con IgG1. Ver tabla VII.

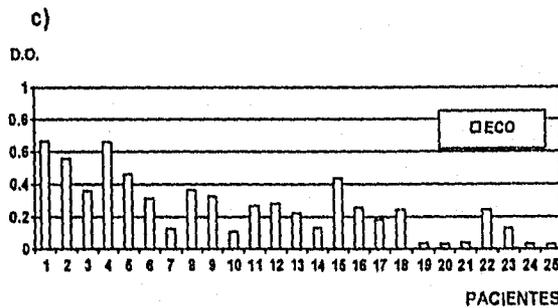
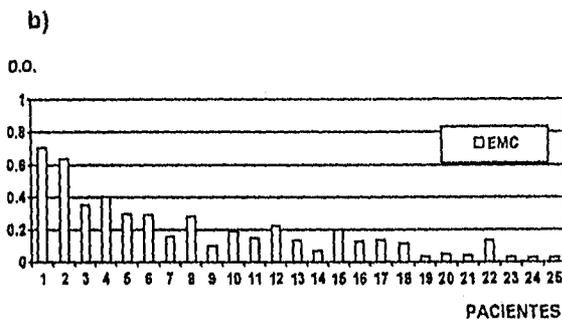
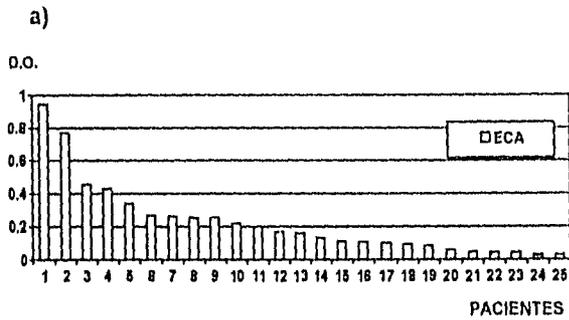


Figura 2. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 en pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante en contra de: a) un extracto de cultivo de ácaros (ECA), b) un extracto de medio de cultivo (EMC) y c) un extracto comercial (ECO). Las barras representa valores individuales.

En el caso de los valores con IgG4 se encontró un mayor reconocimiento en el grupo de pacientes con tratamiento 14/24 (58.33%), en comparación con los pacientes sin tratamiento 8/25 (32%) y en los convivientes un individuo resulto positivo. El número de pacientes sin tratamiento con respuesta positiva fue la mitad respecto al grupo tratado y en los niveles de anticuerpo determinados son mucho menores para el de los no tratados. Ver tabla VIII.

#### **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES INDIVIDUALES DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL EMC EN LOS DIFERENTES GRUPOS.**

El reconocimiento hacia el EMC fué semejante al encontrado para el ECA, en los tres grupos de estudio con las dos subclases de IgG. Los pacientes con tratamiento presentaron el número más alto de reconocimiento con IgG1 hacia el EMC 18/24 (75%), en comparación con los pacientes sin tratamiento 15/25 (60%) y con respecto a los convivientes 4/20 (20%), que casi no presentaron respuesta positiva. Ver tabla VII.

En general el reconocimiento hacia el EMC con los anticuerpos IgG4 es menor en comparación con los IgG1. Los pacientes con tratamiento presentaron una respuesta de mayor positividad 11/24 (45.83%), los pacientes sin tratamiento casi no reconocieron antígenos del extracto 3/24 (12.5%) y los convivientes no presentaron reconocimiento. Ver tabla VIII.

TABLA VII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS IgG1 EN SUEROS DE PACIENTES ALÉRGICOS Y SUS CONVIVIENTES CONTRA EL ECA, EMC Y ECO.

GRUPO	ECA		EMC		ECO	
	POS/TOT	%	POS/TOT	%	POS/TOT	%
PACIENTES CON TRATAMIENTO	17/24	70	18/24	75	20/24	83
PACIENTES SIN TRATAMIENTO	15/25	60	15/25	60	18/25	72
CONVIVIENTES	2/20	10	4/20	20	4/20	20

TABLA VIII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS IgG4 EN SUEROS DE PACIENTES ALÉRGICOS Y SUS CONVIVIENTES CONTRA EL ECA, EMC Y ECO.

GRUPO	ECA		EMC		ECO	
	POS/TOT	%	POS/TOT	%	POS/TOT	%
PACIENTES CON TRATAMIENTO	14/24	58	11/24	45	15/24	62
PACIENTES SIN TRATAMIENTO	8/25	32	3/25	12	7/25	28
CONVIVIENTES	1/20	5	0/20	0	0/20	0

## **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES INDIVIDUALES DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL ECO EN LOS DIFERENTES GRUPOS.**

El reconocimiento hacia el ECO, también fué semejante al encontrado frente a los otros extractos. La mayor positividad de reconocimiento de antígenos con IgG1 se observó en los pacientes con tratamiento 20/24 (83.33%), en comparación con los pacientes sin tratamiento 18/25 (72%) y el menor reconocimiento para los convivientes 4/20 (20%). Ver tabla VII.

El reconocimiento con IgG4 fué menor en comparación con IgG1. Aunque el comportamiento fué similar, es decir mayor positividad para los pacientes con tratamiento 15/24 (62.5%), menor respuesta en el grupo sin tratamiento 7/25 (28%) y los convivientes no presentaron reconocimiento alguno. Ver tabla VIII.

## **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE IgG1 E IgG4 EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO EN CONTRA DE LOS TRES EXTRACTOS**

En el grupo de pacientes sin tratamiento para el caso de IgG1 hubo una mayor respuesta en contra del ECO y con IgG4 se encontraron niveles semejantes entre ambos grupos. En el caso de IgG1 el número de individuos con respuesta positiva fue similar para el ECA y el EMC y ligeramente mayor para el ECO y para IgG4 el menor

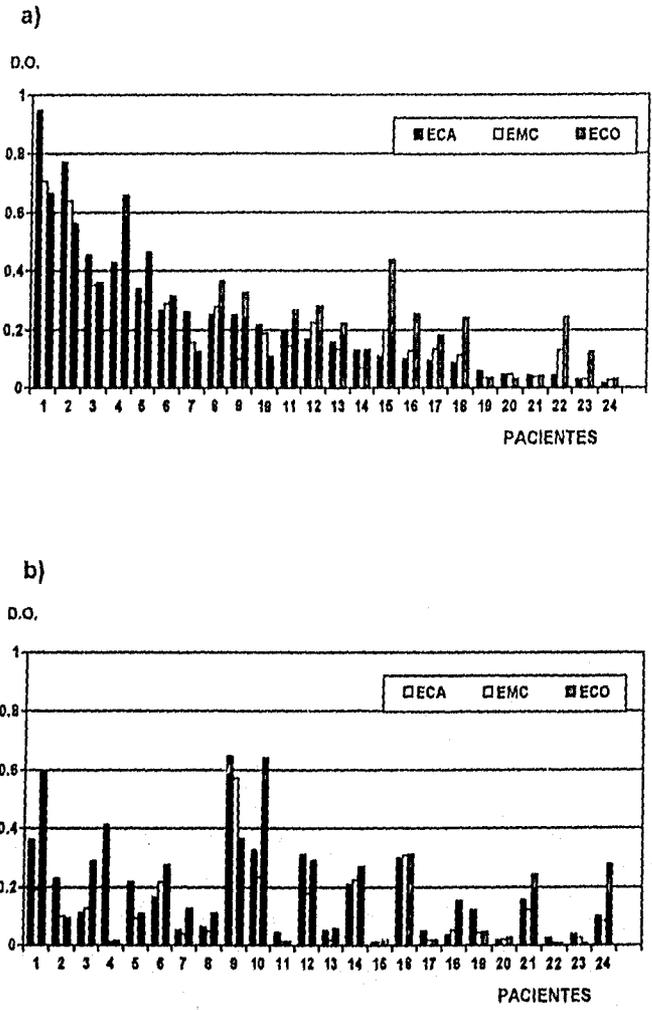


Figura 3. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 a) e IgG4 b) en pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante en contra de un extracto de cultivo de ácaros (ECA), un extracto de medio de cultivo (EMC) y un extracto comercial (ECO). Las barras representan valores individuales.

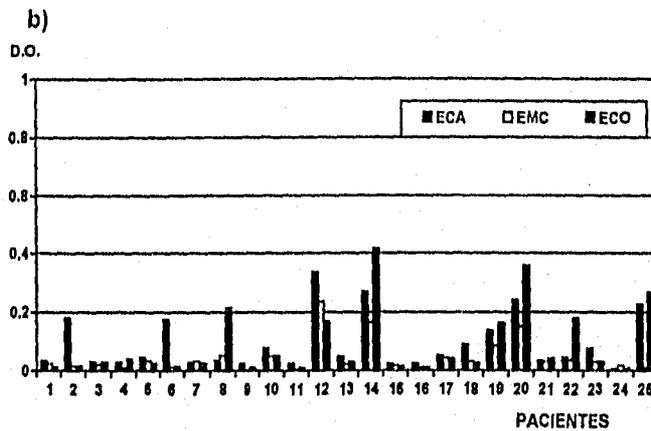
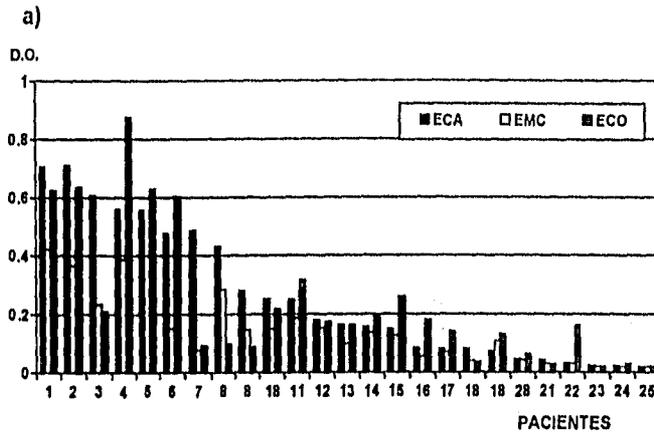


Figura 4. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 a) e IgG4 b) en pacientes alérgicos sin tratamiento desensibilizante en contra de un extracto de cultivo de ácaros (ECA), un extracto de medio de cultivo (EMC) y un extracto comercial (ECO). Las barras representan valores individuales.

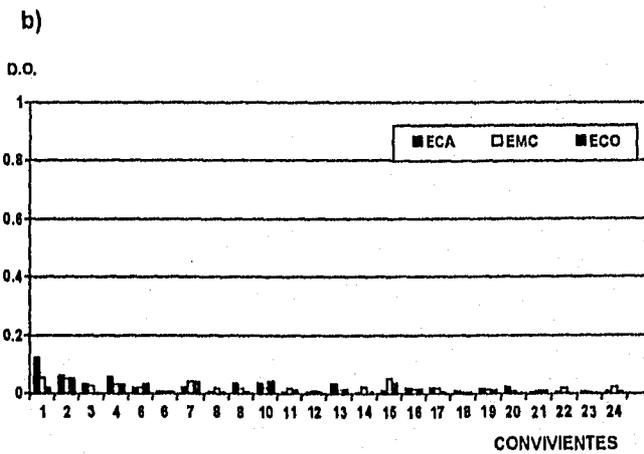
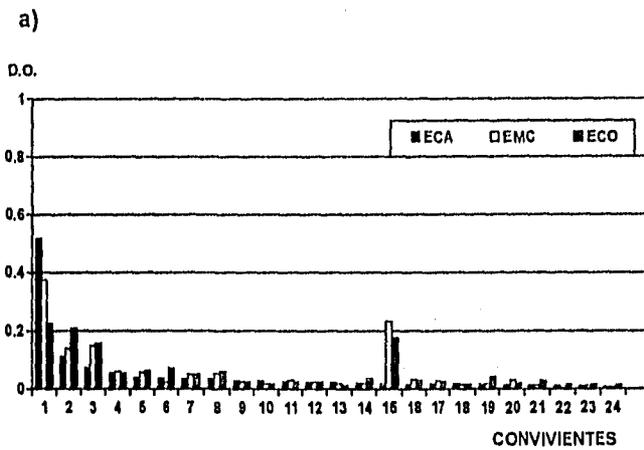


Figura 5. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 a) e IgG4 b) en los convivientes de los pacientes alérgicos en contra de un extracto de cultivo de ácaros (ECA), un extracto de medio de cultivo (EMC) y un extracto comercial (ECO). Las barras representan valores individuales.

reconocimiento fue en contra del EMC y mayor para el ECA y el ECO con bastante similitud entre estos últimos. Ver tablas IX y X, y figuras 3 y 4.

En el caso de los pacientes sin tratamiento hubo más diferencias en el reconocimiento. Para IgG4 el menor reconocimiento fue en contra del EMC y en mayor grado para el ECA y el ECO esto tanto en el número de individuos con respuesta positiva, como en el nivel de anticuerpos determinado. En los niveles de IgG1 el mayor número de individuos positivos fue en contra del ECO y el mayor nivel de anticuerpos en contra del ECA y el menor nivel para el EMC aunque el número de individuos positivos fue igual que para el ECA. Ver tablas IX, X y figura 4.

Para los convivientes se encontró un reconocimiento muy bajo con ambas subclases de anticuerpos comparándolo con la respuesta de los pacientes con y sin tratamiento. Con IgG4 prácticamente no se observó respuesta y sólo 1 individuo reconoció a los antígenos del ECA. La respuesta con IgG1 fue similar en contra del ECO y el EMC y menor para el ECA. Ver tablas IX, X y figura 5.

#### **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES PROMEDIO POR GRUPO DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL ECA.**

Los pacientes alérgicos con tratamiento presentaron el mayor porcentaje de positividad con IgG1 en contra de los antígenos del ECA, seguido del grupo de pacientes sin tratamiento y en mucho menor grado los convivientes. En lo que respecta a los niveles

de anticuerpos, los pacientes sin tratamiento tienen los niveles más altos de anticuerpos con una media por grupo de 0.253 de D.O., en segundo lugar se encontraron los pacientes con tratamiento con una media por grupo de 0.228 y los convivientes presentaron los niveles más bajos con una media por grupo de 0.050. Ver tablas VII, IX y figura 6. Las diferencias en la respuesta de anticuerpos en los grupos de pacientes con respecto al grupo de los convivientes fueron estadísticamente significativas, con una  $p < 0.005$ . No hubo diferencias significativas entre los pacientes con tratamiento y los pacientes sin tratamiento.

En el caso de los niveles de IgG4 se encontró un comportamiento similar aunque menor respecto a los porcentajes de positividad que se encontraron con IgG1. Los pacientes con tratamiento ( $X=0.165$ ) presentan el mayor reconocimiento de los tres grupos con IgG4, esta respuesta fué estadísticamente significativa respecto a los pacientes sin tratamiento con un reconocimiento promedio de 0.085 y una  $p < 0.025$ . Los menores niveles fueron por parte del grupo de los convivientes con una media de 0.025 y una diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos de pacientes con una  $p < 0.005$ . Ver tablas VII y X y figura 6.

#### **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES PROMEDIO POR GRUPO DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL EMC.**

La respuesta contra las proteínas del medio de cultivo (EMC) es similar, a la que se encontró en contra el ECA. Es decir, el mayor porcentaje de positividad fue para el

TABLA IX. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG1

(PROMEDIO POR GRUPO) HACIA EL ECA, EMC Y ECO.

GRUPO	ECA		EMC		ECO	
	POS/TOT	PROM (DO)±SD	POS/TOT	PROM (DO)±SD	POS/TOT	PROM (DO)±SD
PACIENTES CON TRATAMIENTO	17/24	0.228 ±0.221	18/24	0.205 ±0.166	20/24	0.273 ±0.162
PACIENTES SIN TRATAMIENTO	15/25	0.253 ±0.229	15/25	0.144 ±0.125	18/25	0.218 ±0.211
CONVIVIENTES	2/20	0.050 ±0.085	4/20	0.060 ±0.078	4/20	0.059 ±0.062

TABLA X. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG4

(PROMEDIO POR GRUPO) HACIA EL ECA, EMC Y ECO.

GRUPO	ECA		EMC		ECO	
	POS/TOT	PROM. (DO)±SD.	POS/TOT	PROM. (DO)±SD.	POS/TOT	PROM. (DO)±SD
PACIENTES CON TRATAMIENTO	14/24	0.165 ±0.144	11/24	0.114 ±0.121	15/24	0.177 ±0.161
PACIENTES SIN TRATAMIENTO	8/25	0.085 ±0.081	3/25	0.045 ±0.041	7/25	0.085 ±0.107
CONVIVIENTES	1/20	0.025 ±0.024	0/20	0.022 ±0.013	0/20	0.016 ±0.014

grupo de pacientes con tratamiento tanto para anticuerpos IgG1 como con IgG4, seguido del grupo de pacientes sin tratamiento con IgG1 y mucho menor reconocimiento con IgG4 y una respuesta muy baja en el grupo de los convivientes y no hubo respuesta en este grupo con IgG4.

Los convivientes de los pacientes alérgicos no reconocen con IgG1 a los antígenos presentes en el EMC ( $X=0.060$ ). En cambio, los pacientes con tratamiento si los reconocieron ( $X=0.205$ ), así como, los que no lo recibieron ( $X=0.144$ ), las diferencias en ambos casos con respecto a los convivientes son estadísticamente significativas, con una  $p<0.005$ . La diferencia al comparar el grupo tratado contra el grupo no tratado fué estadísticamente significativa con una  $p<0.025$ . Ver tablas IX y X y figura 6.

Los convivientes tampoco reconocen con IgG4 a los antígenos presentes en el EMC ( $X=0.22$ ). Los pacientes con tratamiento presentan una diferencia estadísticamente significativa tanto con el grupo no tratado, como con los convivientes, con una  $p<0.005$ . La diferencia al comparar el grupo sin tratamiento con los convivientes fue estadísticamente significativa con una  $p<0.025$ . Ver figura 6.

#### **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES PROMEDIO POR GRUPO DE IgG1 E IgG4 EN CONTRA DEL ECO.**

Los valores encontrados en contra del ECO son muy parecidos a los encontrados con el ECA y el EMC, es decir, los convivientes presentan los menores niveles de

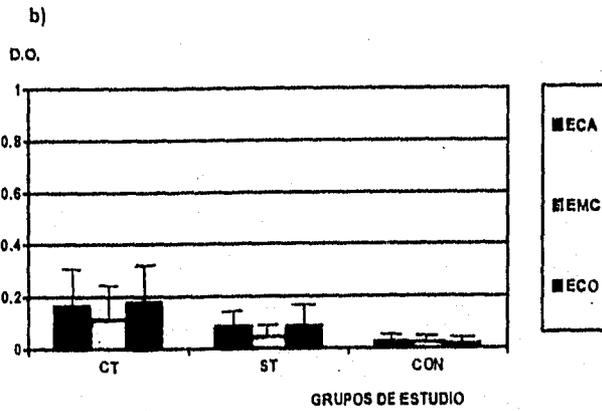
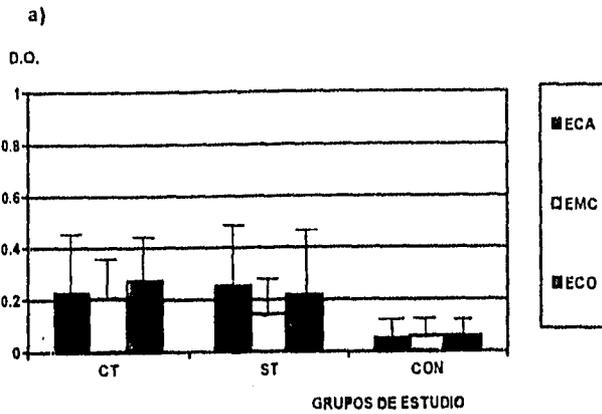


Figura 6. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG1 a) e IgG4 b) en pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante (CT), sin tratamiento desensibilizante (ST) y sus convivientes (CON) en contra de un extracto de cultivo de ácaros (ECA), un extracto de medio de cultivo (EMC) y un extracto comercial (ECO). La gráfica representa los promedios por grupo  $\pm$  SD.

reconocimiento con IgG1 y una no respuesta con IgG4 respecto a los pacientes alérgicos. El grupo de pacientes con tratamiento presenta los mayores niveles de reconocimiento frente al ECO con ambas subclases de anticuerpos determinadas (IgG1 e IgG4) en comparación con el grupo no tratado. Ver tablas IX, X y figura 6.

Las diferencias en la respuesta de anticuerpos IgG1 en los grupos de pacientes respecto a los convivientes fue estadísticamente significativa, con una  $p < 0.005$  y no hubo diferencias entre el grupo con tratamiento y el grupo no tratado. Ver figura 6.

Los convivientes de los pacientes alérgicos no reconocieron con IgG4 a los antígenos presentes en el ECO ( $X=0.016$ ). En cambio, los pacientes con tratamiento si los reconocieron ( $X=0.177$ ), así como, los no tratados ( $X=0.085$ ). Las respuestas de los grupos de pacientes respecto a los convivientes fueron estadísticamente significativas, con una  $p < 0.005$ . La diferencia al comparar el grupo con tratamiento con el grupo no tratado fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.025$ . Ver tabla IX y X y figura 6.

#### IV. DISCUSIÓN

Los padecimientos de naturaleza alérgica al ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, son las alergias más comunes en la clínica y son la causa más importante de enfermedades tales como asma bronquial extrínseca, rinitis alérgica y dermatitis atópica. En el estudio de la alergia al agente causal más común, el polvo casero y ácaros que lo habitan es de interés notar que 60 a 70% de los pacientes que acuden a los servicios de alergia en los hospitales de la ciudad de México, presentan una reacción dérmica positiva con tres o más cruces hacia extractos de polvo y/o ácaros (Anderson et al, 1989).

En las enfermedades alérgicas se tiene bien establecido el papel de los anticuerpos IgE, los cuales se encuentran con niveles séricos muy elevados en la mayoría de los casos y participan de manera directa en el fenómeno inflamatorio. No se ha definido bien el papel de los anticuerpos IgG o "anticuerpos bloqueadores". Algunos autores enfatizan la importancia de los anticuerpos IgG1 y por otra parte existen grupos de investigación que indican que los anticuerpos IgG4 aumentan continuamente con la aplicación de tratamiento desensibilizante. El efecto clínico de este mismo se atribuye principalmente a la formación de anticuerpos IgG y/o a la reducción de la producción de anticuerpos IgE (Nakagawa et al, 1983; Saito et al, 1992).

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune humoral de individuos alérgicos con antecedentes de tratamiento desensibilizante, pacientes

alérgicos que no han recibido este tipo de tratamiento y hacer una comparación de dicha respuesta con la de los convivientes de estos pacientes, los cuales, son personas que habitan en el mismo domicilio, tienen características genéticas muy similares, están expuestos a los mismos alérgenos, pero no manifiestan síntomas de enfermedad que en el caso de los individuos alérgicos inducen problemas de hipersensibilidad tipo I.

El determinar semejanzas o diferencias en el tipo de respuesta humoral entre pacientes y convivientes puede ayudar a ampliar los conocimientos referentes a las alteraciones en los mecanismos inmunológicos en las enfermedades alérgicas. Sin embargo, aún cuando en algunos individuos si existen diferencias significativas al comparar sus niveles de anticuerpos a nivel de subclase, cuando dichos resultados se analizan por grupo la diferencia no es estadísticamente significativa.

Al analizar la respuesta de anticuerpos IgG1 en contra del ECA, los pacientes alérgicos con tratamiento desensibilizante (Figura 3) presentan el mayor porcentaje de positividad, seguido del grupo de pacientes sin tratamiento y finalmente el grupo de los convivientes con una respuesta muy baja. Por lo que respecta a los niveles de anticuerpos podemos decir que el tratamiento desensibilizante no modifica de manera importante la producción de anticuerpos IgG1 ya que tanto el número de individuos con respuesta positiva es muy semejante para el grupo tratado y aquellos no tratados.

En lo que respecta a los niveles promedio por grupo, para el grupo con tratamiento se obtuvo un valor promedio por grupo de 0.228 de densidad óptica y para los no tratados de 0.253, estos valores si difieren de manera importante con respecto al grupo de los convivientes cuyo valor medio es de 0.050 de densidad óptica que es un valor muy bajo. Figura. 6. Las diferencias en la respuesta de anticuerpos en los grupos de pacientes con respecto a los convivientes fueron estadísticamente significativas con una  $p < 0.005$ .

De manera semejante a lo que ocurre con la respuesta de IgG1, la respuesta de anticuerpos IgG4 de los pacientes alérgicos presenta niveles más elevados que los convivientes, el tratamiento desensibilizante induce en estos pacientes un incremento en los niveles de IgG4, además los niveles de IgG4 son menores que los de IgG1 para los tres grupos de estudio. El porcentaje de positividad en el grupo de pacientes con tratamiento es de 58% y un valor de densidad óptica promedio por grupo de 0.165 y esta respuesta fue significativamente más alta que la presentada por el grupo de pacientes sin tratamiento con un 32% de porcentaje de positividad y en los niveles de anticuerpo con un valor de 0.085 de densidad óptica promedio por grupo, con una  $p < 0.025$ .

El grupo de los convivientes no responde o lo hace de manera muy débil contra los antígenos del ECA. La respuesta de los grupos de pacientes fue mayor respecto a la de los convivientes con una diferencia estadísticamente significativa y una  $p < 0.005$  Figura. 6.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Nakagawa et al, 1983, quienes indican que en los pacientes asmáticos sensibles al ácaro de polvo casero se incrementó la producción de anticuerpos IgG4 en los pacientes conforme transcurre el tiempo de tratamiento desensibilizante, además, Nakata et al, 1989; demostraron que la IgG4 puede competir con la IgE por los alérgenos y reacciona principalmente con componentes de elevado peso molecular.

Los cambios en los anticuerpos IgG1 e IgG4 específicos a los ácaros no siempre correlacionan con la eficacia del tratamiento desensibilizante y lo ideal es un aumento de estos anticuerpos bloqueadores con una reducción importante de los síntomas del proceso inflamatorio. Está bien establecido que los anticuerpos IgG totales e IgG1 llegan a una meseta a los seis meses de iniciado el tratamiento y permanecen en ese nivel tiempo después, mientras que los anticuerpos IgG4 incrementan continuamente con el tratamiento en pacientes con rinitis perenne (Nakagawa et al, 1987).

Djurup et al, 1984; enfatizan la importancia de los anticuerpos IgG1 en lugar de los IgG4, indicando que un aumento primario de IgG1 se asocia con una disminución en la síntesis de IgE específica a veneno de abeja.

Elievant et al, 1979; encontraron que un aumento en el título de anticuerpos IgG4 específicos correlaciona con un buen pronóstico en pacientes asmáticos sensibles al polvo. Por otra parte, Saito et al, 1992; sugieren que el incremento de los anticuerpos

de bloqueo durante el tratamiento desensibilizante se atribuye al aumento de los anticuerpos IgG1 y no a los anticuerpos IgG4.

La utilización de un extracto de cultivo de ácaros, nos sirvió para evaluar la respuesta hacia antígenos presentes en el cuerpo del ácaro y de antígenos presentes en las heces de los mismos. Los principales alérgenos del ácaro se encuentran en las heces por lo cual se recomienda la utilización de extractos de las excretas o bien algún alérgeno recombinante purificado. La dificultad en la práctica para separar las excretas y cuerpos de ácaros de otras proteínas presentes en el cultivo, dió lugar para efectuar la extracción de las proteínas del cultivo total, el cual, además de polvo fino y ácaros, contiene componentes nutricionales como levaduras, cabello, uñas y escamas humanas, al cual denominamos ECA.

Para completar el estudio de la respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG4 en contra del ECA en los grupos de pacientes y convivientes, se evaluó dicha respuesta en contra de un extracto comercial de ácaros de los "Laboratorios Freeman" y en contra de un extracto de los componentes del medio de cultivo, las razones fueron las siguientes: En el caso de la utilización del ECO, este extracto se utiliza en el diagnóstico de la alergia al ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* y es el alérgeno en las pruebas intradérmicas, además, se utiliza como inmunógeno en los casos en los que los pacientes se someten a tratamiento desensibilizante y como se cita en otros trabajos durante los primeros meses de tratamiento se incrementa el grado de reconocimiento hacia los antígenos y/o alérgenos empleados.

El empleo de un extracto de los componentes del medio de cultivo (EMC) que inicialmente fue planteado como un control, obedece a la razón de investigar si la respuesta obtenida frente al ECA es debida al reconocimiento de antígenos derivados del ácaro y no por el reconocimiento de algún componente del medio.

Un resultado inesperado fue el reconocimiento hacia antígenos del EMC por parte de los pacientes alérgicos al *Dermatophagoides pteronyssinus*. La semejanza en el reconocimiento al analizar los valores individuales frente a los extractos sugiere la existencia de antígenos compartidos entre el ECA y el EMC. Por un análisis de proteínas teñidas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se encontró que los extractos que más se parecen son el ECA y el ECO pues ambos extractos comparten al menos 10 proteínas con similar peso molecular, el ECA y el EMC presentan 8 bandas comunes y, entre el ECO y el EMC comparten 7 proteínas. Figura 1.

Por otra parte el reconocimiento hacia el ECA y el ECO fue de la misma magnitud en la mayoría de los casos, es decir, si un paciente presenta una respuesta positiva frente al ECA también la presenta hacia el ECO; en algunos casos el valor de densidad óptica era un poco mayor para cualquiera de los extractos.

El tener un peso molecular idéntico para dos o más bandas de proteína no implica necesariamente que se trate de la misma molécula, pero da idea de una posible similitud en componentes y para el caso del ECO que de acuerdo al fabricante deriva

de ácaros puros, el parecido entre los extractos sugiere que el ECO contiene componentes del medio de cultivo y no es un extracto derivado de ácaros puros, cabe resaltar que algunas bandas de proteína aparecen en el ECA y ECO no están presentes en el EMC.

Como se dijo previamente, existe una respuesta muy débil por parte de los convivientes; para el caso de la IgG1, solo 4 sujetos resultaron positivos en contra del ECO y el EMC y en contra del ECA solo dos individuos resultaron positivos. Por lo que respecta a la respuesta con IgG4 solo encontramos un individuo positivo en contra del ECA y no se encontró respuesta en contra del EMC y el ECO. Los valores promedio por grupo resultaron ser bastante similares hacia los tres extractos.

De los cuatro convivientes que dieron un resultado positivo, algunos presentan hipersensibilidad a fármacos aunque sin presentar síntomas respiratorios, por lo cual sugerimos que son individuos que se encuentran en proceso de desarrollar la patología alérgica o bien que en el criterio de selección se deberían de haber incluido en el grupo sin tratamiento desensibilizante, lo anterior se deduce a partir de la similitud de respuesta de anticuerpos que presentaron estos individuos y el grupo de pacientes sin tratamiento desensibilizante, es decir, se encuentran valores positivos en contra los extractos con IgG1 y una no respuesta o valores menores con IgG4.

La respuesta de anticuerpos IgG1 en contra de los tres extractos es bastante similar para los grupos de pacientes con tratamiento y sin tratamiento desensibilizante,

aunque los niveles de anticuerpos mayores fueron para el ECO en el grupo no tratado y en contra del ECA en el grupo tratado. Estos resultados contrastan completamente con el escaso reconocimiento por parte del grupo de los convivientes hacia los tres extractos.

Esta diferencia no significativa entre ambos grupos de pacientes alérgicos sugiere que la IgG1 no se modifica con la aplicación del tratamiento y que dichos anticuerpos pueden contribuir a la exacerbación del proceso inflamatorio, ya que fijan complemento y pudieran liberarse algunos factores proinflamatorios.

En la respuesta de anticuerpos IgG4 en contra de los tres extractos encontramos diferencias estadísticamente significativas para el grupo sin tratamiento, al comparar la respuesta obtenida en contra del ECA y ECO, con respecto al EMC, con una  $p < 0.005$ . En el grupo sin tratamiento hay un número similar de individuos con respuesta positiva en contra del ECA y el ECO, y menos de la mitad en positividad y niveles de anticuerpos para el EMC. Aunque esto parece darse también en el grupo tratado; es decir, similar positividad y niveles de anticuerpos entre el ECA y ECO y un poco menor para el EMC, no existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar dichas respuestas.

Durante la aplicación del tratamiento desensibilizante a los pacientes alérgicos se les administran dosis crecientes del ECO, que como ya sugerimos previamente comparte algunas proteínas del medio de cultivo, lo cual se refleja con un aumento en el

reconocimiento hacia el EMC por parte del grupo de pacientes tratados respecto al grupo no tratado, en un orden de magnitud de más del doble tanto en el número de individuos con respuesta positiva como en el nivel de anticuerpos detectado y que estos anticuerpos "bloqueadores" contribuyan de manera importante para reducir los síntomas de dichos pacientes.

## V. CONCLUSIONES

La obtención de extractos de cultivo de ácaros y de medio de cultivo de los mismos se realizó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación constante. La concentración de proteínas extraídas a partir de 10 g fue de 4.2 mg/ml con un rendimiento del 3.15% para el primero y 4.92 mg/ml con un rendimiento de 3.87% para el segundo.

Las condiciones óptimas para el ELISA indirecto fueron: sensibilización con 100mg de antígeno por pozo en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6 durante 1:30 hrs; bloqueo con leche descremada al 2% en PBS/T durante 1:30 hrs; incubación con el suero del paciente diluído 1:10 en PBS/T toda la noche a temperatura ambiente; incubación con el mAb diluído 1:2000 en PBS/T 1 h a 37°C; incubación con el conjugado diluído 1:2000 en PBS/T 1 h a 37°C, y finalmente se reveló con orto-fenilendiamina como cromógeno en solución amortiguadora de citratos pH 5.0 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los convivientes de los pacientes alérgicos no reconocen antígenos de los diferentes extractos, lo cual es una respuesta diferente respecto a la de los pacientes con y sin tratamiento, con una  $p < 0.005$ .

El mayor reconocimiento en los pacientes tratados y no tratados en contra de los diferentes extractos se detecto con IgG1 y en menor grado con IgG4, esto fue tanto en el número de individuos con respuesta positiva como en los niveles de anticuerpo.

El tratamiento desensibilizante si modifica la respuesta de anticuerpos IgG4, los pacientes con tratamiento aumentan a más del doble su respuesta de anticuerpos respecto al grupo sin tratamiento, con una  $p < 0.005$ .

La respuesta detectada en contra de un extracto en particular casi siempre correlaciona con una respuesta positiva contra los otros extractos y en la mayoría de los casos el reconocimiento fue menor hacia antígenos del medio de cultivo. Aunque esta diferencia no sea estadísticamente significativa.

Carswell, F., Thompson, S. 1986. Does natural sensitisation in eczema occur through the skin? *Lancet* **13**:15-17.

Chapman, M.D., Platts-Mills, T.A.E. 1980. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J. Immunol.* **125**:587-592.

Colloff, M.J., Smith, H.V., Howe, C.W. 1992. Proteolysis of human IgG by house dust mite allergens. *Lancet* **339**:746-747.

Creticos, P.S., Norman, P. 1987. Immunotherapy with allergens. *JAMA* **258**:2874-2880.

Crowle, J.A. 1988. Detection and measurement of the immune response. in "Immunological diseases". Ed. Samter, M., Talmage, D., Frank, M., Auster, R., Clamon, H. Braun Pan. Co. Boston/Toronto 4a. edition. pp. 3614-3686.

Cunnington, A.M., Lind, P., Spijksma, F.T. 1987. Taxonomic and immunochemical identification of the house dust mites *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides microceras*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **79**: 480-481.

Curtis, A.W. 1967. Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. I. Academic Press. pp 94-102.

Delespesse, G., de Maubeuge, J., Kenes, B., Nicaise, R., Govaerts, A.. 1977. IgE mediated hypersensitivity in ageing. *Clin Allergy.* **7**:155-160.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Aalberse, R. C., van der Gaag, R., van Leeuwen, J. 1983. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged Immunization Results in an IgG4-Restricted Response. *J. Immunol.* **130**: 722-726.

Anderson, A. 1989. Isolation and characterization of an allergen rich fraction from cultures of *Dermatophagoides pteronyssinus*. Preliminary purification of a protein. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **89**:17-23.

Bengtsson, A., Karisson, A., Rolfsen, W., Einarsson, R. 1986. Detection of allergens in mould and mite preparations by a nitrocellulose electroblotting technique. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **80**:383-90.

Bird, P., Calvert, J.E., Amlot, P.L.. 1990. Distinctive development of IgG4 subclass antibodies in the primary and secondary responses to Keyhole limpet haemocyanin in man. *Immunology.* **69**:355-360.

Bonini, S., Magrini, L., Rotiroli, G., Ronchetti, M.D. Onorati, P. 1994. Genetic and environmental factor in the changing incidence of allergy. *Allergy* **49**:6-14.

Bruynzeel-Koomen, C., van der Donk, E.M.M., Bruynzeel, M.C., de Gast, G.C., Mudde, G.C. 1988. Associated expression of CD1 antigen and Fc receptor for IgE on epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **74**:137-142.

Djurup, R., Osterballe, O. 1984. IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapy. *Allergy* **39**:433-441.

Einarsson, R., Dreborg, S., Hammarstrom, L., Lafkvist, T., Smith, C.I.E., Svensson, G. 1992. Monitoring of mite *Dermatophagoides farinae* allergen-specific IgG and IgG subclass distribution in patients on immunotherapy. *Allergy*. **47**:76-82.

Etievant, M., Leluc, B., Bouclier, R., Henocq, E. 1979. Immuno-enzymatic study of IgG subclasses specific for allergen in house dust immediate hypersensitivity. *Ann. Allergy*. **43**:169-173.

Ford, A., Seagroatt, V., Platts-Mills, T.A.E., Lowenstein, H. 1985. A collaborative study on the first international standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* house dust mite extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **75**:676-686.

Frandsen, V.A.. *Alergenos*. 1a. edición. 1988. Editorial Mir. Moscú. pp 131-142.

Geissler, W., Maasch, H.J., Winter, G., Wahl, R. 1986. Kinetics of allergen release from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J. Allergy Clin Immunol* **77**:24-31.

Haida, M., Okudaira, H., Ogita, T., Ito, K., Miyamoto, T., Nakajima, T., Hongo, O. 1985. Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*-Immunochemical studies of four allergic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **75**:686-692.

Heymman, P.W., Chapman, M.D., Aalberse, R.C., Fox, J.W., Platts-Mills, T.A.E. 1989. Antigenic and structural analysis of group II allergens Der fIII and Der pII from house dust mites (*Dermatophagoides spp.*) J. Allergy Clin. Immunol. **83**:1055-1067.

Kauffman, H.F., van der Heide, S., Hovenga, H., de Vries, K. 1985. Standardization of House Dust Mite Extracts. Allergy **40**:143-150.

Keh, L.K., Shih, Y.W., Kue, H.H. 1991. Analysis of house dust mite-specific IgE, IgG4 and IgG antibodies during immunotherapy in asthmatic children. Ann. Allergy. **67**:63-69.

Kimura, J.Y., Ohta, N., Ishi, A., Nagano, G., Usui, M. 1990. Functional characterization of lymphocyte response to fractionated house dust mite antigens (*Dermatophagoides pteronyssinus*) in atopic and non-atopic individuals. Immunology. **70**:385-390.

Krillis, S., Baldo, B.A., Sotton, R., Basten, A. 1984. Antigens and allergens from the common house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Part I. Demonstration of multiple allergens by immunochemical and biologic analyses. J. Allergy Clin. Immunol. **74**:132-141.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

Lind, P., Korsgaard, J., Lowenstein, H. 1979. Detection and quantification of *Dermatophagoides* antigens in house dust by immunochemical techniques. Allergy. **34**:319-326.

Lind, P. 1986. Enzyme-Linked Immunosorbente Assay for determination of major excrement allergens of house dust mite species *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *D. microceras*. *Allergy*. 41:442-451.

Lombardero, M., Heymann, P.W., Platts-mills, T.A.E., Fox, J.W., Chapman, M.D. 1990. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. *J. Immunol.* 144:1353-1360.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Mariani, F., Price, J.F., Kemeny, D.M. 1992. The IgG subclass antibody response to an inhalant antigen (*Dermatophagoides pteronyssinus*) during first year of life; evidence for early stimulation of the immune system following natural exposure. *Clin. Exp. Allergy*. 22:29-33.

McHugh, S.M., Lavelle, B., Kemeny, D.M., Patel, S.M., Ewan, P.W. 1990. A placebo controlled trial of immunotherapy with two extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG and IgG subclasses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:521-532.

Nakagawa, T., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Miyamoto, T., Skvaril, F. 1983. IgG4 antibodies in Patients with House-Dust-Mite Sensitive Bronchial Asthma: Relationship with Antigen Specific Immunotherapy. *Int. Archs. Allergy Clin Immunol.* 71:122-125.

ESTA TESIS NO DEBE  
DE IR

Nakagawa, T., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Miyamoto, T., Skvaril, F. 1987. IgG4 antibodies in Patients with House Dust Mite Sensitive Bronchial Asthma: Relationship with Antigen Specific Immunotherapy in Patients with Perennial Rhinitis. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 82:95-99.

Nakata, S., Saito, A., Yasueda, H., Shinoda, T., Nakagawa, T., Haida, M., Ito, K., Miyamoto, A. 1989. Measurement of IgE, IgG1 and IgG4 antibodies against gel filtration fractions and purified allergens of the house dust mite by the enzyme antibody method. *J Allergol.* 38:9-15.

Novoa, A.D. 1975. Acaros del polvo en la República Mexicana. *Alergia XXII*:59-77.

O'Hehir, R., Young, D., Kay, A.B., Lamb, J. 1989. Clonal Analysis of the Cellular Immune Response to the House Dust Mite *Dermatophagoides farinae*. *Int. Archs. Allergy Clin. Immunol.* 89:1021-1031.

Ohman, J.L. 1989. Allergen immunotherapy in asthma: evidence for efficacy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84:133-140.

Oshika, E., Kuroki, Y., Saklyama, Y., Hatsumoto, S. 1992. Measurement of IgG subclass antibodies to the group II antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der pII) in sera from children with bronchial asthma. *Ann. Allergy* 69:427-432.

Pepys, J., Chan, M., Hargreave, F.E. 1968. Mites and house dust allergen. *Lancet* 1:1270-1272.

Platts-Mills, T.A.E. 1988. La importancia de los alérgenos dentro de la casa para el tratamiento del asma. *Alergia e Inmunología*. 2:62-66.

Platts-Mills, T.A.E., de Weck, A.L. 1989. Dust mite allergens and asthma. A worldwide problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:416-427.

Saito, Ch., Nishioka, K., Ishii, A., Ohta, N., Masuda, Y. 1992. IgE, IgG and IgG4 Antibody Titers to Fractionated House Dust Mite Antigens in Nasal Allergy Patients. *Acta Med. Okayama*. 46:93-101.

Servin, V.R. 1979. Estudio de *Dermatophagoides pteronyssinus* (acarina *pyroglyphidae*) en el Distrito Federal y su relación con alergias al polvo doméstico. Tesis de la carrera de Biología de la ENCB-IPN, México, D.F.

Stewart, G.A., Bucher, A., Less, K., Ackland, J. 1985. Immunochemical and enzymatic analysis of extracts of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77:14-23.

Stewart, G.A., Dowse, G.K., Turner, K.J., Alpers, M.D., Nisbet, A. 1988. Isotype specific immunoglobulin responses to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and the purified allergen Der p1 in asthmatic and control subjects from the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Clin. Allergy*. 18:235-243.

Stewart, G.A., Thompson, P.J., Simpson, R.J. 1989. Protease antigens from house dust mite. *Lancet*. 15:154-155.

Stewart, G.A., Ward, L.D., Simpson, R.J., Thompson, P.J. 1992. The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. *Immunology*. **75**:29-35.

Soliman, M.Y., Rosennstreich, D.L. 1986. Natural immunity to dust mites in adults with chronic asthma, mite-specific serum IgG and IgE. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**:962-968.

Sparholt, S.H., Olsen, O.T., Sechovic, C. 1992. The allergen specific B-cell response during immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy*. **22**:648-653.

Thompson, S.J., Carswell, F. 1988. The major Allergen of House Dust Mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, Is Synthesized and Secreted into Its Alimentary Canal. *Int. Archs. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 312-315.

Thomas, W.R. 1993. Mite allergens groups I-VII. A catalogue of enzymes. *Clin. Exp. Allergy*. **23**:350-353.

Tovey, E.R., Chapman, M.D., Plattts-Mills, T.A.E. 1981. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*. **289**:511-517

Tovey, E.R., Baldo, B.A. 1984. Standardization of allergens. Qualitative definition of house dust mite extracts following electroblotting and detection of components with antibody and lectine probes. *Int. Archs. Allergy Clin. Immunol.* **75**:322-329.

Tovey, V.R., Baldo, B.A. 1987. Comparison by electroblotting of IgE binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79:93-102.

Towbin, H.T., Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 76:4350-4354.

van Bever, H.P., Bridts, C.H., Moens, H.M., de Rijck, T.E., Mertens, A.V., Declerk, L.S. Strevens, W.J. 1993. Lymphocyte transformation test with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) in normal children, asthmatic children and asthmatic children receiving hiposensitization. *Clin. Exp. Allergy.* 23:661-668.

van der Zee, J.S., van Swieten, P., Aalberse, R.C. 1986. Serologic Aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 Antibodies form Small Nonprecipitating Immune Complexes Due to Functional Monovalency. *J. Immunol.* 137:3566-3571

Voorhorst, R., Spieksma-Boezaman, M.I.A., Spieksma, F.T.M. 1964. Is a mite (*Dermatophagoides spp.*) the producer of the house dust allergen?. *Allergy Asthma.* 10:229-234.

Votero de la Cima, E., Margni, R.A. 1989. *Inmunología e Inmunoquímica*. 4a edición. Editorial Medica Panamericana. Argentina. pp 339-355.

Warner, J.A. 1974. Creating optimal home conditions for the house dust mite. *Clin. Exp. Allergy.* 24:207-209.

Whan, U., Schweter, C., Lind, P., Lowenstein, H. 1988. Prospective study on immunologic changes induced by two different *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts prepared from whole mite culture and mite bodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**:360-369.

Wierenga, E.A., Snoek, M., Bos, J.D., Jansen, H.M., Kapsenberg, M.I. 1990. Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors. *Eur. J. Immunol.* **20**:1519-1526.

Yamashita, N., Haida M., Suko, M., Okudaira, H., Miyamoto, T. 1989. Allergens of the House Dust Mite *Dermatophagoides farinae*. II. Immunological Characterization of Four Allergenic Molecules. *Int. Archs. Allergy Clin. Immunol.* **88**:173-175.

Zendejas, B.V.M. 1996. Reconocimiento de antígenos de un ácaro del polvo casero por sueros de pacientes alérgicos y de sus convivientes. Tesis de doctorado en la especialidad de inmunología. E.N.C.B.-I.P.N.

## VII. APENDICE

Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de ELISA.

### 1) Regulador de recubrimiento

Regulador de carbonato bicarbonato 0.1M, pH 9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.50 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	1000 ml

### 2) Reguladora salina fosfatos PBS 10X, 0.1M, pH 7.4

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	29 g
KCl	2 g
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	1000 ml

### 3) Regulador de lavado PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T)

PBS 10X	100 ml
Tween 20	0.5 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	1000 ml

### 4) Regulador de bloqueo

Leche descremada "Sveltes"	2 g
PBS 10X	10 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	100 ml

### 5) Regulador de fosfatos citrato, pH 5.0

Acido cítrico 0.1 M	24.3 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2 M	25.7 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	100 ml

### 6) Diluyente de sueros y conjugado

PBS-T (3)

7) Solución de sustrato

Regulador de citratos	25 ml
orto-fenilendiamina	10 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	10 µl

Preparar al momento de usarse y mantenerlo en oscuridad

8) Material y equipo para desarrollar la técnica.

\*Microplacas removibles de 12 pozos con fondo plano de la marca "Immulon II".

\*Lector de microplacas Labsystems Multiskan Plus.

\*Estufa bacteriológica a 37°C.

Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de electroforesis (SDS-PAGE)

1) Solución de monómeros

Acilamida	30 g
Bis-acilamida	0.8 g
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	100 ml

Filtrar y guardar en la oscuridad a 4°C

2) Regulador del gel de separación Tris HCl 1.5M, pH 8.8

Trizma base	18.165 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	90.0 ml
Ajustar pH y llevar al aforo	100.0 ml

Filtrar y guardar en la oscuridad a 4°C

3) Regulador del gel de concentración Tris HCl 0.5M, pH 6.8

Trizma base	18.165 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	40.0 ml
Ajustar pH y llevar al aforo	50.0 ml

Filtrar y guardar en la oscuridad a 4°C

4) Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%

SDS	10 g
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	100 ml

5) Persulfato de amonio (PSA) al 10%

PSA	10 mg
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	100 µl

Preparar al momento de usarse

6) Regulador de corrimiento Tris 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1%

Trizma base	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10.0 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada cbp	1000 ml

7) Regulador de muestra 2X

Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	0.5 ml

8) Material y equipo para desarrollar la técnica

\*Cámara de electroforesis marca Bio Rad (Modelo 422)

\*Fuente de poder marca Bio Rad (Modelo 200/2.0 Power Supply)