

00524
58



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**REACTIVIDAD ALERGENICA CRUZADA IN VIVO E
IN VITRO ENTRE TRES ESPECIES DE *Betula sp.*
(Abedul) EN PACIENTES CON RINITIS Y ASMA
ALERGICAS.**

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

SAMUEL GARCIA NIETO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

2003



A



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.

H. JURADO ASIGNADO

Presidente: Q. F. B. Saturnino de León Chapa
Vocal: Dr. Fernando García Tamayo
Secretario: Q. F. B. Misael González Ibarra
1^{er}. suplente: M. en C. Mónica Berenice Heras Cavarria
2^o. suplente: M. en C. Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Inmunoalergología y Micología Médica de la División de Investigación del Hospital Juárez de México, SSA. y Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Q. F. B. Misael González Ibarra

SUSTENTANTE:

Samuel García Nieto

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Samuel García Nieto

FECHA: 25-marzo-2003

FIRMA: Samuel

B

**ESTA TESIS SE DESARROLLÓ Y CONCLUYÓ BAJO LA CO-TUTORÍA DEL
DR. YONATHAN GÁRFIAS BECERRA ADSCRITO AL LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.**

C

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor (y amigo), **Misael González Ibarra**. Muchísimas gracias por todos los buenos momentos, el apoyo incondicional, pero sobre todo por la oportunidad de poder trabajar a su lado y de aprender tantas cosas, no sólo en el aspecto académico. Espero que esto sólo sea el inicio de una relación personal y profesional que dure mucho tiempo.

A mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Autónoma de México** y su grandiosa **Facultad de Química**, por que gracias a ella obtuve formación tanto académica como personal. Pase lo que pase y esté donde esté, siempre seré de sangre azul y de piel dorada.

Al **Hospital Juárez de México** y al **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias** por haber podido desarrollar y finalizar mi tesis en sus instalaciones.

A **Kari, Tere, Julio y Homero** del Laboratorio 2 por todo lo que me enseñaron y por la oportunidad de conocerlos. Son personas valiosísimas y se que todo lo que emprendan lo llevarán a buen término. Mil gracias.

A todos **mis profesores**, porque cada uno, de una u otra forma, me enseñó algo para afrontar mejor la vida.

Al **Dr. Yonathan Gárfias Becerra**, por que sin tu ayuda me hubiera sido imposible terminar mi tesis. Te estoy infinitamente agradecido.

A todas aquellas personas que me ayudaron en la realización de mi tesis. El mencionarias a todas me llevaría escribir muchas páginas. Les agradezco mucho toda su cooperación.

DEDICATORIAS

Han hecho tanto por mí que la vida no me alcanzará para pagarles todos los sacrificios y esfuerzos que han realizado para que sea el hombre que soy ahora. A ustedes **PAPÁS**, les pertenece esta tesis y les juró que haré hasta lo imposible por que se sientan orgullosos de mí y para que nunca los desilusione. Los amo y jamás dejaré de hacerlo.

A ti, "**JAPONÉS**", por que como vos nadie. Llegaste a mi vida justo cuando más solo me sentía y me diste la dicha de tenerte junto a mí. Estoy orgulloso de ti y siempre voy a estar a tu lado cuando me necesites. Te quiero muchísimo.

Gracias por ser el ejemplo de vida que toda persona quisiera tener. Se que aunque te me hayas adelantado, estás conmigo a cada momento. Te extraño mucho **PAPÁ TOMÁS**.

A ti, **MAMÁ LUISA**, por que sin tu apoyo y consejo jamás lo hubiera logrado. Le agradezco a la vida que me diera el privilegio de tenerte a mi lado. Te amo.

Si quisiera expresar en unas líneas todo lo que significas para mí, sería imposible por que me quedaría corto. Apareciste en mi vida en el momento que más lo necesitaba y a lo largo de todos estos años me has enseñado y demostrado tantas cosas que sólo puedo decirte, gracias **MAYRA** por todo. Eres la persona que le da sentido a mi vida. No importando lo que el destino nos tenga reservado nunca dejarás de estar presente en mi corazón. **TE AMO**.

A mis amigos, pocos pero excelentes: **Pedro, Leticia, Elly, Karina, Sandra y Alejandra (q.e.p.d)**, **Jorge, Cristina** y todas aquellas personas que han aparecido en mi vida y me han hecho pasar momentos inolvidables. GRACIAS.

A los integrantes de mi familia que de una u otra forma me impulsaron para alcanzar este sueño. Los quiero mucho.

..... No cierres los ojos a tus sueños, es tu instinto de grandeza el que te habla a través de ellos; déjate llevar porque todo es posible. Dios no te hubiera dado la capacidad de soñar sin darte los medios para convertir tus sueños en realidad

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES	
A) Introducción	1
B) Hipersensibilidad Tipo I: Inmediata o Anafiláctica	
1. Atopia	2
2. Mecanismo inmunológico	2
C) Alergenos	
1. Definición	8
2. Clasificación	8
3. Reactividad alérgica cruzada	9
D) Pólenes	10
E) Abedul	
1. Generalidades	13
2. Distribución y Ecobiología	13
3. Inmunoquímica del polen del abedul	17
F) Enfermedades alérgicas	
1. Frecuencia	19
2. Descripción clínica	
2.1.- Rinitis alérgica (RA)	19
2.2.- Asma extrínseco (AE)	20
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25

4

V. METODOLOGÍA	
a) Pacientes	26
b) Pruebas cutáneas por punción (PRICK)	26
c) Cuantificación de IgE-alergeno específica	28
d) SDS – PAGE y Western Blot	28
e) Hoja de resultados	30
VI. RESULTADOS	
a) Pacientes	31
b) Pruebas cutáneas	31
c) Cuantificación de IgE-alergeno específica	32
d) Patrón electroforético	34
e) Western Blot	40
VII. DISCUSIÓN	
a) Pacientes	43
b) Pruebas cutáneas	43
c) Cuantificación de IgE-alergeno específica	44
d) Patrón electroforético	45
e) Western Blot	46
f) Relación inmunológica inter – especie	47
VII. CONCLUSIONES	49
IX. BIBLIOGRAFÍA	50
X. APÉNDICE	56

I.- ANTECEDENTES.

A) INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades respiratorias son uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país. Estos padecimientos pueden dividirse en dos grandes grupos: los de orden infeccioso y los no infecciosos. Entre los primeros destacan, con una alta incidencia, infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, virus sincicial respiratorio, algunos rinovirus, *Klebsiella pneumoniae*, y en años recientes el oportunista *Pneumocystis carinii* (estrechamente ligado a la pandemia de SIDA), que afectan a la población mexicana provocando desde infecciones leves hasta la muerte.

Entre los de naturaleza no infecciosa, sobresalen los padecimientos alérgicos: rinitis alérgica y asma extrínseco, los cuales han incrementado alarmantemente en los últimos años. Ambas enfermedades son provocados por una respuesta inmune de hipersensibilidad contra pólenes de vegetales, desechos de animales (ácaros, perros y cucarachas) y conidios y micelios de hongos microscópicos, que son inocuos para la población general, pero que en individuos con predisposición genética provoca dichos padecimientos.

Los alérgenos que con mayor frecuencia causan alergia en México son los ácaros: *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, saliva y caspas de gatos y perros, detritus de cucarachas, pólenes de pastos como *Cynodon dactylon* (pata de gallo), pólenes de árboles como *Fraxinus uhdei* (fresno) ó *Schinus molle* (pirúl), entre otros. Sin embargo, en el grupo de extractos alérgicos que se utilizan para el diagnóstico de alergias mediante pruebas cutáneas no se utilizan otras especies de géneros altamente

sensibilizantes, debido a que no existen estudios que apoyen su uso. Esto ocurre con el árbol conocido como **abedul** (*Betula sp.*), que contiene más de ocho especies y al menos dos se encuentran en nuestro país. Es por ello que en este trabajo pretendemos estudiar la reactividad alérgica cruzada entre tres especies de éste género: *Betula verrucosa*, *Betula occidentalis* y *Betula lenta*, en pacientes con alergias respiratorias; pero antes hablaremos de los mecanismos responsables de las reacciones de hipersensibilidad inmediata que provocan estas alergias, de los alérgenos que las inducen, de el género de árboles sobre el que nos enfocaremos y, además, de un panorama breve del cuadro clínico de la rinitis alérgica y el asma extrínseco.

B) HIPERSENSIBILIDAD TIPO I: INMEDIATA O ANAFILÁCTICA.

1. ATOPIA

El principal factor que interviene en un padecimiento alérgico es la predisposición genética o **ATOPIA**, término que fue utilizado por primera vez en 1923 por Coca y Cooke ⁽⁴⁾ para describir las presentaciones clínicas de las reacciones de hipersensibilidad tipo I. Atopia se define como la predisposición genética o hereditaria a desarrollar enfermedades alérgicas, en personas con historia familiar de trastornos similares y que muestran positividad inmediata (roncha +eritema) en las pruebas cutáneas, frente a los alérgenos comunes que son inocuos para la población en general ⁽⁵⁾.

2. Mecanismo inmunológico

Los mecanismos inmunológicos responsables de las reacciones de hipersensibilidad se dividen en cuatro tipos según la clasificación de Gell y

Coombs ⁽⁴⁾, en el presente protocolo nos referiremos solamente a las reacciones de hipersensibilidad tipo I.

La hipersensibilidad de tipo I se caracteriza por una reacción alérgica que aparece inmediatamente después de la exposición constante y subsecuente a uno o varios antígenos denominados alérgenos; es una característica individual y como resultado final de la misma, se presenta el daño tisular local ^(3, 6). El término alergia se refiere a toda aquella respuesta inmune aumentada del hospedero ante el contacto con una sustancia sensibilizante a la que ha sido expuesto previamente, pero que en individuos no atópicos no les genera ningún tipo de respuesta de daño tisular ⁽⁵⁾.

La respuesta alérgica se presenta en individuos atópicos, tras el contacto constante y subsecuente con diversos alérgenos frente a los cuales se producen anticuerpos (inmunoglobulinas), de la clase IgE alérgeno-específicos; al inicio la IgE alérgeno-específica se produce localmente, en el lugar en donde se pone en contacto con el alérgeno. Al incrementarse su síntesis pasa a la circulación libremente para después unirse a receptores de alta afinidad presentes en mastocitos (unidos a piel y mucosas), y / o basófilos (en circulación sanguínea) ^(3, 5, 6).

Una vez que las partículas alérgicas (pólenes, hongos o ácaros, por ejemplo) establecen contacto con la superficie de mucosas sobre todo la nasal, se inicia una compleja serie de acontecimientos ⁽⁹⁾. Los pólenes son reblandecidos de su pared externa (la exina) por el agua de vaporización y por las sales producidas localmente, de tal manera que las moléculas alérgicas son liberadas de los pólenes y difundidas a través de la submucosa y se pongan en contacto con las

células fagocíticas y presentadoras de antígenos (APC's) ^(4, 5).

Las moléculas alergénicas son fagocitadas por las células de Langerhans (macrófagos) de la submucosa. Una vez fagocitadas y procesadas las presentan como fracciones peptídicas (epitopes), en la superficie de su membrana celular junto con moléculas de la clase MHC-II. Las APC's producen IL-1 que estimula al linfocito precursor "THo" para reconocer las fracciones alergénicas ^(3, 5, 6). Este linfocito se estimulará y producirá el grupo de citocinas que diferenciará a los linfocitos en "TH-2" ⁽⁵⁵⁾. Estos últimos, producirán IL-4 que estimulará a que los plasmocitos cambien de isotipo IgD y se produzcan anticuerpos de la clase IgE-alergeno-específica ⁽⁵²⁾. Además se producirán IL-5, IL-10, IL-13 y otras citocinas características de un perfil Th2 que aparte de perpetuar la respuesta Th2 (o humoral), reprimen la respuesta Th1 (o celular) ^(27, 57).

Una de las características importantes de las IgE es su alta afinidad de unión a través de sus dominios Fc con los receptores específicos denominados Fcε RI presentes en la superficie de Células Cebadas (mastocitos) y de los basófilos. Así, las IgE producidas a nivel local sensibilizarán en primer lugar a los mastocitos situados en esta zona; la IgE excedente pasa a la circulación y se une a los receptores específicos de los basófilos circulantes y de los mastocitos tisulares que se encuentran distribuidos en todos los tejidos ^(1, 6).

Una vez que las IgE-alergeno específica se van uniendo a los receptores FcεRI de las células cebadas, estas inmunoglobulinas-E van cubriendo a éstas células ⁽⁵⁾. Al penetrar más alérgenos se sintetizará más IgE-específica que saturarán a dichos receptores en las células cebadas. Las moléculas alergénicas

que penetren hasta donde se encuentran estas IgE's, las entrecruzarán (los alérgenos son bivalentes y entrecruzarán a 2 IgE's) ⁽¹⁾. Esta interacción alérgeno-anticuerpo *in vivo* conducirá a la activación de diversas moléculas, entre éstas un aumento importante de AMP-cíclico y la entrada de iones Ca^{2+} , debido a la formación de microtúbulos y reorganización del citoesqueleto. Este mecanismo activará la liberación de los gránulos de las células cebadas por exocitosis (degranulación) ⁽⁵⁾. Estos gránulos contienen moléculas preformadas que son liberadas como histamina, heparina, factor quimiotáctico de eosinófilos (FQE-A), factor activador de plaquetas (PAF), RANTES y otros ^(4, 5, 6, 58), generando respuesta inmediata de vasodilatación (vasos de pequeño calibre), broncoconstricción, aumento de la permeabilidad capilar y contracción del músculo liso de los bronquios e intestino, dependiendo de la localización del órgano afectado. Esto ocurre aproximadamente a los 9 minutos de la degranulación de las células cebadas, reconociendo así a este periodo como *fase inmediata* ^(5, 6, 59).

Los cambios que experimentan las membranas de los basófilos y de las células cebadas, junto con la activación de la fosfolipasa A2, inducen la liberación de ácido araquidónico, este puede ser metabolizado por la lipooxigenasa o por la ciclooxigenasa, según el tipo de célula cebada ^(4, 5). Entre los metabolitos lipídicos sintetizados *de novo* se encuentran las prostaglandinas (PGE 1, PGE 2, PGD 2, PGF 2) y los tromboxanos (TXA 2, TXB 2), producidos por la vía de la ciclooxigenasa, y los leucotrienos (LTC 4, LTD 4, LTB4) producidos por la vía de la lipooxigenasa, perpetuando así la respuesta alérgica inflamatoria generando efectos potentes de vasodilatación, espasmos, contracción del músculo branquial, agregación plaquetaria y producción de moco ^(3, 4, 5, 6). Esta etapa se le conoce

como *fase tardía* de la respuesta alérgica que se acompaña de una marcada activación celular medida por eosinófilos, los cuales, migran desde el torrente sanguíneo mediante un intrincado proceso de adhesión intercelular en donde intervienen moléculas como RANTES, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, integrinas, entre muchas otras ^(4, 5, 55, 56). Una vez que los eosinófilos se acumulan en los sitios de inflamación alérgica, liberan una gran variedad de moléculas reguladoras como la arilsulfatasa, la fosfolipasa que destruye al PAF e histaminasa que inactiva a la histamina, entre otras, que contribuyen significativamente a la inducción de daño tisular ^(5, 6, 56). (ver figura 1)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

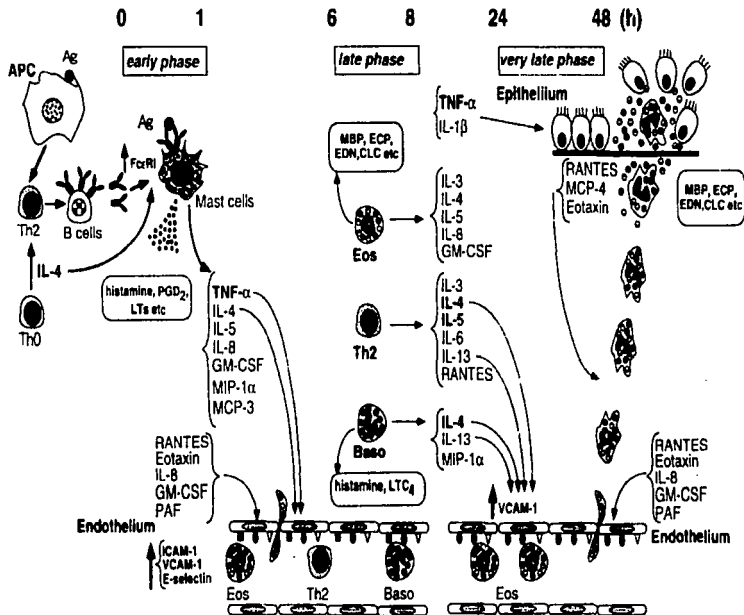


Fig. 1.- Esquema que representa las fases de la respuesta alérgica, mostrando las células, citocinas, quimiocinas y fenómenos involucrados

C) ALERGENOS.

1. Definición

Cualquier sustancia genéticamente extraña capaz de inducir una respuesta alérgica es un alérgeno. Para reconocer a una partícula como alérgica se toman en cuenta diversos factores tales como: tamaño, solubilidad, proporción de separación, cantidad, vía de entrada, dosis, frecuencia a la exposición y características moleculares las cuales contribuyen para determinar a un alérgeno como importante desde el punto de vista clínico^(5, 7), además de que cumple con las cinco características fundamentales del antígeno.

2. Clasificación

Según su origen y vía de entrada al organismo, los alérgenos se clasifican en:

EXÓGENOS	ENDÓGENOS
-INHALABLES (aereoalergenos) -INGERIBLES (trofoalergenos) -INYECTABLES -CONTACTANTES (dermoalergenos)	-AUTOANTÍGENOS

De todos ellos los que nos competen en este trabajo son los aereoalergenos ya que son los causantes de las alergias respiratorias. Los aereoalergenos (llamados también neuroalergenos o alérgenos inhalables) se clasifican en:

1. Alergenos estacionales (aparecen en cada estación del año)
2. Alergenos perennes (se encuentran siempre en el habitat del paciente)⁽⁷⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

O bien por su origen:

POLINICOS	FUNGICOS	ANIMALES	DIVERSOS
<ul style="list-style-type: none">• Pastos• Árboles• Malezas	<ul style="list-style-type: none">• Conidios• Esporas• Micelio	<ul style="list-style-type: none">• Cucarachas• Ácaros• Gato• Perro• Conejo• Caballo• Etc.	<ul style="list-style-type: none">• Polvo de la casa• Tamos de maiz• Algodón• etc. (7)

3. Reactividad alérgica cruzada

Todos los alérgenos caracterizados hasta el momento son de naturaleza protéica y gracias a las metodologías experimentales de la actualidad, se ha obtenido la secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria de estas proteínas. Debido a su naturaleza química, es común que muchos alérgenos compartan secuencias de aminoácidos en sus estructuras. Estas homología de secuencia provocan que el sistema inmune de un paciente alérgico reconozca estas secuencias similares de forma indistinta, es decir, que no distinga si la secuencia pertenece a uno u otro alérgeno e inicie una respuesta frente a ellas, esto es, que reaccione de manera cruzada frente a los alérgenos que comparten las secuencias homólogas.

Este fenómeno se presenta entre diversas fuentes alérgicas, pero tiene mayor presencia en los alérgenos de origen vegetal, debido a que estos organismos poseen proteínas que desempeñan múltiples funciones biológicas relevantes para ellos como son: enzimas, sistemas de defensa, proteínas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

estructurales, etc. y que a su vez son compartidas por una gran variedad de especies a pesar de estar filogenéticamente alejadas.

En el caso del género *Betula sp.*, existen infinidad de reportes en la literatura donde se establece la reactividad alérgica cruzada entre la especie *Betula verrucosa* y frutas de la familia *Rosaceae*. una infinidad de árboles y otras frutas^(21, 28, 39, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49), pero no existen reportes de la posible reactividad alérgica cruzada entre especies del género *Betula sp.*

Es por esto que el fenómeno de reactividad alérgica cruzada ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a que determina la relación inmunquímica inter – especie, ayuda a establecer diagnósticos precisos al reconocer exactamente las fuentes alérgicas para cada paciente y podría llegar a sugerir nuevas estrategias terapéuticas para los padecimientos alérgicos.

D) PÓLENES.

Los pólenes son las formas de reproducción sexual de las fanerógamas. Los alérgenos polínicos son producidos en las siguientes temporadas:

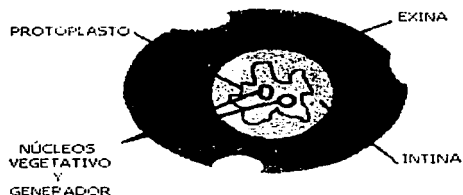
- ❖ Los pastos y gramíneas polinizan todo el año y generan alergias perennes
- ❖ Las malezas polinizan después de la época de lluvias principalmente de septiembre a noviembre, generando alergias estacionales.
- ❖ Los árboles polinizan en diferentes meses del año y generan alergia de tipo estacional^(6, 7).

En medios acuosos, la mayor parte de los granos de polen transportados en el aire son amarillentos, de cuerpo mas o menos esférico de 14 a 60µm y con

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

frecuencia poseen glóbulos lipídicos de superficie. Las dimensiones y descripciones características establecidas de tipos específicos de pólenes se basan en este material preparado expandido ⁽²³⁾.

Varias capas estructurales bien definidas contribuyen al aspecto característico del polen fresco en la microscopia óptica. La cubierta mas externa o exina está compuesta por esporopelenina, un polímero biogénico muy resistente. Presenta además rasgos de una capa intermedia rica en celulosa denominada intina, y un protoplasto interno que contiene material genético, gránulos de almidón y otros organelos ⁽⁷⁾.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. .- Esquema de la estructura de un grano de polen.

Es de importancia reconocer que estos pólenes potencialmente alergénicos cumplen con los postulados de A.A. Thommen y Vaugham (1931) ⁽⁷⁾:

- 1) El polen debe ser aerotransportado (anemofílico),

- 2) El polen debe ser producido en grandes cantidades (esta es una característica de las plantas polinizadas por el aire),
- 3) El polen debe ser ligero en su peso y de tamaño pequeño en un rango de 15 – 58 micrómetros, para que pueda flotar y ser arrastrado a grandes distancias (hasta 300 km. desde donde es producido),
- 4) La planta productora debe estar ampliamente distribuida en la zona donde reside el paciente alérgico.
- 5) El polen debe contener moléculas alergénicas específicas para inducir un estado de hipersensibilidad tipo I (según Gell y Coombs).

COROLARIO: Estos postulados se cumplen siempre y cuando exista el factor predisponente: **ATOPIA.**

Existe una correlación directa entre los recuentos de pólenes alergénicos y los síntomas de alergia polínica. Aunque el umbral de respuesta es variable de un paciente a otro (dependiendo del grado de sensibilización), y puede disminuir en un mismo paciente a medida que avanza la estación (efecto priming), se estima como concentraciones altas (capaces de producir síntomas casi al 100% de los pacientes clínicamente sensibles) a 50 granos de polen / m³ de aire. En el caso de la *Ambrosia* se estima en 20, para la *Parietaria* en 30 y ***Betula* en 80 granos / m³.** (29)

E) ABEDUL

1. GENERALIDADES

Árbol perteneciente a la familia *Betulaceae*, la cual está integrada por cinco géneros:

- a) *Alnus ssp.*
- b) *Betula ssp.*
- c) *Cerpinus ssp.*
- d) *Corylus ssp.*
- e) *Ostrya virginiana* ⁽¹⁹⁾.

El género *Betula sp.* comprende alrededor de 120 especies distintas de abedules, que habitan por todo el hemisferio norte desde hace 70 millones de años. Abunda en las riveras, montañas y en cualquier lugar que sea húmedo, fresco y luminoso, hasta más allá de los 2.000 metros de altitud. Forma pequeños bosques abiertos, mezclándose con otras formaciones arbóreas, en especial hayedos, robledales y abetares ⁽¹⁹⁾.

2. DISTRIBUCIÓN Y ECOBIOLOGÍA

En nuestro continente se le ubica como una especie originaria de México y Centroamérica. Se extiende desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina y los Andes de Perú y Bolivia. En el territorio nacional, la CONABIO reporta que el abedul está distribuido en casi toda la República ⁽⁹⁾. Se ubica en una altitud promedio que va de los 1300 m. a los 2800 m., principalmente en los estados de:

- ◆ Chiapas
- ◆ Chihuahua
- ◆ Distrito Federal
- ◆ Durango
- ◆ Guerrero
- ◆ Guanajuato
- ◆ Hidalgo
- ◆ Jalisco
- ◆ Michoacán
- ◆ Morelos ⁽⁸⁾
- ◆ Nayarit
- ◆ Oaxaca
- ◆ Puebla
- ◆ Querétaro
- ◆ Sinaloa
- ◆ San Luis Potosí
- ◆ Sonora
- ◆ Tlaxcala
- ◆ Veracruz

El hábitat de éste género es en laderas de montañas muy inclinadas con condiciones secas; prospera en las riberas de los ríos y en pendientes húmedas. Se desarrolla en áreas de nubosidad y con un rango de temperatura de 4° - 27 ° C ⁽¹⁷⁾.

Desde el punto de vista ecológico es importante en etapas sucesionales tempranas de los bosques de pino, pino-encino y en bosque mesófilo de montaña. Es invasor de sitios expuestos además de ser un árbol importante en procesos de reforestación ⁽⁸⁾.

El tronco del abedul común está cubierto con una suave corteza de color blanco niveo, con estrías horizontales más oscuras; las ramitas son de color pardo y ásperas al tacto, porque están cubiertas por glándulas secretoras de una resina, que le da el aspecto granujiento ⁽¹⁸⁾.

Las ramas principales son ascendentes y las secundarias levemente péndulas, dando todo el árbol un aspecto liviano y frágil, que contrasta fuertemente con el duro clima borrascoso de las montañas o el de la terrible estepa siberiana, donde se afianza y los primeros de año tiene un crecimiento rápido, haciéndose más

lento después, hasta poder alcanzar los 20 metros de altura y 2 metros de perímetro. Sus hojas, en infusión, son un gran diurético ⁽²⁰⁾.



Fig. 3: Fotografía del Abedul (*Betula verrucosa*).

El abedul poliniza durante el periodo de abril a julio ⁽²³⁾ y los granos de polen de este género son de subachatados a esferoidales, isopolares, trizonoporados, con cúpulas prominentes en torno a las aberturas y poros vestibulares sobresalientes de 20-25 μ m ⁽²³⁾.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**FALTA
PAGINA**

16



Fig. 4: Microfotografías electrónicas de granos de pólenes de Abedul.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

3. INMUNOQUÍMICA DEL POLEN DEL ABEDUL

En la actualidad sólo se han caracterizado alergenios pertenecientes al polen de *Betula verrucosa* : hasta el momento se han descrito siete.

El alergenio mayor denominado **Bet v 1** es una proteína de 17Kd y con punto isoeléctrico de 5.2 ^(21, 25, 29, 47, 48, 50, 53), frente a la cual se produce la mayor parte de IgE alergenio específica en pacientes atópicos. La secuencia de aminoácidos que dan estructura al alergenio proteico **Bet v1** se encuentra presente también en otras proteínas presentes en algunos frutos y vegetales, es por esto que existe reactividad cruzada entre el polen del abedul y la familia *Rosaceae* ^(30, 32, 35, 41), que abarca frutas como la manzana, el durazno, el melocotón, entre muchas otras.

Otro alergenio caracterizado y considerado como alergenio secundario es la profilina **Bet v2** responsable de la reactividad cruzada del polen del abedul con algunos alimentos ^(24, 26, 31, 34, 49) y que se ha caracterizado como una isoforma del alergenio **Bet v1** ^(35, 45); tiene un peso molecular de 14 kd⁽²¹⁾.

Dos alergenios considerados como menores son **Bet v3** y **Bet v4** ambos son reconocidos como proteínas enlazadoras de calcio (Ca^{2+}) con dos dominios cada uno. Estos alergenios tienen pesos moleculares de 37 kd y 9.3 kd, respectivamente ^(36, 37, 38) y son reconocidos en un bajo porcentaje por el suero de pacientes alérgicos al polen del abedul ^(51, 54).

Los alergenios **Bet v5** y **Bet v6** se han caracterizado como otros alergenios menores pertenecientes a una familia de proteínas relacionadas con isoflavona – reductasas. Pesar, respectivamente, 33 y 35 kd ^(33, 39, 40, 44, 46)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Recientemente se identificó otro alérgeno, perteneciente al grupo de las ciclofilinas, **Bet v7**, que es una proteína con un peso de 18Kd con punto isoeléctrico que oscila en el rango de 9.0 a 9.3. Esta proteína es causante de la reactividad cruzada entre el polen del abedul y alimentos como jitomate, haba, habichuela, cebolla, etc. ⁽²²⁾

F) ENFERMEDADES ALÉRGICAS:

1. FRECUENCIA

Cuando se habla de enfermedades alérgicas, se tiene que tomar en cuenta la gran cantidad de personas que sufre estos padecimientos. Según datos recabados por la Secretaría de Salud, respecto a éste tema, las enfermedades alérgicas se presentan en un 20-33% de la población en general⁽¹⁰⁾.

Frecuencia de enfermedades alérgicas en México hasta el año 2000⁽¹⁰⁾

❖ De 3 meses- 14 años	56.40%
❖ De 15-30 años	33.50%
❖ De 31-45 años	6.60%
❖ Mayores de 46 años	1.50%

2. DESCRIPCIÓN CLÍNICA

2.1.- Rinitis alérgica (RA) :

Es un síndrome caracterizado por inflamación de la mucosa nasal, el cual se manifiesta por hiperemia, obstrucción, prurito nasal, estornudos en salva, e

hipersecreción (rinorrea anterior y posterior) además de presentar líneas de Dennie-Morgan . La RA puede manifestarse durante todo el año (rinitis perenne), o durante ciertas estaciones de polinización (en cuyos casos se denomina polinosis o RA estacional). Esta puede iniciar en la infancia con obstrucción nasal perenne exacerbándose durante otoño, invierno y a comienzos de la primavera. Los niños mayores pueden tener rinitis estacional ⁽¹³⁾.

La sintomatología a nivel local se presenta como obstrucción nasal, uni o bilateral o en balanza; secreción nasal abundante paroxística, acuosa o cristalina, estornudos numerosos en forma violenta o en salva matutinos, prurito nasal , en párpados, velo del paladar lengua, hiperemia conjuntival, epífora y fotofobia, cefalea a la mitad de la cabeza y dolor nasal en senos paranasales.

La sintomatología general se manifiesta como astenia marcada, adinamia, apatía, irritabilidad, malestar abdominal, cefalea, palidez facial, ojeras y dolores músculo esqueléticos. ⁽¹⁴⁾

2.2 .- *Asma extrínseco (AE):*

Todo padecimiento pulmonar que genera disnea paroxística y sibilancias es considerado como asma, sin embargo la definición aceptada es: enfermedad pulmonar crónica, reversible, que se caracteriza por grados variables de broncoconstricción e inflamación, manifestándose con tos, sibilancias, expectoración, dificultad respiratoria, disnea paroxística, una fase respiratoria prolongada, y que remite con tratamiento o espontáneamente ⁽¹³⁾. El asma se clasifica en:

1. **Extrínseco**: Mediado por IgE, manifestándose después de la exposición a aereoalergenos específicos. Frecuente en niños y en jóvenes, generalmente acompañado de rinitis o dermatitis atópica.

1. **Intrínseco**: Se presenta generalmente en adultos, sin antecedentes de atopia, con pruebas cutáneas negativas, e IgE total normal. Esta puede ser inducida por infecciones pulmonares, ejercicio, estímulos psicológicos, alteraciones climáticas o ambientales, medicamentos o autoinmunidad ⁽¹⁴⁾.

El AE se presenta en la infancia con un 30% de frecuencia, principalmente en niños (mas grave), que en niñas. Después de la pubertad la distribución es mayor en sexo femenino. Se presenta principalmente en lugares de clima frío o en ciudades industrializadas ⁽¹³⁾.

El asma se presenta en diversas formas, desde una historia de infección de vías respiratorias altas, exposición a aereoalergenos, tos crónica aislada o sibilancias inducidas por el ejercicio, hasta episodios repetidos de sibilancias y disnea ^(13,14)

II.- JUSTIFICACIÓN.

Por estudios previos realizados en el laboratorio del Servicio de Alergia, Inmunología Clínica y Micología Médica del Hospital Juárez de México, SS (HJM), mediante los métodos: *in vitro* por quimioluminiscencia e *in vivo* por pruebas cutáneas positivas con el extracto de *Betula verrucosa* (Abedul blanco), en pacientes con rinitis y asma alérgicos se ha demostrado la presencia de niveles elevados de IgE- abedul específica tanto en suero como unida a los mastocitos de la piel de estos pacientes⁽²⁾. Debido a estos resultados, se tiene la certeza que desde el punto de vista clínico e inmunológico, el polen de este árbol es altamente sensibilizante en la población alérgica mexicana.

Sin embargo, en México predominan otras especies como *Betula occidentalis* y *Betula lenta*⁽⁸⁾, que junto con la *Betula verrucosa* pueden sensibilizar a los pacientes con alergia respiratoria en nuestro país. Además, en la literatura internacional no existen reportes de trabajos en donde se analicen, desde un punto de vista inmunológico, ni a *Betula occidentalis* ni a *Betula lenta* y su posible relación inmunoquímica con *Betula verrucosa*, especie sobre la cual se han realizado todos los estudios inmunológicos reportados a la fecha.

Debido a esto, se pretende estudiar a las dos especies de abedul predominantes en nuestro país desde un punto de vista inmunológico a través de estudios *in vivo* e *in vitro*, para así, poder determinar su relevancia como agentes sensibilizantes en pacientes con rinitis y asma alérgicas, así como la posible relación inmunológica que tengan con la especie de abedul mayormente estudiada a nivel mundial.

Por otro lado, este protocolo se plantea exclusivamente, en primera instancia, como un estudio piloto de comparación cualitativa entre dos muestras: pacientes alérgicos y controles sanos, y, en segundo lugar, para que se establezca como plataforma teórica y experimental para el desarrollo de estudios prospectivos de población dentro de los protocolos de investigación del Laboratorio de Inmunoalergología y Micología Médica del Hospital Juárez de México, que no simplemente involucren las especies alérgicas planteadas, sino para otros agentes sensibilizantes con mayor incidencia en la población mexicana como son los ácaros *D. pteryonyssinus* , *D. farinae* o las cucarachas *B. germanica* y *P. americana*.

III.-HIPÓTESIS.

Los pacientes con enfermedades alérgicas respiratorias que presenten respuesta cutánea positiva de tipo inmediato frente a *Betula verrucosa* , generarán respuesta cutánea positiva de tipo inmediato frente a *Betula occidentalis* y *Betula lenta*. Así mismo, los anticuerpos IgE alergeno-específicos presentes en el suero de pacientes con alergia respiratoria se unirán con las proteínas alérgicas de las tres especies de abedul mediante pruebas *in vitro*.

Además, dado que los tres extractos alérgicos estudiados pertenecen a tres especies del género *Betula sp.*, se espera que su patrón electroforético sea similar, esto es, que contengan las mismas proteínas alérgicas.

IV.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Establecer la existencia de reactividad alérgica cruzada tanto *in vivo* como *in vitro* entre las 3 especies de abedul existentes en México: *Betula occidentalis*, *Betula lenta* y *Betula verrucosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Demostrar, a través de pruebas cutáneas por punción, la presencia de IgE alérgeno-específica unida a la membrana de células cebadas (mastocitos y basófilos) vs. las proteínas alérgicas de *Betula verrucosa* (Abedul blanco), *Betula lenta* (Abedul dulce) y *Betula occidentalis* (Abedul de montaña) ⁽⁶²⁾ presentes en sus extractos alérgicos, en pacientes con rinitis y asma alérgicos.
- 2) Cuantificar los niveles séricos de IgE alérgeno-específica dirigida contra los epítopes de los alérgenos del abedul (*Betula occidentalis*).
- 3) Realizar el patrón electroforético de los tres extractos alérgicos a estudiar para poder establecer una comparación cualitativa de la existencia de proteínas potencialmente alérgicas compartidas entre ellos.
- 4) Comprobar la reactividad alérgica cruzada del suero de estos pacientes vs. los extractos alérgicos de *B. verrucosa*, *B. lenta* y *B. occidentalis*, mediante el análisis inmunoquímico por Western blot.

V. - METODOLOGÍA

a) Pacientes.

La sujetos estudiados fueron seleccionados de los pacientes que acudieron al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Juárez de México (HJM), SS, de la Ciudad de México.

Los pacientes que refirieron síntomas clínicos consistentes con alergia estacional fueron seleccionados entre octubre y noviembre del 2002. El diagnóstico tanto de rinitis como de asma alérgicas fue establecido por las manifestaciones clínicas y la positividad en las pruebas cutáneas por punción.

Se obtuvo una historia clínica amplia y descriptiva realizada por los médicos especializados en Inmunoalergología del Servicio de Alergia e Inmunología del HJM (Jefe del Servicio y médicos adscritos).

Se manejó un grupo control de individuos sanos, sin antecedentes alérgicos y sin ningún síntoma compatible con algún padecimiento alérgico.

b) Pruebas cutáneas por punción (PRICK).

Las pruebas cutáneas fueron realizadas por el método de punción ⁽¹⁵⁾ utilizando extractos alergénicos comercialmente disponibles de *Betula verrucosa* (Bv), *Betula occidentalis* (Bo) y *Betula lenta* (Bl) estandarizados fisicoquímicamente a una dilución 1:20 p / v y glicerizados (Allerstand™, México D.F., México).

Se utilizaron lancetas para punción estándar del sistema Duo-Tip-Test™ (Lincoln Diagnostics, USA).

i).- *Control positivo* : Se utilizó la solución de difosfato de histamina a una concentración de 1 mg / ml (en solución glicerizada, estéril y despirogenizada).

ii).- Control negativo : Se utilizó la solución amortiguadora de fosfatos (Solución de Evan's (Allerstand™, Ciudad de México, México) ⁽¹²⁾.

Los extractos alérgicos fueron aplicados sobre la parte media de la espalda del paciente alérgico (previa asepsia con torundas de algodón impregnadas con alcohol al 70%), dejando 2 centímetros de distancia entre cada extracto. Después se enumeró con pluma del 1 al 40 frente a cada punción. Se procedió a la punción con cada lanceta humedecida con su extracto alérgico correspondiente, aplicando paralelamente el control positivo y el control negativo. Después de 15 a 18 minutos de su aplicación, se procedió a la lectura de las pruebas cutáneas. Todas las respuestas en piel, son reportadas como la suma o promedio del diámetro de roncha + eritema en milímetros ⁽¹²⁾, y se registrarán en la hoja de resultados.

Hasta 1998, se han reportado tres esquemas de interpretación según el grupo de investigadores que los han publicado. En este protocolo utilizaremos el esquema semi-cuantitativo ⁽¹⁶⁾ que se presenta a continuación:

GRADO	ERITEMA	RONCHA
0	menor a 5 mm	menor a 5 mm
+ / -	5 – 10 mm	5 – 10 mm
1+	11 – 20 mm	5 – 10 mm
2+	21 – 30 mm	5 – 10 mm
3+	31 – 40 mm	5 – 10 mm ó pseudópodos
4+	mayor a 40 mm	Mayor a 15 mm ó pseudópodos ⁽¹⁶⁾

c) Cuantificación de IgE-alergeno específica.

La cantidad de IgE-alergeno específica anti-abetul (*Betula occidentalis*) fue cuantificada por medio de un kit comercial de quimioluminiscencia (PANEL INHALABLE MEXICANO, MAST Immunostystems™, California, USA) tanto en el suero de los pacientes como en el suero de los controles. Este kit fue leído en un luminómetro CLA-1™ (MAST Immunostystems™) ⁽⁶¹⁾.

Las cantidades de IgE-alergeno específica son asociados con valores de clase MAST™ y las lecturas del equipo se muestran en la siguiente relación:

Clase MAST	LU (*)	Concentración de IgE alérgeno-específica
4	>242	Muy alta
3	143 – 242	Alta
2	66 – 142	Moderada
1	27 – 65	Baja
1/0	12 – 26	Muy baja
0	0 – 11	No detectable

(*) LU = Unidades Luminométricas. (61)

Se registrará la clase de IgE obtenida en la hoja de resultados.

d) SDS – PAGE y Western Blot.

Los extractos alérgicos fueron separados por SDS-PAGE método Laemmli ⁽⁶⁰⁾ en geles de poliacrilamida al 15% (se cargó 20 µl de cada extracto a una dilución 1:10 p / v previamente diluido 1:1 con regulador de muestra). Las condiciones del corrimiento fueron reductoras; se utilizó un voltaje constante de 100 V por aproximadamente dos horas de corrimiento.

Después del corrimiento, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Osmonics™, USA) por transferencia semiseca⁽⁶⁰⁾ (10 V y 45 minutos de transferencia, cámara de transferencia Trans Blot™SD, Bio Rad, USA). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada seca al 7% toda la noche a 4°C. Una vez que se cortaron las membranas en tiras que correspondían a los tres extractos alergénicos juntos (uno en cada carril), éstas se incubaron con 4 ml de suero sin diluir tanto de pacientes como de controles toda la noche a 4°C.


Las tiras fueron lavadas 5 veces con TBS-T y la IgE unida fue detectada incubando las tiras toda la noche a 4°C con un anticuerpo IgG de cabra anti-IgE humana diluido 1:100 en TBS-T.

Después de 5 lavados con TBS-T, se procedió a incubar las tiras con un anticuerpo anti-cabra acoplado a peroxidasa (HRP) diluido 1:2500 en TBS-T, por 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 10 veces con TBS-T y las bandas fueron reveladas con un kit comercial para revelado de Western Blot (ECL Western Blotting Reagents™, Amersham Biosciences, New Jersey, USA)⁽⁶⁰⁾.

Un minuto después, las tiras fueron colocadas en una mica plástica para su mejor manejo y se obtuvieron las placas finales de revelado (Biomax MR-1™, Kodak, USA). Se reportará el resultado del Western Blot en la hoja de resultados.

Los geles de poliacrilamida empleados para el análisis del patrón electroforético, una vez que el corrimiento fue completado, fueron teñidos con un kit comercial de tinción con plata (Bio-Rad Silver Stain™, Bio-Rad, USA).

e) HOJA DE RESULTADOS

SERVICIO DE INMUNOALERGOLOGIA Y MICOLOGIA MEDICA	 HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
---	---

Laboratorio del Servicio de Inmunología y Micología Médica

REACTIVIDAD ALERGENICA CRUZADA *in vivo* E *in vitro* ENTRE TRES ESPECIES DE *Betula sp.*(ABEDUL) EN PACIENTES CON RINITIS Y ASMA ALERGICAS

Nombre del paciente: _____

No. de expediente: _____

No. de paciente: _____

Resultados de las pruebas cutáneas con extractos alergénicos glicerinados, del análisis inmunológico Western Blot y de la determinación de IgE específica.

ALERGENO	Diámetro roncha (mm)	Diámetro eritema (mm)	Western Blot
<i>Betula occidentalis</i>			
<i>Betula verrucosa</i>			
<i>Betula lenta</i>			
Control positivo (+)			
Control negativo (-)			
Clase de IgE específica =			

Fecha de aplicación de pruebas cutáneas: _____

Fecha de determinación de IgE específica: _____

Fecha de corrimiento del Western Blot: _____

Pas.QFB. Samuel García Nieto

QFB. Misael González Ibarra

VI.- RESULTADOS.

a) Pacientes.

Se seleccionaron un total de cinco pacientes los cuales presentaron rinitis alérgica; dos de ellos habían presentado episodios de asma bronquial y un paciente presentaba, además, síndrome oral alérgico.

-Edad promedio: 26.2 años

-Sexo: Cuatro mujeres, un hombre

En cuanto a los controles, fueron elegidos **cuatro hombres y una mujer**, sanos, sin ningún antecedente alérgico y con edad promedio de **27.2 años**.

b) Pruebas cutáneas

Se obtuvo el diámetro promedio tanto de la roncha como del eritema que se observo como resultado de la aplicación de los extractos alergénicos en la espalda de los pacientes. Estos promedios se obtuvieron para cada alérgeno y para ambos controles. Se puede observar que el promedio tanto de la roncha como del eritema para *B. lenta* es mayor que para los otros dos abedules.

Tabla 1.- Diámetros promedio obtenidos para la roncha y eritema de para cada alérgeno y cada control.

ALERGENO	Promedio de diámetro de la roncha (mm)	Promedio de diámetro del eritema (mm)
<u>Betula verrucosa</u>	19 X 19	36 X 36
<u>Betula occidentalis</u>	20 X 20	39 X 39
<u>Betula lenta</u>	23 X 23	42 X 42
Control positivo	9 X 9	20 X 20
Control negativo	---	---

*Todos los controles resultaron con pruebas cutáneas negativas.

c) Cuantificación de IgE-alérgeno específica.

Mediante la determinación de IgE-alérgeno específica, se obtuvieron los valores de clase de IgE tanto de los pacientes (Pn) como de los controles (Cn).

Cuatro de los cinco pacientes resultaron con cantidad de IgE-alérgeno específica alta o muy alta; el otro paciente resultó con IgE-alérgeno específica no detectable. Los cinco controles resultaron con IgE-alérgeno específica no detectable.

CUANTIFICACIÓN DE IgE-ALERGENO ESPECÍFICA

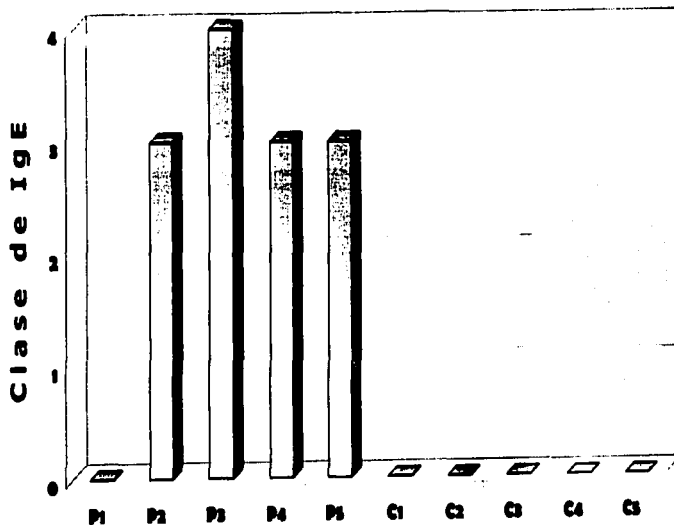


Fig. 4: Determinación de IgE-alergeno específica de pacientes (Pn) y de controles (Cn) por quimioluminiscencia.

d) Patrón electroforético.

En cada gel se corrieron los extractos en dos pozos adyacentes. El primer carril de la extrema izquierda muestra los marcadores de peso molecular (MPM). Después de hacer la tinción con plata, se escaneo el gel para su análisis. Los extractos de **Bv** y de **Bo** muestran un patrón muy similar mientras que en el extracto de **Bl** se pueden observar diferencias notables al comparar su patrón con los dos extracto antes mencionados.

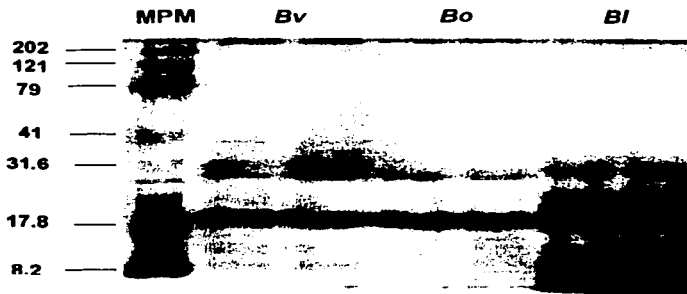


Fig. 5: Patrón electroforético de los extractos alergénicos de *B. verrucosa*, *B. occidentalis* y *B. lenta* (SDS - PAGE 15%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con los datos obtenidos del gel teñido se realizó una gráfica de Rf vs. log PM utilizando el desplazamiento electroforético de los marcadores de peso molecular para poder determinar el peso molecular de las proteínas presentes en cada extracto alergénico.

Se define Rf como el cociente entre la distancia recorrida por cada proteína (o marcador de peso molecular) y la distancia total del corrimiento.

*Distancia total del corrimiento = 15.5 cm

Tabla 2.- Datos de los marcadores de peso molecular (Kaleidoscope™, Bio-Rad) en base a su comportamiento en SDS -- PAGE 15%.

Marcador	PM (kd)	Distancia recorrida (cm)	Rf	log PM
Miosina	202	0.65	0.0419	2.3053
β-Galactosidasa	121	1.5	0.0967	2.0827
Albúmina sérica bovina	79	2.7	0.1741	1.8976
Anhidrasa carbónica	41	5.75	0.3709	1.6127
Inhibidor de tripsina (soya)	31.6	7.5	0.4838	1.4996
Lisosima	17.8	11.5	0.74 19	1.2504
Aprotinina	8.2	14	0.9032	0.9138

**FALTA
PAGINA**

36

DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS

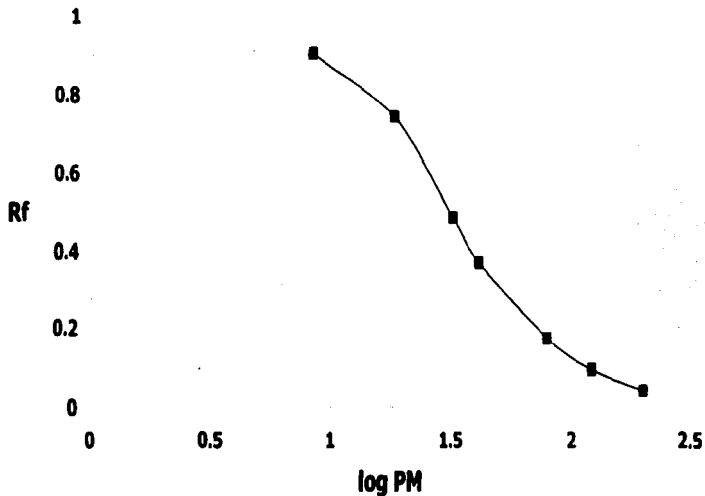
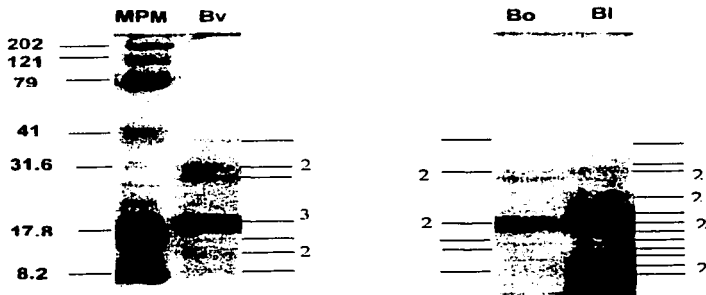


Fig. 6: Gráfica Rf vs. log PM para la determinación del peso molecular de proteínas del corrimiento electroforético de los tres extractos alérgicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Así, se logró establecer el patrón electroforético de cada extracto encontrando las proteínas presentes en cada uno de ellos.

Fig. 7: Patrón electroforético de las tres especies de abedul estudiadas.



Cada flecha indica la presencia de una proteína. Los números indican la presencia de más de una proteína. El carril de la extrema izquierda corresponde a los marcadores de peso molecular.

Debido a la resolución de la imagen, algunas bandas se observan muy gruesas y por lo tanto, se pierde la visualización de bandas individuales, pero esto se solucionó al analizar el gel seco, donde éstas bandas se observaban muy claramente. Así, se logró obtener el peso molecular de cada una de las proteínas presentes en cada extracto. Se observó que *B. occidentalis* tiene las mismas proteínas que *B. verrucosa* excepto tres y también se establece que *B.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lenta comparte diez proteínas con *B. verrucosa* y siete proteínas con *B. occidentalis* pero tiene seis proteínas que los otros dos extractos no presentan.

Además, en el extracto de *B. lenta*, se observa una carga de proteína considerable en la parte final del corrimiento.

Tabla 3.- Pesos moleculares (en kd) de las proteínas encontradas en el patrón electroforético de los tres extractos alérgicos analizados.

<i>Betula verrucosa</i>	<i>Betula occidentalis</i>	<i>Betula lenta</i>
37	37	37
32	31	34
31	29	32
29	20	31
22	18	29
20	16	26
18	11	25
16	8.5	23
11		20
10		18
8.5		17
		16
		11
		10
		9
		8.5

e)Western blot.

En las placas reveladas, se observa que cuatro de los cinco pacientes muestran bandas de reconocimiento. El paciente 2 reconoce tres proteínas de *Bv* con pesos moleculares de 16, 29 y 37 kd y una proteína de 16 kd de *Bo*. Los pacientes 3 y 5 reconocen una proteína de 37 kd en los tres extractos; además reconocen una proteína de 16 kd en *Bv* y *Bo*. El paciente 4 presenta dos bandas, en la proteína de 37 kd, tanto en *Bv* como en *Bo*.

Todos los controles no presentaron bandas de reconocimiento para ninguna proteína en ninguno de los tres extractos alérgicos.

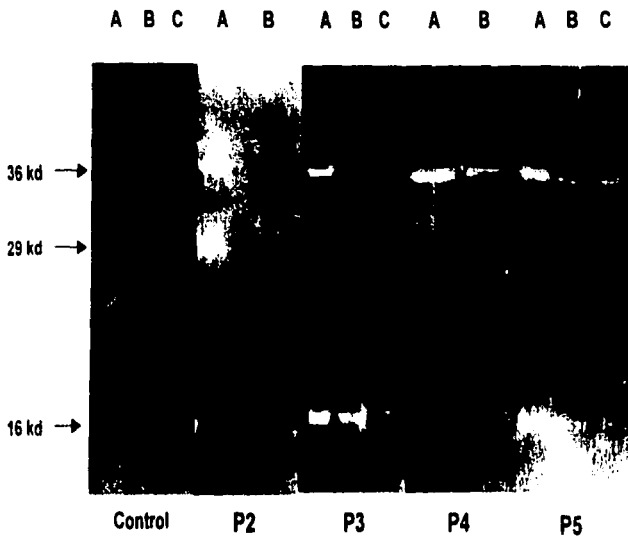


Fig. 8.- Bandas de reconocimiento de IgE en el análisis inmunoquímico de Western Blot. Cuatro de cinco pacientes reconocieron bandas de 36, 29 y 16 kd, respectivamente. A = *B. verrucosa*, B = *B. occidentalis*, C = *B. lenta*. P = Paciente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**FALTA
PAGINA**

42

VII.- DISCUSIÓN

A) Pacientes

Todos los pacientes seleccionados fueron diagnosticados con rinitis alérgica y su sintomatología era sumamente notoria durante la selección. Los dos pacientes con antecedentes asmáticos habían presentado episodios de asma en una proporción de cuatro episodios al mes durante los últimos 3 meses y el paciente con síndrome oral alérgico sufría la sintomatología de este padecimiento al menos dos veces al mes.

La selección de una muestra de cinco pacientes y cinco controles se debió básicamente a dos razones:

*El alto costo de los reactivos y equipo necesarios para el desarrollo de las metodologías descritas en el presente trabajo

*La ausencia de lo anterior en las instalaciones del HJM.

Es por ello que el tamaño de la muestra parece ser muy pequeño, pero hay reportes internacionales donde se realizaron estudios inmunquímicos similares a los realizados en este protocolo y utilizaron una muestra de tamaño parecido o menor^(22, 59), por lo que el plantear ese tamaño se consideró adecuado tomando en cuenta las circunstancias antes planteadas.

B) Pruebas cutáneas

Al realizar las pruebas cutáneas, cada uno de los pacientes presentó una respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediata, es decir, roncha + eritema para cada uno de los tres extractos alérgicos, y esta respuesta fue muy elevada (4+,

según el esquema de interpretación) lo que indica que estos pacientes tienen anticuerpos de la clase IgE en contra de las proteínas alergénicas que se encuentran en los tres abedules, fijados a la membrana de los mastocitos locales. Además, esto implica que los anticuerpos IgE reconocen indistintamente a las proteínas de los 3 extractos utilizados, esto se debe a que comparten proteínas alergénicas en su composición química y, por lo tanto, los pacientes reaccionan de manera cruzada, *in vivo*, con las tres especies de abedul analizadas.

Además, se observó que los pacientes presentan una respuesta de hipersensibilidad mayor frente al extracto de *B. lenta*, de lo cual podemos inferir que esta especie induce un grado de sensibilización mayor en los pacientes estudiados.

C) Cuantificación de IgE-alergeno específica.

La determinación de IgE-alergeno específica demostró la presencia de este tipo de anticuerpos libres en circulación y disponibles para fijarse a las membranas de más células cebadas y así, incrementar el grado de sensibilización de los pacientes, frente a las proteínas alergénicas del abedul.

La metodología para determinar IgE-alergeno específica utiliza una trenza de nitrocelulosa impregnada de proteínas alergénicas de *Betula occidentalis* (abedul de montaña). Esto implica que los mismos anticuerpos IgE específicos para *B. occidentalis* que fueron cuantificados en el suero de los pacientes, una vez fijados a las membranas de las células cebadas, reconocen indistintamente, a los extractos alergénicos de *B. verrucosa* y *B. lenta*.

Lo anterior no sólo confirma que las especies de *Betula sp.* son altamente sensibilizantes debido a la gran cantidad de IgE-alergeno específica cuantificada, sino que también ayuda a establecer que las tres especies presentan reactividad alérgica cruzada, *in vitro*, entre ellas.

D) Patrón electroforético

Analizando el patrón electroforético de los tres extractos alérgicos se encontraron diferencias sustanciales entre ellos. *Bv* y *Bo* comparten 7 proteínas: 37, 29, 20, 18, 16, 11 y 8.5 kd, respectivamente. Por otro lado, *Bl* comparte 9 proteínas con *Bv* y cinco con *Bo* pero tiene 6 proteínas de las que los otros dos extractos carecen: 34, 26, 25, 23, 17 y 9 kd, respectivamente.

Además, es claramente visible en el gel que el extracto de *Bl* contiene una mayor cantidad de proteína, debido a la intensidad de las bandas, aunque se cargó la misma cantidad de cada extracto para su corrimiento.

Por otro lado, la carga de proteína tan notoria que se observa en la parte final del corrimiento de *Bl*, es debida a la presencia de varias proteínas con un peso molecular menor a 8 kd.

Con esta información, podemos sugerir que el resultado de las pruebas cutáneas donde los pacientes presentaron una respuesta mayor frente al extracto de *B. lenta* puede ser atribuido a las distintas proteínas encontradas durante el corrimiento (algunas de las cuales son exclusivas de esta especie), a la gran cantidad de proteína del extracto (comparándola con los otros dos extractos) y a la presencia de posibles proteínas alérgicas de bajo peso molecular (menor a 8 kd) presentes en el polen de *B. lenta*.

E) Western Blot

Analizando las placas, se observa que la proteína de 37 kd de *Bv* es reconocida por 4 de los 5 pacientes y la misma proteína pero de *Bo* es reconocida por 3 de los 5 pacientes. La proteína de 16 kd tanto de *Bv* como de *Bo* se reconoce en 3 de los 5 pacientes. Además el paciente 2 reconoce a la proteína de 29 kd de *Bv*.

Con estos datos se encuentra una relación más estrecha entre *Bv* y *Bo* debido a que las bandas de reconocimiento que se observan, involucran, en un alto porcentaje, a dos proteínas de ambos extractos: 37 y 16 kd, respectivamente, lo que indica inmunoquímicamente la reactividad alérgica cruzada entre estas dos especies, al menos, entre las dos proteínas antes mencionadas.

La proteína de 37 kd es la única que se llega a reconocer, por dos pacientes, en los tres extractos estudiados lo que podría implicar que esta proteína puede ser responsable de reactividad cruzada entre las tres especies de abedul.

El paciente 1 no mostró bandas de reconocimiento de proteínas lo cual se explica al revisar su resultado de IgE-alergeno específica, el cual fue de clase 0 (no detectable). Se podría cuestionar el porque se eligió a este paciente para este protocolo experimental; este paciente además de tener un diagnóstico certero de rinitis alérgica (y de síndrome oral alérgico), resultó con pruebas cutáneas positivas. Cuando nos preguntamos porque dio positivas las pruebas cutáneas pero resultó con IgE-abeldul específica no detectable, se revisó su expediente clínico y se observó su reporte de cuantificación de IgE-alergeno específica para alérgenos ingeribles y se observó que presentaba un resultado de clase 4 (muy

alta) en contra de la manzana y el durazno, dos frutas de la familia *Rosaceae*, con la cual el género *Betula sp.* presenta reactividad alérgica cruzada debido a que comparten varias secuencias de aminoácidos en la composición de sus proteínas alérgicas correspondientes.

F) Relación inmunológica inter – especie.

Los hallazgos experimentales presentados en este trabajo nos ayudan a establecer una estrecha relación inmunoquímica entre las tres especies de abedul analizadas: en primer lugar, desde el punto de vista clínico donde se observó que los tres abedules sensibilizan a los pacientes alérgicos, demostrándolo con el resultado de las pruebas cutáneas, y no sólo eso, sino que presentan reactividad alérgica cruzada *in vivo*. De la misma forma, los estudios *in vitro*, nos permiten decir que esta relación también involucra el aspecto molecular, porque a pesar de hallar diferencias notables en el perfil protéico de los extractos alérgicos, se encontraron evidencias que sugieren fuertemente, la existencia de reactividad alérgica inter – especie *in vitro*, la cual debe ser establecida completamente con la realización de un estudio de población prospectivo en donde se analicen, de forma exhaustiva y profunda, los aspectos químicos, moleculares e inmunológicos de las evidencias encontradas en el presente trabajo.

El poder establecer la capacidad de sensibilización de las tres especies de abedul estudiadas, obliga a abrir nuevas líneas de investigación para analizar a

estas especies (y en especial, a las predominantes en México) desde puntos de vista más específicos donde se resalte la relevancia que estas fuentes de alergenios representan para la población alérgica, y que hasta este momento habían sido ignoradas por alergólogos e investigadores de estos temas.

VIII.- CONCLUSIONES.

- I. *Betula verrucosa*, *Betula occidentalis* y *Betula lenta* presentan reactividad alérgica cruzada *in vivo*.
- II. Las tres especies de *Betula sp.* estudiadas inducen la producción de altas cantidades de IgE-alérgeno específica, cuantificables a nivel sérico.
- III. A pesar de las similitudes encontradas, existen diferencias sustanciales en el patrón electroforético de los tres extractos alérgicos analizados.
- IV. Se establece la posible participación de la proteína de 36 kd de los tres extractos como responsable de reactividad alérgica cruzada *in vitro* entre ellos. Además, la proteína de 16 kd tanto de *Betula verrucosa* como de *Betula occidentalis* provoca reactividad alérgica cruzada entre estas dos especies.
- V. Las especies de *Betula sp.* predominantes en México son sensibilizantes de la población alérgica. Por lo tanto, éste trabajo establece la necesidad de realizar un estudio exhaustivo de las relaciones inmunoquímicas entre las especies *Betula verrucosa*, *Betula occidentalis* y *Betula lenta*.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Norman, SP. SIGNIFICADO CLÍNICO DE LA IgE. Tribuna Médica. 1976, : 9-19.
- 2) Laboratorio de Inmunoalergología y Micología Médica de la División de Investigación y Enseñanza del Hospital Juárez de México. BITÁCORAS DE REGISTRO DE ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS ESPECIALIZADOS. 1999 – 2002.
- 3) Middleton, E. Reed, E. ALLERGENIC EXTRACTS. ALLERGY, PRINCIPLES AND PRACTICE. CV Mosby Co . ThirEd. Vol. II. USA. 1996: 353-368.
- 4) Roitt, I. INMUNOLOGÍA . Salvat Editores . 2ª edición . México . 19.1 – 19.20
- 5) Holgate, ST. Church, MK. ALLERGY. Gower Medical Pubs. London. UK. 1993
- 6) Paul, W. FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY . Lippincott-Raven Publishers . Fourth edition . USA. 1999 : 1589 – 1594
- 7) Fradkin, VA. ALERGENOS. Edit. MIR. Moscú, URSS. 1980.
- 8) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad . Archivos reportados en su página de internet, 2002.

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/

- 9) Salazar Mallén, M. LA ALERGIA EN LA TEORÍA Y LA PRÁCTICA. Ed. Méndez Oteo. México, D.F. 1958.
- 10) Secretaría de Salubridad y Asistencia. Centro Nacional de Referencias Epidemiológicas. Estadísticas anuales, 2001.

<http://www.ssa.gob.mx>

- 11) Sisk, C.: ALLERGENIC EXTRACTS REGULATORY PROGRESS IN THE USA. IN REGULATORY CONTROL AND STANDARDIZATION OF ALLERGENIC EXTRACTS. THE REPORT OF THE 3RD INTERNATIONAL PAUL-EHRLICH-SEMINAR. Edited by HD. Brede & E. Stevens. Stuttgart, Gustav Fisher Verlag. 1983. : 87-98

- 12) Turco, S. King, RE.: **STERILE DOSAGE FORMS: THEIR PREPARATION AND CLINICAL APPLICATION.** Chap. I and 16. Third ed. Lea & Fabiger, Phi. USA. 1987
- 13) Terr, AL. : **ALLERGY DISEASES.** In: Fudenberg, HH., Stites, DP., Calwell, JV. Eds. **BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY.** 3rd. Ed. Los Altos Cal. Lange Medical Pubs. USA. 1980: 515 – 524
- 14) Freedman, SO.: **ASTHMA AND ALLERGIC RHINITIS ASPECTS.** In: Freedman, SO. Gold, P. Eds. **Clin. Immunol.** 2nd. Ed. Hagerstown Md. Harper & Row, USA. 1976: 131- 142
- 15) Dreborg, S.: **SKIN TEST IN TYPE I: ALLERGY TESTING.** *Allergy* 44. (supp 1-10): 27. Muksgaard Int. Pub. Ltd. Copenhagen, Denmark. 1989.
- 16) Norman, PS. : **In Vivo METHODS OF STUDY OF ALLERGY : SKIN AND MUCOSAL TESTS. TECHNIQUES AND INTERPRETATION,** In: Middleton, E. Jr. Reed, CE. Ellis. Eds. **Allergy, Principles and Practice.** 2nd. Ed. St. Louis Mo. CV. Mosby Co. USA. 1983: 297.
- 17) www.ine.gob.mx/ueajei/plantas1_13/.html
- 18) www.semarnat.gob.mx/pfum/Corteza.html
- 19) www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/betulace.html
- 20) www.fciencias.unam.mx/Servicios/Apoyo/Editoriales/NUEV/Pub_Bio.html
- 21) Dreborg S, Foucard T. **ALLERGY TO APPLE, CARROT AND POTATO IN CHILDREN WITH BIRCH POLLEN ALLERGY .** *Allergy*; 1983, 38 : 167- 172
- 22) V Cadot P, Diaz JF, et al. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN 18-KD ALLERGEN OF BIRCH (*Betula verrucosa*) POLLEN: IDENTIFICATION AS A CYCLOPHILIN .** *J All Clin Immunol*; 2000, 105: 286 – 291
- 23) Spiekma F. Th.M. & Nikkels A.H. **SIMILARITY IN SEASONAL APPEARANCE BETWEEN ATMOSPHERIC BIRCH-POLLEN GRAINS AND ALLERGEN IN PAUCIMICRONIC, SIZE-FRACTIONATED AMBIENT AEROSOL.** *Allergy*; 1999, 54: 235-241
- 24) Hoffmann A., et al. **DETERMINATION OF THE ALLERGENIC ACTIVITY OF BIRCH-POLLEN AND APPLE PRICK TEST SOLUTIONS BY MEASUREMENT OF B-HEXOSAMINIDASE RELEASE FROM RBL-2H3 CELLS. COMPARISON WITH CLASSICAL METHODS IN ALLERGEN STANDARDIZATION.** *Allergy*; 1999, 54: 446 - 454

- 25) Schäppi G.F., et al. IMMUNOLOGIC SIGNIFICANCE OF RESPIRABLE ATMOSPHERIC STARCH GRANULES CONTAINING MAJOR BIRCH ALLERGEN BET V1. *Allergy*; 1999, 54: 478 – 483
- 26) Díez-Gómez M.L., et al. FRUIT-POLLEN-LATEX CROSS-REACTIVITY: IMPLICATION OF PROFILIN (BET V2). *Allergy*; 1999, 54: 951 – 961
- 27) Movérare, R., et al. STUDY OF THE TH1/TH2 BALANCE, INCLUDING IL-10 PRODUCTION, IN CULTURES OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM BIRCH-POLLEN-ALLERGIC PATIENTS. *Allergy*; 2000, 55: 171 – 175
- 28) Winther, L., et al. ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY IN BIRCH- AND GRASS-POLLEN-ALLERGIC RHINITIS. I. EFFICACY ESTIMATED BY A MODEL REDUCING THE BIAS OF ANNUAL DIFFERENCES IN POLLEN COUNTS. *Allergy*; 2000, 55: 818-826
- 29) Winther, L., et al. ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY IN BIRCH- AND GRASS-POLLEN-ALLERGIC RHINITIS. II. SIDE EFFECTS. *Allergy*; 2000, 55: 827 – 835
- 30) Anhøj, C., et al. DIAGNOSTIC EVALUATION OF GRASS- AND BIRCH-ALLERGENIC PATIENTS WITH ORAL ALLERGY SYNDROME. *Allergy*; 2001, 56: 548 – 552
- 31) Taylor, L., et al. FOODS ALLERGENS STRUCTURE AND IMMUNOLOGIC PROPERTIES. *Ann. Allergy*; 1987, 59: 93 – 99
- 32) Ortolani, C., et al. FRUIT ALLERGENS. *Progress in Allergy and Clinical Immunology*. Ed. Hogrefe & Huber [Pubs] 4 : 65 – 68
- 33) Karamloo F, Schmitz N, Scheurer S, Foetisch K, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A BIRCH POLLEN MINOR ALLERGEN, BET V5, BELONGING TO A FAMILY OF ISOFLAVONE REDUCTASE-RELATED PROTEINS. *J All Clin Immunol* . 1999; 104 (5): 991 – 999
- 34) Valenta, R. Duchene, M. et al. IDENTIFICATION OF PROFILIN AS A NOVEL POLLEN ALLERGEN; IGE AUTOREACTIVITY IN SENSITIZED INDIVIDUAL. *Science* . 1991; 254(5019): 557 – 560
- 35) Waverly, F. et al. PURIFICATION AND N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF TWO BIRCH POLLEN ISOALLERGENS (BET V1 AND BET V2) . *Int Arch Allergy Appl Immunol* . 1990 ; 93(4) : 378 – 384

- 36) Jones, G. et al. CHARACTERIZATION OF A BIRCH POLLEN ALLERGEN, BET V3, REPRESENTING A NOVEL CLASS OF CA2+ BINDING PROTEINS: SPECIFIC EXPRESSION IN MATURE POLLEN AND DEPENDENCE OF PATIENTS' IGE BINDING ON PROTEIN – BOUND CA2+ . EMBO J . 1994; 13(15) : 3481 – 3486
- 37) Engel, E., et al. IMMUNOLOGICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF BET V4, A NOVEL BIRCH POLLEN ALLERGEN WITH TWO- EF-HAND CALCIUM-BINDING DOMAINS. J Biol Chem. 1997;272(45):28630-7.
- 38) Twardosz A, Hayek B, Seiberler S, Vangelista L, Elfman L, Gronlund H, Kraft D, Valenta R. MOLECULAR CHARACTERIZATION, EXPRESSION IN *Escherichia coli* AND EPITOPE ANALYSIS OF TWO EF-HAND CALCIUM BINDING BIRCH POLLEN ALLERGEN, BET V4. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 239(1): 197 – 204
- 39) Díez-Gómez M.L., et al. FRUIT-POLLEN-LATEX CROSS-REACTIVITY: IMPLICATION OF PROFILIN (BET V2). Allergy; 1999, 54: 951 – 961
- 40) Karamloo F, Wangorsch A, Kasahara H, Davin LB, Haustein D, Lewis NG, Vieths S.. PHENYLCOUMARAN BENZYLIC ETHER AND ISOFLAVONOID REDUCTASES ARE A NEW CLASS OF CROSS-REACTIVE ALLERGENS IN BIRCH POLLEN, FRUITS AND VEGETABLES. Eur J Biochem. 2001; 268(20): 5310 – 5320
- 41) Niederberger, V ., Pauli, G. et al . RECOMBINANT BIRCH POLLEN ALERGENS(rBet v1 and rBet v2) CONTAIN MOST OF THE IgE EPITOPES PRESENT IN BIRCH, ALDER, HORNBEAM, HAZEL AND OAK POLLEN: A QUANTITATIVE IgE INHIBITION STUDY WITH SERA FROM DIFFERENT POPULATIONS. J Allergy Clin Immunol. 1998; 102 (4 Pt 1): 579 – 591.
- 42) Heiss, S. Fischer, S. et al. IDENTIFICATION OF A 60 Kd CROSS-REACTIVE ALLERGEN IN POLLEN AND PLANT-DERIVES FOOD. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98(5 Pt 1): 938 – 947.
- 43) Valenta, R. Duchene, M. et al. RECOMBINANT ALLERGENS FOR IMMUNOBLOT DIAGNOSIS OF TREE-POLLEN ALLERGY. J Allergy Clin Immunol. 1991; 88(6): 889 – 894.
- 44) Wellhausen, A. Schoning, B. et al. IgE BINDING TO A NEW CROSS-REACTIVE STRUCTURE: A 35 Kd PROTEIN IN BIRCH POLLEN, EXOTIC FRUIT AND OTHER PLANT FOODS. Z Ernährungswiss. 1996; 35(4): 348 – 355.
- 45) Ebner, C. Birkner, T. et al. COMMON EPITOPES OF BIRCH POLLEN AND APPLES—STUDIES BY WESTERN AND NORTHERN BLOT. J Allergy Clin Immunol. 1991; 88(4): 588 – 594.

- 46) Bauer, L. Ebner, C. et al. IgE CROSS-REACTIVITY BETWEEN BIRCH POLLEN, MUGWORT POLLEN AND CELERY IS DUE TO AT LEAST THREE DISTINCT CROSS-REACTING ALLERGENS: IMMUNOBLOT INVESTIGATION OF THE BIRCH-MUGWORT-CELERY SYNDROME. Clin Exp Allergy. 1996; 26(10): 1161 – 1170.
- 47) Hirschwehr, R. Jager, S. et al. ALLERGENS FROM BIRCH POLLEN OF THE EUROPEAN CHESTNUT SHARE COMMON EPITOPES. Clin Exp Allergy. 1993; 23(9): 755 – 761.
- 48) Rohac, M. Birkner, T. et al . THE IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIP OF EPITOPES ON MAJOR TREE POLLEN ALLERGENS. Mol Immunol . 1991; 28(8): 897 – 906.
- 49) Calkhoven, PG. Aalbers, M. et al. CROSS-REACTIVITY AMONG BIRCH POLLEN, VEGETABLES AND FRUITS AS DETECTED BY IgE ANTIBODIES IS DUE TO AT LEAST THREE DISTINCT CROSS-REACTIVE STRUCTURES. Allergy . 1987; 42(5): 382 – 390.
- 50) Spangfort, MD. Larsen, JN. et al . CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY INVESTIGATION AT 2.0 Å RESOLUTION OF Bet v1, A BIRCH POLLEN PROTEIN CAUSING IgE-MEDIATED ALLERGY. Proteins . 1996; 26(3): 358 – 360.
- 51) Grote, M. Hayek, B. et al . IMMUNOGOLD ELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF THE CROSS-REACTIVE TWO-EF-HAND CALCIUM-BINDING BIRCH POLLEN ALLERGEN Bet v4 IN DRY AND REHYDRATED BIRCH POLLEN. Int Arch Allergy Immunol . 1999; 120(4): 287 – 294.
- 52) Jarolim, E. Rumpold, H. et al. IgE AND IgG ANTIBODIES OF PATIENTS WITH ALLERGY TO BIRCH POLLEN AS TOOLS TO DEFINE THE ALLERGEN PROFILE OF *Betula verrucosa*. Allergy . 1989; 44(6): 385 – 395.
- 53) Ganglberger, E. Grunberger, K. et al. IgE MIMOTOPES OF BIRCH POLLEN ALLERGEN Bet v1 INDUCE BLOCKING IgG IN MICE. Int Arch Allergy Immunol . 2001; 124(1 – 3): 395 – 397.
- 54) Tinghino, R. Twardosz, A. et al . MOLECULAR, STRUCTURAL AND IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIPS BETWEEN DIFFERENT FAMILIES OF RECOMBINANT CALCIUM-BINDING POLLEN ALLERGENS. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109(2): 314 – 320.
- 55) Romagnani, S. Parronchi, P. et al . THE "Th2 HYPOTESIS" IN ALLERGY. Main Symposium I, Progress in Allergy and Clinical Immunology, volume 4,

Cancún (México): proceedings of the XVth International Congress of Allergology and Clinical Immunology, october 19 – 24 , 1997. pp 12 – 16.

- 56) **Canonica, G. Passalacqua, G. et al . ADHESION MOLECULES IN ALLERGIC INFLAMMATION: THERAPEUTICAL PERSPECTIVES OF ITS MODULATION . Main Symposium I, Progress in Allergy and Clinical Immunology, volume 4, Cancún (México): proceedings of the XVth International Congress of Allergology and Clinical Immunology, october 19 – 24 , 1997. pp 17 – 21.**
- 57) **Ebisawa, M. Tachimoto, H. et al . ROLE OF CYTOKINES AND CHEMOKINES IN LATE PHASE ALLERGIC REACTION. Main Symposium I, Progress in Allergy and Clinical Immunology, volume 4, Cancún (México): proceedings of the XVth International Congress of Allergology and Clinical Immunology, october 19 – 24 , 1997. pp 1- 6.**
- 58) **Krensky, A. THE BIOLOGY OF THE CHEMOKINE RANTES. Main Symposium I, Progress in Allergy and Clinical Immunology, volume 4, Cancún (México): proceedings of the XVth International Congress of Allergology and Clinical Immunology, october 19 – 24 , 1997. pp 7 – 11.**
- 59) **Wadee, A. Rabson, A . et al . FRUIT ALLERGY : DEMONSTRATION OF IgE ANTIBODIES TO A 30 kd PROTEIN PRESENT IN SEVERAL FRUITS. J Allergy Clin Immunol . 1990; 85: 801 – 807.**
- 60) **Ausubel, F.A., Brent, R. et al . CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY . Green Publishing and Wiley – Interscience . New York . 1995 . Unit 10.2, 10.4, 10.5 y 10.7.**
- 61) **MAST Immunosystems™. Proceeding Manual CLA-1™ Luminometer. 1999. Section 3.**
- 62) **Halse, R. ALLERGENIC PLANTS NOMENCLATURE . Ann Allergy. 1984; 53: 291 – 309.**

X. APÉNDICE

Extractos alergénicos.

Betula verrucosa 1:10 p/v
Betula occidentalis 1:10 p/v
Betula lenta 1:10 p/v
Solución de fosfato de histamina (1mg/ml)
Solución de Evan's
-Todo de Allerstand S.A. de C.V., México.

Soluciones Stock

Solución de monómeros (30/0.8%)

30.0 g acrilamida
0.8 g bisacrilamida
ddH₂O hasta 100 ml
Filtrar con papel Whatman 1 y guardar en la oscuridad a 4°C.

Regulador de corrimiento (Tris 0.025 M, glicina 0.192M, SDS 0.1%, pH 8.3)

3.0 g Trizma base
14.4 g Glicina
10.0 mL SDS 10%
ddH₂O hasta 1 L

Regulador del gel de separación (Tris 0.5 M, pH 8.8)

18.5 g Trizma base
Añada 90 ml de ddH₂O
Ajuste a pH 6.8 con HCl concentrado
Aforar a 100.0 mL con ddH₂O
Filtrar con papel Whatman 1 y guardar a 4°C.

Regulador del gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)

3.0 g Trizma base
Añada 40 ml de ddH₂O
Ajuste a pH 6.8 con HCl concentrado
ddH₂O hasta 50 ml
Filtrar con papel Whatman 1 y guardar a 4°C.

SDS 10%

10.0 g SDS
ddH₂O hasta 100 ml

Persulfato de amonio 10%

0.1g de persulfato de amonio
ddH₂O hasta 1.0 ml
Separar en alícuotas de 100 µl

Regulador de muestra 2X

2.5 ml Regulador del gel concentrador
4.0 ml SDS 10%
2.0 ml glicerol
0.5 ml ddH₂O

Al momento de usarse se separan alícuotas de 1 ml + 100 µl de β-mercaptoetanol por cada ml del regulador y unos cristales de azul de bromofenol.

n-Butanol agua-saturado

50 ml n-butanol
5 ml ddH₂O

Reactivos adicionales

Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope™ Prestained Standards, Bio Rad, #catálogo 161-0324)
Tetrametiletilendiamina (TEMED)

EQUIPO

Cámara de electroforesis Hoeffer, peines, placa para el gel, separadores de 1 mm de grosor, micropipetas, fuente de poder, etc.

Buffer de transferencia

3.03g Trizma base
14.4g glicina
100 ml metanol
ddH₂O hasta 1 L

REACTIVOS ADICIONALES Y EQUIPO

Cámara de transferencia semi-seca Trans-Blot™SD (Bio-Rad)

Cojinetes gruesos de papel
Membrana de nitrocelulosa Osmonics™

-TINCIÓN CON PONCEAU S
Soluciones

PONCEAU S

0.1% p / v Ponceau S, 5% ácido acético
1.0g Ponceau S
50 ml de ácido acético
Llenar a 1L con ddH₂O

-INMUNODETECCIÓN
Reactivos adicionales y soluciones.

TBS(Tris-buffered saline; 100 mM Tris/HCl, 0.9% NaCl)

12.11 g Tris/HCl (PM 121.1)
Añada 900 ml ddH₂O
9g NaCl
Ajuste a pH 7.5 con HCl concentrado
Diluya a 1L con ddH₂O

Tween TBS(TBS-T)

TBS con 0.1% Tween-20

Solución de bloqueo 7%

3.5 g Leche descremada seca
TBS-T hasta 50 ml.

- Sueros de pacientes,
- Anticuerpo primario → IgG de cabra anti-IgE humana
- Anticuerpo secundario → IgG anticabra marcada con HRP
- Solución reveladora (ECL WB Reagents, Amersham Biosciences, #catálogo RPN 2106)
- Placas de revelado (Biomax MR-1, Kodak, Amersham Biosciences)

Sustancias empleadas:

- Bisacrilamida.- Sigma, #catálogo M-7279
- Acrilamida.- Bio Rad, #catálogo 161-0101
- Trizma base.- Gibco-BRL, #catálogo 5504UA

- SDS.- Sigma, #catálogo L-4509
- Persulfato de amonio.- Bio Rad, #catálogo 161-0700
- Glicina.- Sigma, #catálogo G-7126
- TEMED (N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina).- Sigma, #catálogo T-9281
- β -mercaptoetanol.- Sigma, #catálogo M-7154

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**