

1126-15



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
SEDE CENTRO

EXPRESION DE RNAm DE INTERLEUCINA-4 EN
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DE
PACIENTES ALERGICOS ANTES Y DESPUES
DEL RETO NASAL.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A
DAIRO MAURICIO SARRAZOLA SANJUAN

TUTOR. DR. SALVADOR MARTINEZ CAIRO-CUETO.

CO-TUTORES. D. EN C. JOSE ANTONIO ENCISO.
DRA. NELLY CISNEROS GONZALEZ.

LUGAR DE REALIZACION
SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGIA.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI. IMSS.
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR. UIMEIP.
HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A **Pilar** , por tu constante aliento y amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia Dairo, Bety, Rodrigo, Orlando , Hugo Alvarado, Omaira, Jorge Orlando y Patricia por su amor y apoyo incondicional.

A Toño Enciso por el apoyo ofrecido no solo al desarrollo de este proyecto sino a mi formación como investigador y por la amistad incondicional que me brindó, espero poder corresponderle adecuadamente.

A Mónica Madrigal y a Leonor Enciso por su colaboración en el manejo de las muestras. A la Dra Gutierrez del HGZ 1 por la remisión de los pacientes, a la Dra Isabel Castrejón por su ayuda en la obtención de las muestras. A los Doctores Ramón Paniagua, Juan Garduño, Salvador Martínez-Cairo, Gloria Calderón, Nelly Cisneros y Blanca Rivera, por la lectura crítica de este manuscrito.

A todos mis compañeros del laboratorio Norma, Hilda, Paty, Mari Carmen, Erika, Joel, Jose Juan, Nancy , Marisa y Amanda por su colaboración y amistad.

A Ivan, Ruth, Toño Paczka, Luz América, Nora Hilda y Maribel mi familia en México

A todos los pacientes que ingresaron en este estudio, por su extraordinaria generosidad al aceptar participar en este estudio sin esperar ningún beneficio personal

Mauricio Sarrazola S.

INDICE

	Página
Resumen	5
Antecedentes	6
Justificación	11
Planteamiento del problema	12
Hipótesis	12
Objetivos	12
Material y Métodos	
Universo de trabajo	13
Diseño del estudio	13
Definición operacional de las variables	14
Diseño de la muestra	15
Criterios de inclusión	15
Criterios de no inclusión	16
Criterios de exclusión	16
Tamaño de la muestra	17
Descripción del estudio	18
Esquema global de los diseños	19
Técnicas para medición de las variables	20
Separación de mononucleares	20
Extracción de RNA	20
electroforesis de RNA	21
Transcripción inversa	21
PCR de IL-4	22
Pruebas cutáneas	23
Reto nasal	24
Análisis estadístico	25
Consideraciones éticas	26
Resultados	27
Discusión	29
Tablas y Figuras	
Tabla 1	33
Tabla 2	34
Figura 1	35
Figura 2	36
Figura 3	37
Figura 4	38
Tabla 3	39
Anexos.	
Anexo 1	40
Anexo 2	41
Anexo 3	43
Anexo 4	44
Anexo 5	46
Bibliografía	47

RESUMEN

Expresión de RNAm de Interleucina 4 en mononucleares de sangre periférica de pacientes alérgicos antes y después del reto nasal. Sarrazola DM, Martínez-Cairo S, Cisneros N, Enciso JA. Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, H. Especialidades, Laboratorio de Biología Molecular, UIMEIP, H de Pediatría. CMN Siglo XXI IMSS

OBJETIVOS: 1 Medir la expresión de RNAm de IL-4 en mononucleares de sangre periférica de pacientes con rinitis alérgica sintomática expuestos a fuentes naturales de alérgenos y compararla con riniticos no alérgicos. 2. Medir la expresión de RNAm de IL-4 en mononucleares de sangre periférica antes y después del reto nasal alérgico específico. **MATERIAL y METODOS:** El diseño del estudio fue transversal comparativo para el objetivo 1 y cuasi-experimental para el objetivo 2. Se incluyeron en el estudio pacientes que fueron remitidos para valoración al servicio de Alergia e Inmunología del H. Especialidades del CMN SXXI, que dieran su consentimiento por escrito y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión 1) 16 a 45 años de edad, 2) Cualquier sexo. 3) Rinitis de mas de 2 años de evolución y 4) sintomáticos durante el último mes. No se incluyeron los pacientes con: 1) asma no controlada, 2) Uso de medicamentos que impidan en la lectura de las pruebas cutáneas o en la realización del reto nasal, 3) Inmunoterapia previa, 4) Enfermedad coronaria. A los pacientes que cumplieron los criterios mencionados, se les realizó historia clínica y examen físico completos y pruebas cutáneas intradérmicas utilizando 16 alérgenos comunes en el Valle de México, simultáneamente tomamos 10ml de sangre venosa periférica para separación de mononucleares. A los pacientes con una o mas pruebas positivas (alérgicos) se les realizó reto nasal específico con el alérgeno al que se encontraban sensibilizados, a las 24 horas del reto se tomó la segunda muestra de sangre para separación de mononucleares. Se extrajo el RNA total utilizando Trizol, y posteriormente se realizó RT-PCR con iniciadores específicos para IL-4, para un producto esperado de 260pb. El producto de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%, la fotografía del gel se analizó densitométricamente para semi-cuantificar la cantidad de RNAm expresado. Se comparó la frecuencia de expresión de RNAm de IL-4 en alérgicos vs no alérgicos utilizando Chi cuadrada, la expresión de RNAm de IL-4 antes y después del reto nasal se comparó con la prueba de Wilcoxon. Se consideró una diferencia como significativa si $p < 0.05$. **RESULTADOS:** Se encontró expresión de RNAm de IL-4 en 12/15 pacientes alérgicos comparado con 5/18 pacientes no alérgicos ($p=0.02$). La expresión de RNAm de IL-4 aumentó después del reto nasal de forma significativa, mediana de densidad óptica (OD) antes 29.15 y después 52.6, $p=0.02$. **DISCUSION.** La expresión constitutiva de RNAm de IL-4 se observa con mayor frecuencia en pacientes alérgicos que en no alérgicos, y esta expresión aumenta después de la exposición a altas dosis del alérgeno al que se encuentran sensibilizados.

ANTECEDENTES:

La reacción alérgica se caracteriza por la producción de anticuerpos tipo IgE dirigidos contra alérgenos específicos, estos anticuerpos tienen la propiedad de unirse a los receptores de alta afinidad que se encuentran en las membranas de células cebadas y basófilos ocasionando su degranulación y la consecuente liberación de mediadores que ocasionan el proceso inflamatorio típico de las reacciones de hipersensibilidad tipo I¹. Este fenómeno solo es posible si previamente el antígeno ha sido procesado y presentado al linfocito T (L.T) y se han producido las señales necesarias para la síntesis de IgE específica, por lo que se considera al LT como la célula reguladora de esta respuesta².

Recientemente se ha demostrado que en los humanos los linfocitos T colaboradores (LTh) son fundamentales en la respuesta que despierta un antígeno; es así como se han descrito diferentes subpoblaciones de LTh con base en su perfil de producción de citocinas: los LTh1 que producen interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral beta (TNF β) e interferon gamma (IFN γ); los LTh2 que producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-5 (IL-5) y los LTh0 precursores de los Th1 y Th2 y que secretan todas las citocinas mencionadas³⁻⁴.

La especialización en la producción de citocinas permite que los LTh1 regulen las respuestas de hipersensibilidad tardía e inhiban a los LTh2 a través del IFN γ y los LTh2 regulan las respuestas ante parásitos y alérgenos⁵. En pacientes alérgicos existe activación preferencial de clones de LTh2 en los sitios de la reacción, esto

se ha demostrado obteniendo LT de biopsias de mucosa respiratoria de sujetos con rinitis o asma alérgica. Las clonas identificadas mostraron proliferación y producción de citocinas tipo LTh2 al ser expuestas al alérgeno. Contrasta con lo anterior el hecho de que clonas de LT obtenidas de mucosa bronquial de pacientes con asma no alérgica al ser retadas con el alérgeno muestran un perfil de producción de citocinas tipo LTh1⁶. Este fenómeno también se ha observado en el sitio de las pruebas cutáneas y en la mucosa nasal de pacientes retados con alérgenos en el que utilizando técnicas de hibridación *in situ* se encontró RNAm que codifica para citocinas tipo LTh2⁷

De las múltiples citocinas producidas por los LTh2, es la IL-4 una de las más involucrada en la respuesta ante antígenos ambientales bioquímicamente es una glicoproteína de 129 aminoácidos y el gen que la codifica se encuentra localizado en el cromosoma 5 del humano; esta compuesto por tres intrones y cuatro exones y su cDNA tiene un tamaño aproximado de 500 pb⁸. La IL-4 fue la primera citocina identificada como factor regulador del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas al aumentar la producción de IgE e IgG₄ por las células plasmáticas humanas. Este efecto se ha observado en modelos *in vitro* que utilizan co-cultivos de LTh2, macrófagos y linfocitos B activados; éstos modelos también permitieron establecer que la IL-4 era un factor necesario para la síntesis de IgE, la evidencia se hace más contundente con el hecho de que en ratones a los que se les inyectan anticuerpos monoclonales contra IL-4 no se observa una respuesta de IgE ante antígenos parasitarios⁹. Por otro lado se ha demostrado que la incubación de linfocitos B con IL-4 induce la expresión del RNAm que codifica para la cadena

pesada de la IgE, que se correlaciona con la cantidad de IgE sintetizada posteriormente. Se ha demostrado también que el IFN γ producido principalmente por LTh1 inhibe los efectos de la IL-4 sobre la síntesis de IgE¹⁰.

Se han descrito otras acciones para la IL-4; entre ellas esta molécula induce la proliferación de linfocitos B¹¹, la expresión de moléculas del antígeno mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII)¹² y la expresión del receptor de baja afinidad para la IgE¹³. Todos estos eventos tienen implicaciones en el desarrollo y perpetuación de la respuesta alérgica.

La cinética de producción de IL-4 por linfocitos T estimulados en cultivos, alcanza su pico máximo de 16 a 24 horas después del estímulo¹⁴; sin embargo, en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos no activados obtenidos de lavado bronquioalveolar de los mismos pacientes también existen niveles detectables de IL-4, esto sugiere que el contacto natural con el alérgeno puede ser suficiente estímulo para la producción de esta citocina¹⁴.

Los estudios realizados sobre la participación de la IL-4 en la atopia *in vivo* son escasos y poco concluyentes algunos autores han conseguido medir los niveles séricos de IL-4 en suero de pacientes asmáticos atópicos y no atópicos encontrando diferencias significativas¹⁵. Sin embargo estos resultados no toman en cuenta la diferencia de edades entre los grupos comparados y únicamente evaluaron la sensibilización a un solo alérgeno (*Dermatophagoides farinae*) sin considerar la posibilidad de sensibilización a alérgenos no probados por lo que algunos de sus pacientes pudieron estar mal clasificados. En otro estudio se midió

la concentración de IL-4 sérica en 64 niños desde el nacimiento hasta los 18 meses de edad, solo en 26 casos se pudo detectar niveles elevados de IL-4. De estos, 16 desarrollaron enfermedad atópica. Este estudio tiene el inconveniente de que su porcentaje de pérdidas de seguimiento fue superior al 50%¹⁶.

La producción de citocinas puede ser detectada en el sobrenadante de cultivos celulares midiendo directamente la proteína ya sea con inmunoensayos enzimáticos o bioensayos; estos métodos tienen limitada utilidad cuando las cantidades producidas son mínimas. En la resulta más conveniente utilizar métodos moleculares como la RT-PCR que consiste básicamente en extraer el RNA total de las células de interés y posteriormente realizar una transcripción inversa para obtener DNA complementario (DNAC). Mas adelante se realiza una amplificación en cadena de polimerasa utilizando iniciadores específicos para el mensaje que se está estudiando; la amplificación ocurre de manera exponencial y es proporcional al número de mensajes iniciales en la reacción. Entre las ventajas adicionales del método se encuentran: 1) puede realizarse directamente en células aisladas de múltiples tejidos; 2) la detección de mensajes raros (1 a 10 copias por célula) y 3) el análisis de múltiples mensajes en una sola reacción^{17, 18}.

Utilizando esta metodología se ha demostrado que en células mononucleares de sangre periférica de pacientes en crisis asmática las cantidades relativas de RNAm de IL-4 son mayores que en aquellos asmáticos no atópicos, sin que exista modificación después del tratamiento con esteroides¹⁹. Estos resultados sugieren que la producción de IL-4 puede ser una característica de la atopia

Una de las enfermedades atópicas más frecuente es la rinitis, con prevalencias de 10 a 40% en adultos de 15 a 65 años de edad²⁰. Se considera que los pacientes con síntomas de rinitis y pruebas cutáneas positivas a los alérgenos presentes en su área geográfica son portadores de rinitis alérgica²¹. La fisiopatología de esta enfermedad está caracterizada por un aumento en la síntesis de IgE específica contra alérgenos ambientales, lo que ocasiona degranulación de células cebadas y liberación de mediadores inflamatorios; este fenómeno es regulado por los linfocitos Th2 a través de la producción de citocinas como IL-4²².

Una vez identificado el alérgeno implicado utilizando pruebas cutáneas es posible confirmar el diagnóstico realizando reto nasal específico con el alérgeno al que el paciente está sensibilizado; este reto reproduce los síntomas de la enfermedad y a diferencia de los retos realizados a pacientes con asma alérgica, el riesgo para el paciente es mínimo²³. Por estas características la rinitis alérgica puede constituirse en un modelo útil para estudiar el comportamiento de mediadores celulares bajo diferentes condiciones de tratamientos o de exposición a alérgenos es así como se han identificado la participación de citocinas, prostaglandinas y eosinófilos en la respuesta alérgica²².

JUSTIFICACION:

En la actualidad se considera que el balance entre las sub-poblaciones Th1-Th2 regula la respuesta inmunológica de un individuo incluyendo la respuesta a antígenos del medio ambiente y el desarrollo de enfermedades alérgicas. Estas interacciones han sido estudiadas en modelos *in vitro* pero poco se conoce sobre su comportamiento in vivo. Por esta razón consideramos de interés estudiar el comportamiento de uno de los mediadores clave en esta interacción, en sujetos caracterizados adecuadamente como portadores o no de una enfermedad alérgica y bajo diferentes condiciones de exposición al alergeno específico al que se encuentran sensibilizados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

1. ¿La expresión de RNAm de IL-4 ocurre de manera constitucional en células mononucleares de sangre periférica de los pacientes atópicos expuestos a fuentes naturales de alérgenos ambientales, comparados con adultos con rinitis no alérgica?
2. ¿Existe aumento significativo de la expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica en adultos con rinitis alérgica, después del reto nasal con el alérgeno específico al que está sensibilizado?

HIPOTESIS

1. La frecuencia de expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica de adultos con rinitis alérgica sintomática es mayor que la observada en adultos con rinitis no alérgica.
2. La expresión de RNAm de IL-4 sérica en células mononucleares de sangre periférica de adultos con rinitis alérgica es mayor después del reto nasal con el alérgeno específico que en condiciones basales.

OBJETIVOS:

1. Medir la expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica en adultos con rinitis alérgica sintomática y adultos con rinitis no alérgica.
2. Medir la expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica antes y después del reto nasal con el alérgeno específico al que está sensibilizado en adultos con rinitis alérgica.

MATERIAL Y METODOS:**UNIVERSO DE TRABAJO:**

Pacientes de 15 a 45 años con rinitis de cualquier etiología, derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social.

DISEÑO DEL ESTUDIO:**Diseño 1:** (Objetivo 1)

Transversal comparativo.

Diseño 2: (Objetivo 2)

Cuasi-experimental⁵

VARIABLES:**Diseño 1:**

Las variables de interés fueron: Diagnóstico de rinitis alérgica y no alérgica y expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica.

Diseño 2:

Variable Independiente: Reto nasal.

Variables dependientes: Expresión de RNAm de IL-4 en células mononucleares de sangre periférica.

DEFINICION CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE LAS VARIABLES:

- **Expresión de RNAm de IL-4:**

Definición conceptual:

Se consideró la IL-4 como una citocina de reconocimiento inmune sintetizada por linfocitos T, basófilos y células cebadas al contacto con alergenos y antígenos parasitarios. Así mismo es la principal reguladora de la síntesis de IgE específica²³

Definición operacional:

La expresión de RNAm de IL-4, se midió en las células mononucleares de sangre periférica, utilizando la técnica de RT-PCR¹⁷ y en el apartado de "Técnicas utilizadas para la medición de las variables".

Tipo de variable: En el objetivo 1, fue considerada como variable categórica, con escala de medición nominal (presencia o ausencia del mensaje) Para el objetivo 2 se manejó como una variable numérica, con escala de medición de intervalo, la unidad de medición serán densidades ópticas (DO).

- **Diagnóstico de rinitis:**

Definición conceptual:

La rinitis es una inflamación de la mucosa nasal caracterizada por uno o más de los siguientes síntomas: congestión nasal, rinorrea, estornudos y prurito. Cuando éstos síntomas se desencadenan por el contacto con un alergeno se conoce como rinitis alérgica²⁵

Definición operacional:

Se consideró paciente con rinitis alérgica, aquel con síntomas de rinitis en el que se demostró sensibilización con pruebas cutáneas y reto nasal positivo a por lo menos uno de los alérgenos probados²⁶. Los sujetos con PC negativas o PC positivas y reto nasal negativo se consideraron no alérgicos.

Tipo de Variable: Categórica.

Escala de medición : Nominal, dicotómica.

• **Reto Nasal:**

Definición conceptual: El reto nasal es la exposición intencional bajo condiciones controladas de un paciente al alérgeno al cuál se sospecha que es alérgico, con la finalidad de reproducir los síntomas de la enfermedad²⁷.

Definición operacional: Se aplicó el método propuesto por Clarke y cols²³

Tipo de Variable: Categórica.

Escala de Medición: Nominal dicotómica. Reto positivo o reto negativo.

DISEÑO DE LA MUESTRA:

CRITERIOS DE SELECCION:

Criterios de inclusión:

1. Pacientes de 15 a 45 años de cualquier sexo residentes en la Ciudad de México y derechohabientes del IMSS
2. Historia clínica de rinitis de por lo menos un año de evolución y sintomáticos durante el último mes.
3. Firmar la carta de consentimiento informado.

Criterios de no inclusión.

1. Inmunoterapia previa (cualquier momento y duración antes del estudio)
2. Asma no controlada
3. Uso de esteroides tópicos nasales, cromoglicato nasal o antihistaminicos nasales (levocavastina) o antihistaminicos de larga duracion (astemizol) durante el mes previo al estudio.
4. Parasitismo intestinal
5. Pacientes sin reactividad cutánea a la histamina
6. Dermografismo que impida la realización de pruebas cutaneas
7. Cualquier contraindicación al uso de adrenalina (hipertensión, enfermedad coronaria)

Criterios de exclusión:

1. Paciente que presente reacción sistémica a la aplicación de la pruebas cutáneas (urticaria generalizada, broncoespasmo, anafilaxia)

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Con base en el trabajo de Doi y cols ¹⁹, la proporción de sujetos atópicos que pueden ser positivos para RNAm de IL-4 es de 70% y la de no atópicos es de 14% por lo que la diferencia a encontrar es de 56%. Utilizando un valor de $\alpha = 0.05$ y una potencia del 80%, tenemos:

$$Z_{\alpha} = 1.96 \text{ (2 colas).}$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

$$\Delta = 0.56^{19}$$

$$n = \left[\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2\pi_1(1-\pi_1)} - Z_{\beta} \sqrt{\pi_1(1-\pi_1) + \pi_2(1-\pi_2)}}{\pi_1 - \pi_2} \right]^2 \quad 28$$

π_1 = proporción en grupo de tratamiento.

π_2 = proporción en grupo control.

El tamaño de muestra obtenido es menor a 10 pacientes por grupo.

Para el segundo objetivo utilizando la variable como continua para una diferencia de 36 DO¹⁵ y con el mismo nivel de confianza y poder que en el cálculo anterior:

$$n = 2 \left| \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{\mu_1 - \mu_2} \right| \quad 28$$

$n = 12$ pacientes por grupo.

Tipo de Muestreo:

No probabilístico, consecutivo.

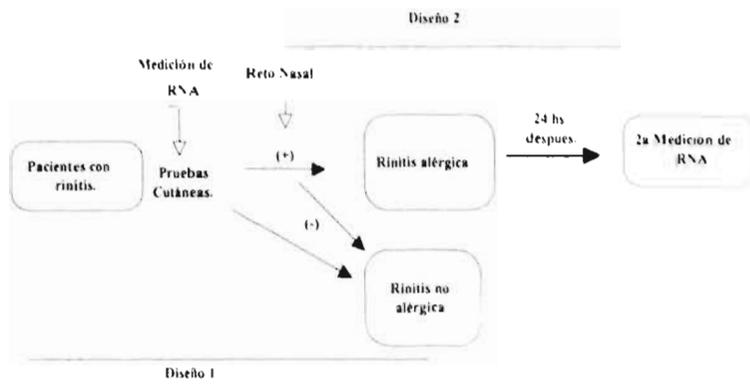
DESCRIPCION DEL ESTUDIO:

Los pacientes remitidos al servicio de Alergia e Inmunología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI y al de Otorrinolaringología del Hospital General de Zona #1 con síntomas de rinitis, se consideraron candidatos a participar en el estudio. Si cumplían con los criterios de selección, se invitaron a participar en el estudio y a firmar la carta de consentimiento informado (ANEXO 1).

1) A partir de ese momento se seguimos el siguiente procedimiento:

1. Historia clínica y solicitud de coproparasitoscópicos (serie de 3), biometría hemática e IgE sérica. De no encontrarse parasitado se citó para continuar el estudio. (ANEXO 2)
2. Se tomaron 10 cc de sangre total y se colocaron en un tubo con anticoagulante, en las siguientes 2 horas, se realizó la separación de mononucleares utilizando la técnica de gradiente de centrifugación. Los mononucleares fueron almacenado a -70°C hasta el momento de ser procesados
3. Pruebas cutáneas por método intradérmico.
4. A los pacientes con pruebas cutáneas positivas se les realizó reto nasal específico de acuerdo con el resultado de las pruebas cutáneas. Si el reto nasal fue negativo el paciente se consideró no alérgico.
5. Los pacientes con pruebas cutáneas y reto nasal positivos se citaron 24 horas después del reto nasal para obtener la segunda muestra de sangre, que se procesó y almacenó en las mismas condiciones que la primera.
6. Los datos fueron recabados en una hoja de captación de datos (ANEXO 3) y vaciados a una base de datos construida en el programa SPSS[®].

Esquema global de los diseños:



TECNICAS UTILIZADAS PARA LA MEDICION DE LAS VARIABLES:

- ***Separación de linfocitos de sangre periférica:***

La obtención de mononucleares de sangre periférica se realizó mediante la técnica de separación en gradiente de centrifugación en Lymphoprep® (Nycomed Oslo, Noruega). Los 10 ml de sangre periférica se mezclaron con un volumen igual de solución salina isotónica (NaCl al 0.9%), se colocó la muestra en el gradiente y se centrifugó a 1000g durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la interfase celular entre el plasma y el Lymphoprep® y se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS1X) (Anexo 4) por centrifugación a 1.500g durante 5 minutos a 4°C.

Se valoró la viabilidad y el conteo celular por exclusión con azul de tripano (1:20 v/v) por microscopía óptica, aproximadamente 1×10^7 células se resuspendieron en 1 ml Trizol® (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA) y se congelaron a -70°C hasta el momento de ser procesados.

- ***Extracción de RNA:***²⁹

Los células mononucleares suspendidos en Trizol® (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA), se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente homogenizándose en presencia de 200 µl de cloroformo al 100% (JT Baker, México) con agitación vigorosa durante 5 segundos. La fase acuosa obtenida por centrifugación a 10.000g a 4°C durante 15 minutos, se recuperó y se mezcló con 700 µl de cloroformo al 100%, posteriormente se centrifugó a 10.000g durante 5 minutos. La fase acuosa conteniendo el RNA fue precipitada por incubación durante 30

minutos a 4°C con un volumen igual de isopropanol (Sigma, San Louis, MO, USA) frío. La pastilla de RNA total obtenida por centrifugación a 10 000g por 5 minutos a 4°C se lavó con 800 µl de etanol (Sigma, San Louis, MO, USA) al 75%, posteriormente se resuspende en amortiguador TE (Anexo 4). La cuantificación del RNA se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, EUA) con lecturas a 260 y 280 nm de DO, considerando como nivel mínimo aceptable de pureza una relación OD260:OD280 superior a 1.9.

Electroforesis de RNA:³⁰

Para verificar la integridad del RNA extraído, se colocaron de 1 a 1.5 µg de RNA solubilizado en amortiguador de muestra para RNA 1X (Anexo 4) en un gel de agarosa al 1.5% (BioRad California, EUA) conteniendo formaldehído 0.66M y MOPS 1X (Anexo 4) y se realizó electroforesis de las muestras en una cámara horizontal Stratagene® (La Jolla, CA, EUA) a 77v durante 1 hora, utilizando como amortiguador de corrida MOPS 1X. Para la visualización del RNA el gel se tiñó en una solución de 5 µg/ml de bromuro de etidio durante 5 minutos, esto permitió la verificar la integridad de las bandas de 28S y 18S.

• ***Obtención de DNA complementario (DNAc):***

Para la obtención del DNAc se utilizó la metodología propuesta por Doi y Cols¹⁴ con algunas modificaciones. La transcripción inversa se realizó colocando 2 µg de RNA total en un volumen final de 40 µl, con amortiguador de transcriptasa inversa 1X (Anexo 4), RT-M-MuLV® (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) 40 U por reacción, oligo dT 2µM, hexámeros 5ng/µl (Promega, Madison, EUA),

0.025X de RNasin[®] (Promega, Madison, EUA), incubando a 37°C durante 60 minutos y posteriormente 94°C durante dos minutos

• **PCR para IL-4:**

Se utilizó el método de Doi y Cols¹⁹ con algunas modificaciones. Una alícuota de 3 µl del cDNA obtenido se colocó en un volumen final de 25 µl conteniendo, amortiguador reacción para PCR 1X (Anexo 4), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2mM de cada dNTPs, 1.25 µM de cada iniciador específico (Tabla 1) y 0.6 U por reacción de Taq polimerasa (Tecnologías Universitarias, México) Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min. 15 seg.; posteriormente se realizaron 35 ciclos que constaban de una fase de desnaturalización a 94°C por 45 seg., alineamiento a 65°C durante 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos. Finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos. En todas las amplificaciones se utilizó un termociclador Perkin Elmer GeneAmp system 9600 (San José, Cal, EUA) Todas las muestras se corrieron por duplicado en la misma reacción.

Los productos de amplificación (5 µl) se sometieron a electroforesis en agarosa al 2% (Bio Rad, CA, EUA) con 2% de TAE 50X (Anexo 4), durante 1 30 hrs a 77v utilizando como amortiguador de corrida TAE 1X y se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 5 minutos

Para evaluar la amplificación de cDNA de IL-4 en condiciones de amplificación exponencial, se realizó adicionalmente otra amplificación durante 30 ciclos a las temperaturas ya descritas. Los productos de amplificación obtenidos se

sometieron a electroforesis en agarosa al 2% (Bio Rad) y se tiñeron con una solución de Syb Green® (1:10.000 v/v) realizándose posteriormente análisis densitométrico para medir las diferencias de concentración en cada banda utilizando un densitómetro Molecular Dynamics y el programa de análisis de imágenes Image Quant® (Moléculas Dynamics, EUA). Para las amplificaciones de control se utilizó DNAc de IL-4 donado por el Dr Chris Benyon, (Southampton General Hospital, UK). En las amplificaciones de las muestras clínicas se utilizó el juego de iniciadores para obtener un producto de 260pb.

• **Pruebas cutáneas:**

Previa asepsia se realizaron por la técnica intradérmica, aplicando 0.1cc de *D pteronyssinus*, *D farinae*, *Heliantus annus*, *Chenopodium album*, *Salsola pestifer*, *Phleum pratense*, *Fraxinus americanus*, *Quercus Spp*, *Ambrosia eliator*, *Pinnus spp*, *Penicilium spp*, *Helmintosporium*, *Alternaria*, y *Cladosporium*, *Felis domesticus* y epitelio de perro a una concentración 1:1.000 p/v. en la cara externa del brazo. Como control negativo se utilizó solución de Evans (diluyente de los extractos) y como control positivo histamina en concentración 1:10.000 p/v. De todas las pruebas se obtuvo el área de eritema marcando el contorno en la piel del paciente con un marcador fino, transfiriéndose este contorno a papel transparente, sobre el papel se trazó el diámetro mayor y perpendicular a éste el diámetro menor, se sumaron dividieron entre 2 obteniéndose el diámetro de prueba. Su interpretación se basa en la comparación con los diámetros obtenidos por el mismo procedimiento en los controles positivos y negativos¹¹.

Diámetro prueba = o < al control negativo.	NEGATIVA
Diámetro prueba de 1 al 25% del control (+)	UNA CRUZ (+)
Diámetro prueba >25% y < del 50% del control (+)	DOS CRUCES (++)
Diámetro prueba >50% al 100% del control (+)	TRES CRUCES (+++)
Diámetro prueba > 100% del control (+)	CUATRO CRUCES (++++)

Se consideró positiva aquellas pruebas con tres o más cruces reactividad

Para evaluar la consistencia entre observadores se calculó el coeficiente de Kappa³² (ANEXO 5).

- **Reto nasal:**

El reto nasal se realizó bajo supervisión médica directa:

1. Se instruyó al paciente para que sonara su nariz y eliminar toda la secreción presente.
2. Durante 5 minutos el paciente respiró en forma normal e indicó cual de las narinas estaba más obstruida. En la más obstruida se instiló 0.1 ml de solución de Evans (diluyente de los extractos acuosos) sobre los cornetes medios e inferiores sirviendo como control.
3. En la narina opuesta se instiló 0.1 ml de extracto acuoso del alérgeno al que resultó positivo en las pruebas cutáneas, utilizando una concentración de 500 UA/ml. Se consideró respuesta positiva si el paciente presentó más de 4 estornudos o si la narina retada se obstruyó más que la control acompañada de edema de cornetes al examen con rinoscopia anterior. De resultar negativa al

siguiente día se retó nuevamente utilizando una concentración de 1 000 UA/ml si no se presentó respuesta el reto nasal se registrará como negativo

4 Una vez se obtuvo respuesta positiva, el reto nasal se revirtió instilando en la narina afectada fenilefrina 0.1% ²³.

El reto nasal se realizó bajo supervisión médica permanente y en todos los casos fue ejecutado por el investigador.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La concordancia inter-observador para las pruebas cutáneas y el reto nasal se realizó utilizando el índice de concordancia kappa. Para el resumen de los datos dicotómicos se utilizaron frecuencias simples, los datos de densitometría para IL-4 no adoptaron distribución normal y se resumieron con medianas y rangos. Se utilizó la prueba de chi cuadrada para la comparación de las variables nominales y para las cuantitativas la prueba de Wilcoxon. Se realizaron correlaciones independientes entre los niveles de expresión de IL-4 antes del reto y después del reto con los niveles séricos de IgE total utilizando la prueba de Spearman. Las hipótesis nulas se rechazaron cuando el valor p fue inferior a 0.05. En el análisis de resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS 6® (SPSS, Chicago, EUA). Adicionalmente se construyó un modelo de regresión logística con selección hacia adelante para evaluar el efecto de aquellas variables que se encontraron distribuidas de manera desigual entre los pacientes alérgicos y no alérgicos; en este modelo la variable dependiente fue el diagnóstico de rinitis alérgica y las

variables independientes fueron aquellas que en el análisis bivariado alcanzaron diferencias estadísticamente significativas

CONDISERACIONES ETICAS.

El proyecto fue sometido a evaluación por el comité de investigación del Hospital de Especialidades de Centro Medico Nacional Siglo XXI, del IMSS, N° de registro 020/96, N° registro IMSS 96-716-0023. Todos los pacientes fueron informados del objetivo y los riesgos que implicaba su participación y dieron su consentimiento por escrito. Se garantizó la confidencialidad de los resultados obtenidos.

RESULTADOS:

Características de los pacientes:

Ingresaron al estudio 35 pacientes, 15 resultaron alérgicos (pruebas cutáneas y reto nasal positivo) y 18 no alérgicos (3 de ellos con pruebas cutáneas positivas y reto nasal negativo), dos pacientes fueron excluidos del estudio por presentar urticaria después de la aplicación de las pruebas cutáneas. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 2. El alérgeno que resultó positivo con mayor frecuencia fue el *D pteronyssinus* (11/15) seguido por el *D farinae* (7/15) y *F. americanus* (3/15).

Obtención y rendimientos de RNA.

La cantidad total de RNA obtenido a partir de 1×10^7 células en los sujetos no alérgicos fue de 5.45 μg y en los alérgicos de 6.8 μg . En la Figura 1 se muestra la electroforesis realizada bajo condiciones desnaturalizantes, observándose que las bandas de 18S y 28S del RNA ribosomal presentaban alto grado de integridad.

Obtención de control positivo de amplificación de IL-4.

Se utilizaron 3 juegos de iniciadores para la amplificación de IL-4 (Tabla 1). Los productos obtenidos con éstas combinaciones y su ubicación dentro del DNAC de IL-4 se muestran en la Figura 2. Para la selección de las combinaciones se tomó en cuenta que los iniciadores se encontraran en exones diferentes y así evitar la amplificación de DNA genómico que pudiera estar contaminando las muestras.

Resultados de la amplificación de IL-4 en pacientes con rinitis alérgica y no alérgica.

Se detectó amplificación para IL-4 en 12 de las 15 muestras provenientes de pacientes alérgicos comparado con 5 de 18 pacientes no alérgicos ($p= 0.002$; Chi cuadrada).

Amplificación semi-cuantitativa de IL-4 en pacientes alérgicos antes y después del reto nasal específico:

Para detectar las diferencias en las concentraciones iniciales del sustrato se realizó una curva de amplificación partiendo de 20 μg de DNAC control de IL-4, y deteniendo la reacción a 20, 25, 30 y 35 ciclos. Bajo nuestras condiciones la concentración de producto amplificado aumenta progresivamente hasta ciclo 30, por esta razón las amplificaciones para semi-cuantificación de IL-4 se realizaron a 30 ciclos (Figura 3).

La mediana para el volumen densitométrico de las amplificaciones realizadas antes del reto nasal fue de 29.15 (Rango 135,9) comparado con 52,6 (Rango 164,9) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.02$, Prueba de Wilcoxon) (Figura 4).

DISCUSION:

Este estudio se realizó con el fin de determinar si la expresión de RNAm de IL-4 en pacientes riniticos era detectable bajo condiciones de exposición natural a alergenios ambientales y si era posible incrementar esta expresión exponiendo a los pacientes al alergenio al que se encontraban sensibilizados.

Nuestros resultados muestran una mayor frecuencia de expresión de RNAm de IL-4 en los pacientes con rinitis alérgica cuando se compararon con los riniticos en los que no se pudo establecer etiología alérgica.

Para evitar que nuestros resultados fueran atribuidos a factores modificadores de la respuesta de IL-4 como la edad, se seleccionaron únicamente pacientes entre 16 y 45 años ya que se ha demostrado que por encima de los 50 años la producción de esta citocina declina progresivamente³³⁻³⁴. Otro factor confusor que evitamos fue el tratamiento con esteroides o inmunoterapia alergenio especifica, intervenciones que se han asociado a modificaciones en capacidad de producción de IL-4³⁵⁻³⁶. La presencia de RNAm para citocinas como la IL-4 ha sido demostrada en biopsias de mucosa nasal de pacientes con sinusitis crónica alérgica y este patrón de producción es claramente diferente del observado en no alérgicos donde predomina la expresión de RNAm IFN γ citocina que caracteriza la respuesta tipo Th1³⁷. Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones y aportan información adicional ya que en esta ocasión se demuestra que el fenómeno es evidente no solo en el órgano blanco sino a nivel sistémico sin necesidad de cultivo y estimulación in vitro de los linfocitos y bajo condiciones

naturales de exposición; este resultado no ha sido reportado previamente en la literatura.

Debemos señalar que en tres pacientes con rinitis alérgica no pudimos detectar expresión de RNAm de IL-4 y que este mensaje si fue detectado en 5 de los sujetos no alérgicos, aunque este comportamiento ha sido demostrado en otros estudios utilizando el mismo método de medición de citocinas¹⁹; esto sugiere la presencia de otros factores que intervienen en la síntesis de citocinas tipo Th2 en los pacientes alérgicos. Para explorar este aspecto se creó un modelo de regresión logística incluyendo como variable dependiente la presencia o no de rinitis alérgica y como variables independientes aquellas que alcanzaron diferencias significativas en el análisis bivariado, estas variables fueron a) niveles de IgE sérica total ($p=0.008$); b) tiempo de evolución de los síntomas al ingresar al estudio ($p= 0.005$); c) positividad de la RT-PCR para il-4 ($p=0.002$) y d) antecedentes familiares de asma ($p=0.007$). En el modelo obtenido el antecedente familiar de asma confiere riesgo elevado para la presencia de rinitis alérgica (RM 25.49; IC 95% 19.27 a 31.71) (Tabla 3). Este resultado indica que existe un componente genético importante en la predisposición a enfermedades con un fondo común alérgico como la rinitis y el asma bronquial como ha sido reportado previamente; nosotros no estudiamos la participación del medio ambiente por lo que se deben interpretar con cautela estas conclusiones

También pudimos observar un cambio en lo niveles de expresión de RNAm de IL-4 a nivel periférico en los sujetos alérgicos después del reto nasal, esto nos indica que aunque es detectable la producción de este mensajero en condiciones

de exposición natural, existe capacidad de aumentarla al ser estimulados con una dosis alta del alérgeno al que se encuentran sensibilizados, este comportamiento está descrito *in vitro* en cultivo de clonas de linfocitos obtenidos de mucosa nasal de pacientes atópicos, que se estimulan con alérgenos y células presentadoras de antígeno¹⁴.

Aunque la relación entre síntesis de IL-4 e IgE ya ha sido establecida *in vitro*³⁶ la correlación entre la expresión de RNAm de IL-4 antes y después del reto con los niveles séricos de IgE total en suero de los sujetos alérgicos $r = 0.29$ ($p=0.12$) y $r = 0.17$ ($p=0.25$) respectivamente, no fueron estadísticamente significativas. Este resultado pudo haberse debido a que las modificaciones en las concentraciones de anticuerpos se observan aproximadamente 10 días después del aumento en la IL-4³⁶, periodo que nosotros no estudiamos o a que medimos IgE total y no específica al alérgeno probado. Al calcular el tamaño de muestra necesario para alcanzar significancia estadística a estos niveles de correlación se requiere de incluir aproximadamente 100 pacientes en el estudio.

Los resultados de nuestro trabajo muestran claramente que en condiciones de exposición natural a alérgenos los pacientes con rinitis alérgica expresan con mayor frecuencia el RNAm para IL-4, citocina reguladora de la síntesis de IgE, que este fenómeno puede ser detectado a nivel sistémico en células mononucleares no estimuladas y que la expresión aumenta después de la exposición a dosis elevadas del antígeno a que se encuentra sensibilizado el sujeto. todos nuestros resultados apoyan la existencia de un fuerte componente genético que predispone al desarrollo de enfermedades alérgicas y concuerda con

hallazgos recientes en los que se demuestra que existe asociación entre polimorfismos en los promotores de el gen de IL-4 y la prevalencia de diagnóstico de atopia³⁹ el aumento de la expresión de RNAm observado en nuestros pacientes puede ser el reflejo de estas alteraciones en el DNA genómico.

Con base en estas observaciones consideramos importante establecer la presencia de estas alteraciones funcionales de la respuesta inmune antes del desarrollo de la enfermedad clínica, esto podría ser posible estudiando grupos de pacientes desde el nacimiento con diferentes antecedentes familiares en cuanto a atopia, y establecer la relación temporal entre regulación anómala de linfocitos Th1-Th2 y desarrollo de enfermedad alérgica.

TABLA 1.

Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para IL-4 y tamaño aproximado de los productos esperados de cada combinación.

Tamaño esperado	Iniciadores
PCR 1 456 pb.	Iniciador 5' ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT Iniciador 3' CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT
PCR 2. 260 pb.	Iniciador 5' (biotinilado) GCCTCCAAGAACACAACACTGAGAAGG Iniciador 3' CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT
PCR 200 pb	Iniciador 5' ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT Iniciador 3' TCTCAGTTGTGTTCTTGGAG

TABLA 2.

Características relevantes de los pacientes riniticos incluidos en el estudio.

	Riniticos no alérgicos. n=18	Riniticos alérgicos. n=15.
Sexo. (M/F)	11/7	7/8
Edad. (años)	27.6 (\pm 7.4)	25.4 (\pm 9.1)
Dx de asma	1/18	4/15
Evolución de los síntomas. (años).	3.1 (\pm 1.22)	4.7 (\pm 1.4)
Antecedentes familiares de asma.	1/18 (3%)	9/15 (27.3%)
Antecedentes familiares de alergia.	7 (38.9%)	12 (80%)
Antecedentes personales de alergia.	2 (11.1%)	5 (33.3%)
IgE sérica total. (UI/ml)	67.5 (\pm 44.9)	117 (\pm 49.5)

Figura 1

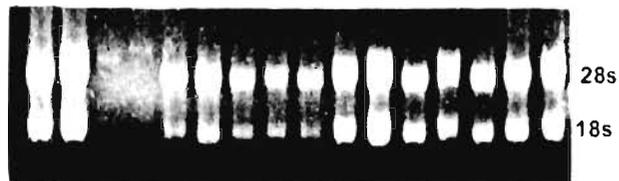


Fig 1 Electroforesis de 1.5 μ g de RNA total obtenido de mononucleares de sangre periférica de pacientes con rinitis alérgica y no alérgica. Gel de agarosa al 1.5%, formaldehído 0.66M y MOPS 1X

FIGURA 2

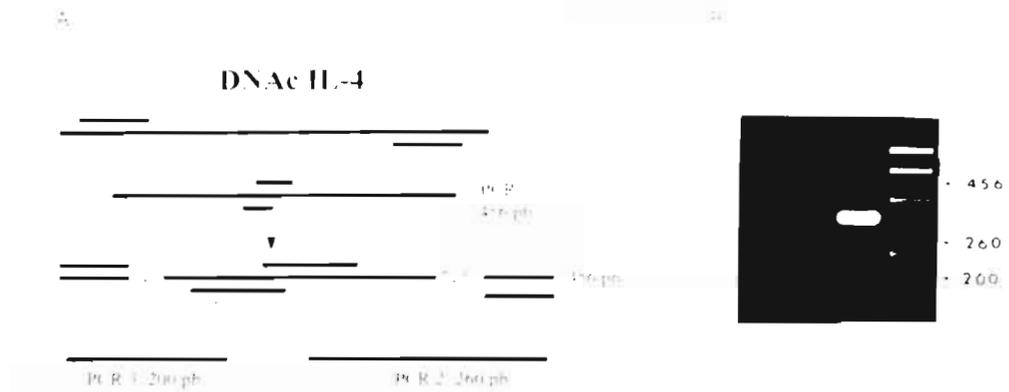


Figura 2. Mapa de las regiones de amplificación por PCR de cDNA para IL-4 utilizando tres combinaciones de iniciadores específicos descritos en la Tabla 2. En el recuadro mostramos el traslapamiento de los iniciadores internos, que dan origen a los productos de 200 y 260 pb. B) Gel de los productos de amplificación descritos.

Figura 3.

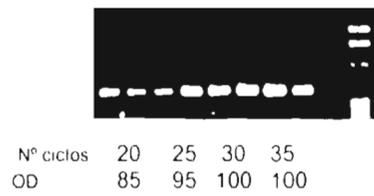


Figura 3 PCR de 20 ng de DNAc de IL-4 deteniendo la reacción a 20, 25, 30 y 35 ciclos La cantidad de producto amplificado aumenta hasta el ciclo 30 medido por densitometria (OD)

Figura 4.
Análisis densitométrico de los de la expresión de RNAm de IL-4 en pacientes alérgicos antes y después del reto nasal.
(Prueba de Wilcoxon ; $p=0.002$)

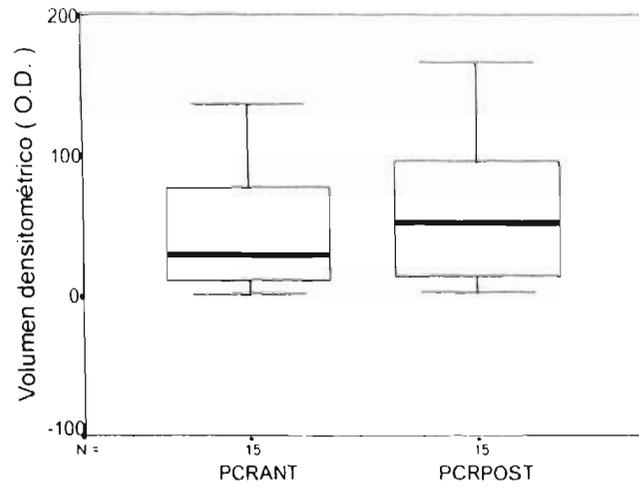


Figura 4.
Análisis densitométrico de los de la expresión de RNAm de IL-4 en pacientes alérgicos antes y después del reto nasal.
(Prueba de Wilcoxon ; $p=0.002$)

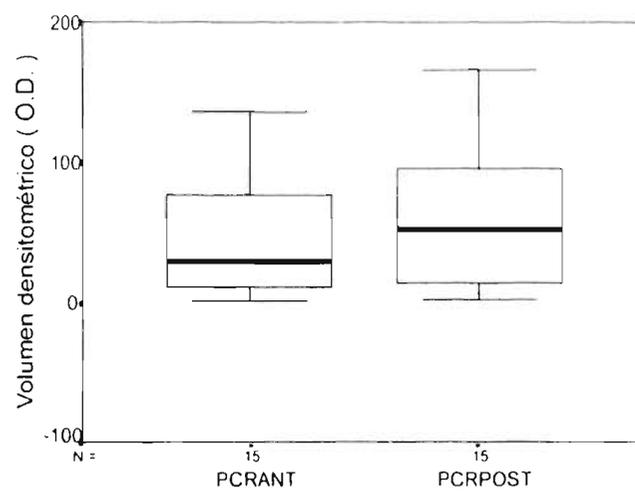


TABLA 3

Modelo de regresión logística

Variables	β	EE	RM	IC 95%	p
Ant. familiar de asma	3.238	1.156	25.49	19.27 a 31.71	0.005
Constante	-1.041	0.479			0.028

Significancia del modelo: $\chi^2=12.57$; $p=0.0004$

Regresión logística para presencia o ausencia de rinitis alérgica. las variables independientes fueron: antecedente familiar de asma, IgE sérica total, RT-PCR positiva para IL-4 y tiempo de evolución de los síntomas.
EE (error estándar). **RM** (razón de momios).

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INVESTIGADOR

Dr Dairo Mauricio Sarrazola Sanjuan Servicio de Alergia e Inmunología Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS TEL. 6276900 ext 1423

PROPOSITO DEL ESTUDIO

Este estudio pretende investigar el comportamiento de algunas de las sustancias que controlan la reacción alérgica. Los resultados de este trabajo podrían ayudar a comprender cómo se produce la enfermedad.

PROCEDIMIENTO

- 1 Debo responder a una historia clínica y a un examen físico detallado
- 2 Me realizarán pruebas cutáneas para identificar a que soy alérgico, de ser positivas me realizarán una prueba de reto nasal, que consiste en aplicar en la nariz el alérgeno al que resulte positivo para confirmar el diagnóstico
- 3 Me tomarán una muestra de 10 ml de sangre venosa en la primera visita, de ser positivo el reto nasal 24 horas después de éste me tomarán una segunda muestra de sangre de 5 ml

RIESGOS

La toma de las muestras de sangre representa un riesgo mínimo para mi salud. El procedimiento de pruebas cutáneas es el que usualmente realizan para el diagnóstico de mi padecimiento. El reto nasal tiene como riesgo principal la reaparición de los síntomas y en algunas raras ocasiones síntomas alérgicos severos. Se me garantiza vigilancia constante durante todo el procedimiento por parte de un médico capacitado para manejar las complicaciones y la disponibilidad de equipo adecuado durante todo el procedimiento.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida en este estudio será utilizada en publicaciones científicas, en ningún caso se revelará mi identidad.

El investigador o su asistente estarán a mi disposición para responder cualquier pregunta sobre el proyecto.

Mi participación en este estudio es absolutamente voluntaria y soy libre de retirarme en cualquier momento del estudio, sin que por esto se vea afectada la calidad de mi atención en el IMSS.

Yo estoy de acuerdo en participar en este estudio, se me ha dado una copia de este documento y pude leerlo detenidamente antes de tomar mi decisión.

FIRMA DEL PACIENTE: _____ Fecha: _____

FIRMA DEL TESTIGO: _____

FIRMA DEL TESTIGO: _____

FIRMA DEL MEDICO: _____

ANEXO 2.

Historia Clínica.

SERVICIO DE ALERGOLOGIA
HISTORIA CLINICA

PACIENTE: _____ FECHA: DIA MES AÑO

ANTECEDENTES FAMILIARES: Solo en abuelos, padres, hermanos, tíos o primos.**Marque con una X.**Asma: Síntomas nasales crónicos: Alergia a alimentos: Urticaria:
Alergia a medicamentos: . Dermatitis atópica:**ANTECEDENTES PERSONALES: Marque con una X.**Asma: Síntomas nasales crónicos: Alergia a alimentos: Urticaria:
Alergia a medicamentos: . dermatitis atópica: Sinusitis:
Infecciones respiratorias (bronquitis o bronquiolitis):**CONDICIONES AMBIENTALES: Marque con una X.**Casa: . Departamento: Alfombra: Perro: Gato: Aves: Plantas:
Polvo: Humedad en las paredes: Cobertores de lana: Almohada de algodón:
Uso de sprays o desinfectantes: Fumadores en casa:**SINTOMAS Y EVENTOS RELACIONADOS: Marque con una X.**Síntomas todo el año: Temporada seca: Temporada lluvias: . Con el frío:
Con el ejercicio: Al contacto con irritantes (detergentes, solventes):
Emociones: Con medicamentos: Humo del cigarrillo:
Al hacer la cama o la limpieza: Al contacto con animales:
Otros: Especifique: _____**EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD:**Tiempo en años: _____
Mejora: Empeora: Síntomas semanales: Síntomas diarios:
Síntomas mensuales: Obliga a faltar a clases:**TRATAMIENTOS RECIBIDOS: Marcar con una X.**

Inmunoterapia: Medicamentos:

Cuales: _____

Cuanto tiempo: _____

Respuesta al tratamiento. Buena: Regular: Mala:
Ha requerido hospitalizaciones por asma: Cuantas en el último año: ____
Fechas: _____

Principales síntomas: _____

Revisión de sistemas:

Ojos: _____

ORL: _____

Piel: _____

Gastrointestinal: _____

EXPLORACION FISICA:

Ojos: _____

ORL: _____

Cardiopulmonar: _____

Piel: _____

Otros: _____

- DIAGNOSTICOS:**
1. _____
 2. _____
 3. _____

ANEXO 3

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre _____ Número _____
 Dirección _____ Sexo F M Edad [] []

A) SINTOMAS Y TRATAMIENTOS

RINITIS	si	no	ASMA	si	no	Tratamientos	si	no
Rinorrea			Sibilancias			Esteroides		
Obstrucción			Disnea			Imunoterapia		
Prurito			Tos seca			Antihistaminicos		
Estornudos			Intolerancia al ejercicio			Esteroides tópicos		

Tiempo de Evolución de la rinitis _____ meses

Estacional [] Perenne [] Mixta []

B) PRUEBAS CUTANEAS

Número _____ Sexo F M Edad [] []

Alergeno	PC	Alergeno	PC

C) RETO NASAL

Número _____ Sexo F M Edad [] []

Alergeno	RETO	Alergeno	RETO

D) RNAm de IL-4

Número _____ Sexo F M Edad [] []

Basales OD Post reto OD

ANEXO 4.
SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES UTILIZADOS.

Solución amortiguadora PBS1X.

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	0.24g
H ₂ O	1 L
pH 7.4 con HCl	

Amortiguador TE:

Tris HCl	10 mM pH8.
EDTA	1mM pH8.

Amortiguador de muestra para electroforesis de RNA (NBSB):

Formamida 50%
MOPS 1X
Formaldehido 7%
Azul de bromofenol 0.1%
H₂O-DEPC aforando al volumen deseado

MOPS 10X:

MOPS	20mM
Acetato de Na	100mM.
Na ₂ EDTA	20mM

Amortiguador de transcriptasa inversa.

Tris-HCL	25mM
KCl	20mM.
MgCl ₂	3mM.
DTT	5mM
pH 8.3	

Amortiguador de reacción para PCR.

KCl 50mM

Tris-HCL pH8.3 10mM

Amortiguador de corrida para PCR (TAE 1X)

Tris-Base 0.04M

EDTA 0.001 M

ANEXO 5

CONCORDANCIA INTEROBSERVADOR EN LA REALIZACION DE PRUEBAS
 CUTANEAS INTRADERMICAS CON EXTRACTOS DE
D. pteronyssinus y *D. farinae*.

OBSERVADOR B	OBSERVADOR A		
	PRUEBA +	PRUEBA -	
PRUEBA +	27	1	28
PRUEBA -	3	22	25
	30	23	53

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

P_o= Proporción en que ambos concuerdan
 P_e= Proporción de concordancia por azar.

$$k = \frac{0.92 - 0.5}{0.5} = 0.84$$

Se consideró prueba positiva cuando el diámetro promedio del eritema del alérgeno fue > al 50% del control positivo.

BIBLIOGRAFIA:

- 1 Leung DY. Mecanismos de la respuesta alérgica humana. Clin Ped N A 1994,4:755-770
- 2 Roitt I. Hypersensitivity Type I. in Roitt I. Essential Immunology. 8ª ed. p 312-336 London 1994, Blackwell Scientific Publications
- 3 Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunology Today 1991,12:256-257
- 4 Mosmann T, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immun Today 1995,
- 5 Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. Annu Rev Immunol 1994,12:227-57
- 6 Del prete G, De Carli M, D'Ellio M. Allergen exposure induces the activation of allergen specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. Eur J Immunol 1993,23:1445-1449
- 7 Bradding P, Feather Y, Wilson S et al. Immunolocalization of cytokines in nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. J Immunol 1993,151:3853-3865
- 8 Yokota T, Otsuka T, Mosmann T et al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to murine B-cell stimulatory factor 1, that expresses B cell and T cell stimulating activities. Proc Natl Acad Sci USA 1986,83:5894-903
- 9 Coffman R, Leberman D, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. Adv Immunol 1993,54:229-270
- 10 Punnonen J, Aversa G, Cockss B, de Vries J. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. Allergy 1994,49:576-586
- 11 Beckman P, Cosman D, Fanslow, Maliszewsky C, Lyman S. The Interleukin-4 receptor: Structure, function and signal transduction. Ciem Immunol 1992,51:107-134
- 12 Rhoem N, Krammer P, Dhara J, Uhr J, Vireta E. Interleukin-4 induced increase in the expression by normal mouse B cells. J. Exp Med 1984,160:679-674

- 13 Conrad D, Waldschmidt T, Lee W, et al. Effect of B cell stimulatory factor-I (IL-4) on Fc epsilon and Fc gamma receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *J Immunol* 1987,139 2290-2296
- 14 Walker C, Bode E, Boer L, Hansel T, Blaser K, Virchow J-C. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-Cell Activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992,146 109-115
- 15 Matsumoto K, Taki F, Miura M, Matzukaki M, Takagi K. Serum levels of soluble IL2-R, IL-4 and Soluble FcεRII in adult bronchial asthma. *Chest* 1994, 105 681-686
- 16 Borres M, Einarsson R, Björkstén B. Serum levels of interleukin-4, soluble CD23 and IFN γ in relation to the development of allergic disease during the first 18 months of life. *Clin Exp Allergy* 1995, 25 543-548
- 17 Promega. *Pcr Protocols and reference guide* 1996
- 18 Gauchat JF, Gauchat D, Qiu G, Mandallaz M, Stadler B. Detection of cytokine mRNA in Polyclonally-, antigen or allergen- stimulated mononuclear cells. *Immunol Revs* 1991,119 123-35
- 19 Doi S, Gemou-Engesaeth, A, Kay, C, Corrigan. Polymerase chain reaction quantification of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute exacerbations of asthma: effect of glucocorticoid therapy. *Clin exp Allergy* 1994, 24 854-857
- 20 Sibbald B, Rink E. Epidemiology of seasonal and perennial rhinitis. Clinical presentation and medical history. *Thorax* 1991,46 895-91
- 21 Georgitis J. Diagnosis and treatment of nonallergic rhinitis. *Am J Asthma Allergy Ped* 1990,3 153-161
- 22 International Rhinitis Management Working Group International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. *Allergy* 1994,49 S1-S31
- 23 Clarke P. The diagnosis of perennial rhinitis due to house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) demostred by nasal provocation test. *Ann Allergy* 1987 59 25-28

- 24 Louis T, Lavin P, Batar J, Polansky M. Crossover and Self-Controlled designs in clinical research. *N Engl J Med* 1984; 310 :24-31
- 25 Lucerne F. Rhinitis and nasal obstruction. *Otolaryngol Clin North Am* 1989; 22 :307-23
- 26 Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology. Guidelines for the use of allergen immunotherapy. *Can Med Assoc J* 1995;152:1413-1419.
- 27 Naclerio R, Norman P, Fish J. In Vivo methods for the study of allergy. Mucosal tests, techniques and interpretations. in Middleton E, Reed E, Ellis E, editors. *Allergy principles and practice*. 4th ed. St Louis. 1993. Mosby-Year Book
- 28 Dawson-Saunders B, Trapp R. *Bioestadística Médica*. pp 137. México 1993. Manual Moderno
- 29 Chomczynski P. A Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechnics* 1993; 15 :532-537
- 30 Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual* 2^oEd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- 31 Dreborg S. Methods for skin testing. *Allergy* 1989; 44(S10):22-30
- 32 Fajardo A, Yamamoto L, Garduño J, Hernandez D, Martinez MC. Consistencia y validez de una medición en la investigación clínica pediátrica. Definición, evaluación y su interpretación. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1991;48:367-381
- 33 Al-Rayes H, Pachas W, Mirza N, Ahern D, Geha R, Vercelli D. IgE Regulation and lymphokine patterns in aging humans. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:630-6
- 34 Barbee R, Halonen M, Lebowitz M, Burrows B. Distribution of IgE in a community population sample: correlations with age, sex, and allergen skin test reactivity. *J allergy Clin Immunol* 1981;68:106-111
- 35 Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4⁺ effector T cells generated from CD45RO⁺ and CD45RO⁻ subsets. *J Immunol* 1995;155:3322-3328
- 36 Kumar N, Sheik S, Zitt M et al. Allergen specific IL-4 and IFN gamma production during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:307
- 37 Hamilton D, Leung D, Wood R, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus non-allergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:537-44

ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 38 Carballido J, Carballido-Perrig N, Orberli-Schrammi A, Heusser C, Blaser K. Regulation of IgE and IgG₂ Response by allergen specific T-cell clones to bee venom phospholipase A₂ in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:758-67
- 39 Marsh D, Neely J, Breazeale D et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-1155