



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

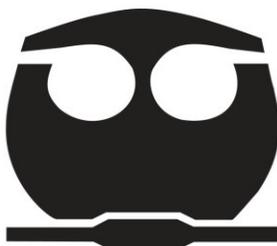
FACULTAD DE QUÍMICA

***IDENTIFICACIÓN POR INMUNOPROTEÓMICA DE
LOS ANTÍGENOS RELACIONADOS EN LA
HIPERSENSIBILIDAD A LA LECHE EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS.***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
Angélica Torres Arroyo.**



MÉXICO, D.F.

MAYO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Bertha Resendiz Vázquez

VOCAL: Profesora: Mónica Berenice Heras Chavarría

SECRETARIO: Dr. Horacio Reyes Vivas

1er. SUPLENTE: Profesora: Sonia Mayra Pérez Tapia

2º SUPLENTE: Profesor: José Guadalupe De La Rosa Canales

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA GENÉTICA,

TORRE DE INVESTIGACIÓN.

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Horacio Reyes Vivas

SUSTENTANTE:

Angélica Torres Arroyo

AGRADECIMIENTOS.

A mi jurado revisor: Bertha Resendiz Vázquez, Mónica Berenice Heras Chavarría y Horacio Reyes Vivas; gracias por sus correcciones y sugerencias.

A la Dra. Dolores Correa, Héctor Luna Pastén, Dr. Francisco Espinoza y al Dr. Gabriel López Velazquez del Instituto Nacional de Pediatría; por su colaboración para realizar este proyecto.

Al Dr. Jesus Antonio Oria Hernández por su revision a esta tesis.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría de Agosto 2009 a Septiembre 2010, bajo la dirección del Dr. Horacio Reyes Vivas. Durante el proyecto Angélica Torre Arroyo recibió una beca de la Secretaria de Salud en el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) 2009.

A MI PADRE;

POR TU EJEMPLO, TU CONFIANZA Y TU CARIÑO, SIEMPRE TE
LLEVO EN MI CORAZÓN, SIEMPRE SERAS EL HOMBRE DE MI VIDA
DONDE QUIERA QUE ESTES.....

A MI MADRE;

POR TU AMOR Y FORTALEZA, MIL GRACIAS POR SER TAN TENAZ
Y POR QUERERNOS TANTO.....

A MIS HERMANAS,

POR SER MÍ APOYO EN TODO MOMENTO.....

A MIS HERMANOS,

POR TODOS LOS DÍAS JUNTOS.....

Quiero agradecerles lo que ahora soy.....

ÍNDICE

Resumen

Abreviaturas

I.	Introducción	1
	A. Reacciones adversas a los alimentos	1
	B. Hipersensibilidad a las proteínas de leche de vaca (HPLV)	2
	C. Fisiopatología de la HPLV	
	1. Mecanismo inmunológico	4
	2. Mecanismos de daño inmunológico. Mecanismos de las reacciones de hipersensibilidad	
	a) Tipo I (Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE)	6
	b) Tipo II (Reacción citotóxica)	7
	c) Tipo III (Complejos inmunes)	8
	d) Tipo IV (Reacción mediada por células)	9
	3. Tolerancia oral	10
	D. Manifestaciones clínicas	12
	E. Procedimientos diagnósticos	13
	1. Historia clínica	13
	2. Pruebas cutáneas	14
	a) Skin Prick Test (SPT)	14
	3. Pruebas de provocación/tolerancia. DBPC	15
	F. Tratamiento	15
	1. Dietas de eliminación del alérgeno.	16
	a) Formulas hidrolizadas	16
	2. Tratamiento farmacológico	18

	3. Niveles de prevención para la HPLV	18
II.	Justificación	19
III.	Hipótesis	19
IV.	Objetivos	20
V.	Materiales y métodos	21
	A) Obtención de sueros	
	i. Extracción de suero venoso	23
	ii. Obtención de proteínas de leche	23
	a) Remoción de inmunoglobulina G (IgG) del suero de leche	24
	B) Determinación de la concentración de los sueros y la proteína de leche. Determinación de proteínas por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA)	25
	C) Detección por métodos inmunoenzimáticos (ELISAS) de inmunoglobulinas G y E específicas contra proteínas de leche	
	i. Soluciones utilizadas	27
	ii. Procedimiento	28
	D) Técnica de inmunoprecipitación de IgG`s con proteína G-acoplada a perlas de agarosa. Purificación del complejo Ag-Ab	30
	E) Geles de acrilamida SDS-PAGE. Electroforesis de proteínas	32
	F) ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D)	
	i. Isoelectroenfoque (IEF)	34
	ii. Segunda dimensión	35
	G) Técnica de tinción de Coomassie Coloidal para geles SDS-PAGE	35
	H) Técnica de tinción de plata para geles SDS-PAGE	37

I)	Cromatografía de intercambio anionico para fraccionar proteínas de leche	38
J)	Western blot	38
K)	Identificación por "Finger Print" de distintas proteínas a través de digestión in gel con tripsina-TPCK	40
VI.	Datos clínicos: Paciente y Control	
i)	Resumen clínico del paciente	46
a)	Exploración física	46
b)	Diagnóstico	46
ii)	Control	46
VII.	Resultados	
1)	Determinación de proteína de suero de sangre venosa y de proteínas de leche	47
2)	Ensayos inmunoenzimáticos para la identificación de anticuerpos	49
3)	Técnicas de tinción compatibles con espectrometría de masas	53
4)	Inmunoprecipitación	54
5)	Identificación de proteínas por "Finger Print" en MALDI ToF	57
6)	Fraccionamiento de las proteínas de leche	58
7)	Ensayos de ELISA con las fracciones de proteínas de leche	61
8)	Western blot	62
VIII.	Discusión	64
IX.	Conclusiones	70
X.	Perspectivas	71
XI.	Bibliografía	72
XII.	Apéndice	

A) Proteómica	77
1. Herramientas de la proteómica	
a) Electroforesis bidimensional en gel (2-D)	78
b) Espectrometría de masas para análisis de proteínas y péptidos	79
i. MALDI-ToF	80
B) Técnicas inmunológicas	
1. ELISA	82
2. Western-blot	83
XIII. Glosario	85

RESUMEN.

Las proteínas de la leche de vaca (PLV) son de los primeros antígenos a los que se exponen los infantes; mientras que la mayoría de ellos tolera dichos antígenos, un porcentaje de la población infantil llega a desarrollar hipersensibilidad a las PLV (HPLV). En México, la incidencia de esta patología se estima que oscila entre el 5 y 7%; existe mayor riesgo en infantes con antecedentes de atopia y en los expuestos tempranamente a las PLV. Los síntomas varían y pueden aparecer durante el primer año de vida; pueden cursar desde dermatitis y prurito, hasta choque anafiláctico y muerte. Esto depende del mecanismo inmunológico que intervenga (Tipo I: inmediata mediada por IgE, Tipo II: reacción citotóxica, Tipo III: complejos inmunes, Tipo IV: reacción mediada por células).

El diagnóstico actual de la HPLV comprende 3 etapas: historia clínica, demostración de sensibilización mediada por IgE y pruebas de provocación/tolerancia controlada. El tratamiento se basa en la alimentación exclusiva de leche materna, supresión de lácteos en la dieta de la madre y el uso de fórmulas hidrolizadas, que suelen ser desagradables para el lactante. Un diagnóstico no oportuno promueve el rechazo al alimento, síndrome de malabsorción, vómito y diarrea persistente repercutiendo en el desarrollo y crecimiento del infante.

El presente trabajo comprende la búsqueda y propuesta de estrategias para apoyar el diagnóstico certero de HPLV en pacientes pediátricos de nuestra población. Las estrategias que se desarrollaron son el uso de métodos bioquímicos, inmunológicos y proteómicos. Esto permitió identificar en un paciente con diagnóstico clínico de alergia gastrointestinal, el anticuerpo que interviene en la respuesta inmune y algunas de las proteínas que provocan la HPLV. El análisis se comparó contra una muestra control (asintomático contra HPLV).

Los ensayos de ELISA se estandarizaron y demostraron que el anticuerpo que intervino en la respuesta inmune del paciente fue del tipo IgG. Se ensayaron técnicas de inmunoprecipitación para el aislamiento de las proteínas antigénicas de la leche; sin embargo, fue difícil discernir con certeza las causantes de la sintomatología. No obstante, se logró identificar con espectrometría de masas en formato MALDI-ToF, a la lactoferrina y lactoperoxidasa como potenciales proteínas responsables de la HPLV. Para identificar otras posibles proteínas antigénicas causantes de la HPLV, se realizó un fraccionamiento cromatográfico de éstas. Se obtuvieron nueve fracciones. El análisis de ELISA mostró que todas las fracciones reaccionan con distinta intensidad al suero del paciente. Mientras que, el análisis por Western-blot nos reveló la reacción de las IgG con varias proteínas en cuatro fracciones. Estas proteínas en la actualidad están en procesos de identificación por espectrometría de masas.

Con lo anterior, sugerimos que las metodologías desarrolladas pueden aplicarse para apoyar el diagnóstico certero de la HPLV y para la identificación de las proteínas alergénicas que producen la sintomatología de esta patología.

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
Ag	Antígeno
BCA	Acido bicinconinico
BG	β-galactosidasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CPA	Célula presentadora de antígeno
cbp	cuanto baste para
CHCA	α-cyano-4-hydroxy-cinnamic Acid
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
DBPC	Doble blind placebo controlled challenge
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay
EM	Espectrometría de masas
FA	Fosfatasa alcalina
GALT	Gut associate lymphoid tissues
GFP	Glu-fibrinogen
grs	Gramos
HCl	Acidoclorhidrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HPLV	Hipersensibilidad a las proteínas de la leche
HRP	Peroxidasa de rábano

hrs	Horas
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferon gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	kilo Dalton
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Tartrato de sodio y potasio
M	Concentración molar
MALDI	Matix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MeOH	Metanol
Ma	mili amperes
mg	Miligramos
mg/ml	miligramo por mililitro
mM	Concentración mili molar
mm	Milímetros
MPM	Marcador de peso molecular
MW	Molecular weight (Peso molecular)
m/z	Relación masa-carga
N	Concentración normal
NaCl	Cloruro de sodio

Na₂CO₃	Carbonato de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₄HCO₃	bicarbonato de amonio
NK	Natural killer
nm	Nanómetros
OPD	Orto-fenilendiamina
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Solución salina de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeno
PHps	Paciente hipersensible
pI	Punto isoelectrico
PL	Proteínas de leche
PLV	Proteínas de la leche de vaca
PSA	Persulfato de sodio
PTL	Proteínas totales de leche
PVDF	Polivinilidenofluoruro
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	Tetrametiletildiamina
TFA	Trifluoroacetic Acid
Th	Linfocito T helper (cooperador)
Th2	Linfocito T helper tipo 2
Th3	Linfocito T helper tipo 3
TGF-β	Transforming growth factor beta

TNF-α	Tumor necrosis factor alfa
ToF	Time of flight
TPCK	L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethylketone
rpm	revoluciones por minuto
μg	Microgramos
μL	microlitros
U.A.	Unidades arbitrarias de absorbancia
2-D	Dos dimensiones

I. INTRODUCCIÓN.

A) REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS.

Las reacciones adversas a los alimentos se consideran como cualquier reacción clínica presentada después de la ingesta de ciertos alimentos, mismas que pueden ser de dos tipos:

- **Reacciones de Hipersensibilidad a alimentos:** son procesos patológicos en los cuales se presentan reacciones excesivas e indeseables del sistema inmune, que resultan de las interacciones específicas entre antígenos (Ag) y Anticuerpos (Ab) o linfocitos sensibilizados.^[1,2,]
- **Intolerancia a los alimentos:** reacción adversa a alimentos o ingredientes alimentarios específicos, reproducible, no mediado por mecanismos inmunes. Puede desencadenarse por características farmacológicas de alimentos, por deficiencias enzimáticas o por mecanismos desconocidos.^[1,2,3,4]

La prevalencia de las reacciones de hipersensibilidad alimentaria oscila entre 10 al 15% de los casos con reacciones adversas; mientras que, para la intolerancia a los alimentos representa del 85 a 90% de los casos. Los alimentos asociados frecuentemente con síntomas de hipersensibilidad son: leche de vaca, huevo, cacahuete, frutos secos (nueces), soya, trigo, pescado y mariscos. La hipersensibilidad a las proteínas de leche de vaca (HPLV) es más común en lactantes; la reacción inmunológica es acompañada de diferentes signos y síntomas clínicos.^[2,3,5,6]

La hipersensibilidad a los alimentos es una enfermedad compleja, dependiente no sólo de la herencia poligenética, sino también de

factores ambientales. En la Tabla1 se citan varios de los factores de riesgo para el desarrollo de hipersensibilidad alimentaria.^[7, 8, 18]

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE HIPERSENSIBILIDAD A ALIMENTOS
Introducción temprana de alimentos
Sistema inmune de mucosas inmaduro
Incremento en la permeabilidad de la mucosa
Deficiencia de IgA o retraso la producción de IgA
Inadecuado equilibrio entre el sistema inmune intestinal con la flora comensal
Determinantes genéticas sesgadas hacia el desarrollo de Th2
Polimorfismos de las citocinas Th2 o de los genes de los receptores de IgE
Alteraciones inmunes (p.e. bajos niveles de TGF- β)
Infecciones gastrointestinales
Exposición a contaminantes ambientales
Alimentación del lactante utilizando leche materna combinada con fórmulas lácteas maternizadas durante los primeros 3 meses de vida

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a la hipersensibilidad alimentaria.

B) HIPERSENSIBILIDAD A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA (HPLV).

La leche contiene las primeras proteínas extrañas introducidas en la dieta, por lo que la hipersensibilidad e intolerancia a éstas son la causa más común de enfermedades de tipo alimentaria en lactantes. La leche de vaca contiene cerca de 200 proteínas^[24] y todas ellas son potenciales antígenos en la especie humana. Los alérgenos principales son: la β -lactoglobulina, la caseína, la α -lactoalbúmina y la albúmina sérica. La β -lactoglobulina es una proteína que no existe en la especie humana y se encuentra en la leche materna en cantidades de microgramos debido a los lácteos ingeridos por la madre. Estas pequeñas cantidades son las responsables del mayor número de hipersensibilidad a esta proteína. En la Tabla 2 se muestra la composición proteica de la leche humana y la leche de vaca^[9, 11,12]

Proteína	Humano (mg/mL)	Vaca (mg/mL)
α-lactoalbúmina	2.2	1.2
α-s1-caseína	0	11.6
α-s2-caseína	0	3.0
β-caseína	2.2	9.6
κ-caseína	0.4	3.6
γ-caseína	0	1.6
Inmunoglobulinas	0.8	0.6
Lactoferrina	1.4	0.3
β-lactoglobulina	0	3.0
Lisozima	0.5	Trazas
Albúminasérica	0.4	0.4
Otras	0.8	0.6

Tabla 2. Composición proteica en leche humana y leche de vaca.^[10]

Así mismo, durante la lactancia, la administración de sucedáneos de leche de vaca al recién nacido pueden inducir la hipersensibilidad. La sensibilización puede ocurrir inclusive desde el útero, a través de la alimentación por el cordón umbilical. Existe mayor riesgo en infantes con antecedentes de atopía y/o aquellos expuestos tempranamente a las proteínas de leche. Esta patología era rara hasta 1950. A partir de la siguiente década se empezó a observar un incremento en el número de casos, probablemente asociado con un aumento de la exposición a las proteínas extrañas procedentes de la leche de vaca. Esto causado por el descenso en la lactancia materna producido en los países desarrollados; o quizás por el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de este padecimiento.^[2,11]

En México es común que los lactantes sean alimentados con leche de vaca, ya sea en su presentación líquida o en polvo. La situación económica propicia el uso de estas presentaciones debido a que son más baratas que las fórmulas infantiles. Sin embargo, el costo/beneficio y los daños que puede ocasionar a largo plazo resultan ser mayores comparados con la leche materna y con las fórmulas infantiles. No obstante, el uso de estas fórmulas no asegura que dicha patología deje de presentarse. Actualmente, en el mundo del 5 al 15% de los lactantes menores de 2 años presentan algún tipo de reacción de hipersensibilidad contra las fórmulas derivadas de la leche de vaca.^[9]

En los datos epidemiológicos internacionales se observa una importante variación entre las frecuencias de hipersensibilidad a las PLV reportadas en diferentes países (1.8%-7.5%). Lo anterior posiblemente revela diferencias en los criterios diagnósticos, diseño de estudios y particularidades geográficas. Sin embargo, casi todos los autores estiman una frecuencia de prevalencia que oscila entre el 2.5 y el 5%. Los síntomas sugestivos del diagnóstico se observan en un 5 al 15% de los niños, sin embargo, en alrededor de un 33% de los casos no se confirma la asociación. En México se desconoce la incidencia de esta patología pero podría oscilar entre 5% y 7%; actualmente se tiene la percepción clínica de que es un problema creciente.^[2,4]

C) FISIOPATOLOGÍA DE LA HPLV.

1. MECANISMO INMUNOLÓGICO.

A las pocas horas del nacimiento se desarrolla un sistema de digestión y protección inmunológica por el aparato gastrointestinal.

La barrera inmunológica del intestino está conformada principalmente por: la inmunoglobulina A (IgA), la inmunoglobulina M de secreción (IgM) y el GALT (tejido linfoide asociado al intestino), que es el lugar de inducción más importante del sistema inmunitario; el cual está compuesto por cuatro compartimentos linfoides distintos:

- 1) Folículos linfoides (placas de Peyer, el apéndice y nódulos linfáticos aislados).
- 2) Linfocitos y células plasmáticas de la lámina propia.
- 3) Linfocitos intraepiteliales localizados entre las digitaciones de los enterocitos.
- 4) Nódulos linfáticos mesentéricos.

La inducción de la respuesta inmune se realiza en los folículos de Peyer, se transporta a través de células M hacia la capa inferior rica en células presentadoras de antígeno (CPA), principalmente células dendríticas y macrófagos, que procesan los antígenos y los presentan a los linfocitos T cooperadores (Th). Los Th al activarse producen diferentes citocinas; dependiendo de las citocinas producidas, los linfocitos T pueden diferenciarse en 3 fenotipos conocidos como Th1, Th2 y Th3^[5, 10,12]. Por otro lado, los linfocitos B pueden activarse convirtiéndose así en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Aún con la integridad de los componentes de la barrera intestinal en el tubo digestivo maduro, tanto en niños como en adultos, cerca del 2% de los antígenos alimentarios ingeridos se absorben y transportan en una forma "inmunológicamente intacta". Estas proteínas reconocibles inmunológicamente llegan a la circulación, y en la mayoría de los individuos por lo general, no provocan reacciones adversas ya que desarrollan tolerancia. En contraste, en individuos susceptibles pueden favorecer el desarrollo de procesos de hipersensibilidad. ^[5,10]

2. MECANISMOS DE DAÑO INMUNOLÓGICO.

MECANISMOS DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD.

a) Tipo I (Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE).

La reacción se genera en un tiempo menor a 2 horas después de la ingesta de la proteína; se produce en respuesta a ciertos antígenos llamados alérgenos. Los síntomas están relacionados con el órgano o sistema donde las células plasmáticas están localizadas. La hipersensibilidad inmediata es mediada por la inmunoglobulina E (IgE) (Figura 1). [14,15, 17]

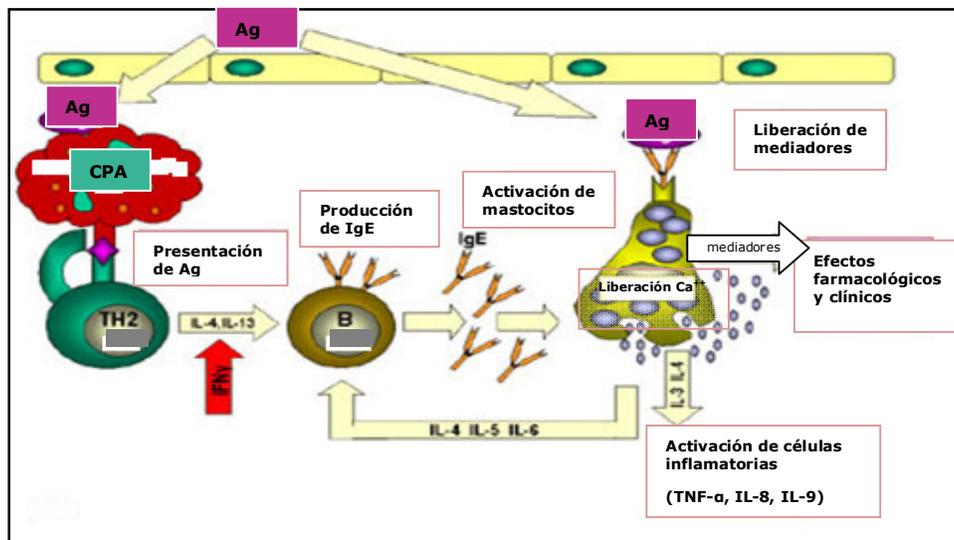


Figura1. Inducción y mecanismos efectoros de la hipersensibilidad tipo I. En los individuos que presentan este tipo de hipersensibilidad el antígeno (Ag) es captado y procesado por las células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA presentan las epítopes a las células TH2, que secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 favoreciendo la producción de anticuerpos (IgE) por linfocitos B que tienen gran afinidad por los receptores (Fcε;CD23) de los mastocitos y basófilos. Una subsecuente exposición al alérgeno provoca una interacción IgE-Fcε teniendo como consecuencia la degranulación de los mastocitos y basófilos. Esto libera diversas sustancias farmacológicamente activas como la histamina y los factores granulocíticos quimiotácticos.

b) Tipo II (Reacción Citotóxica).

Este tipo de hipersensibilidad afecta una gran variedad de órganos y tejidos. Es mediada principalmente por anticuerpos de clase IgM, IgG y factores del complemento (Figura 2). La trombocitopenia inducida por las proteínas de leche de vaca es un ejemplo de esta hipersensibilidad. [12, 17, 18]

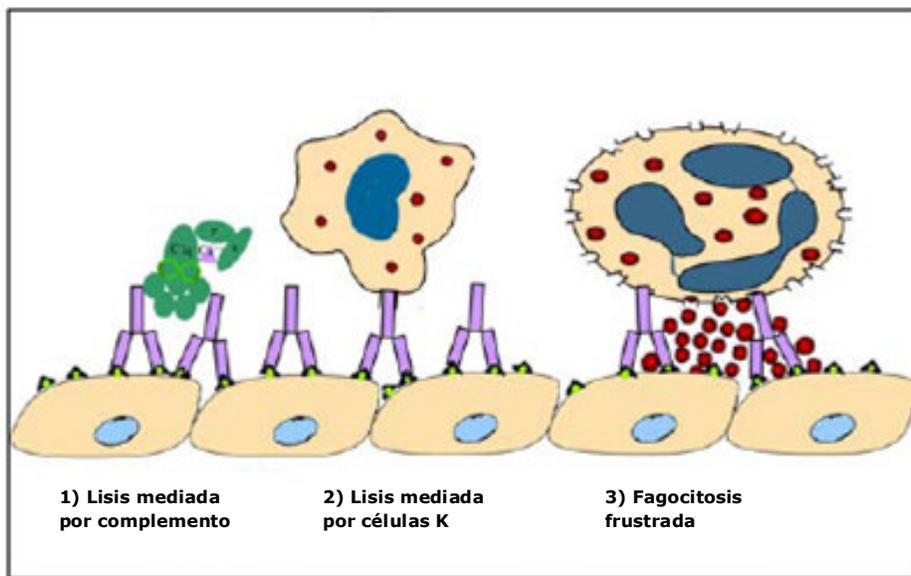


Figura 2. Mecanismos de la hipersensibilidad tipo II. Las IgM e IgG se unen a los antígenos que se encuentran adheridos a las membranas de las células, lo cual puede provocar: 1) La activación de la cascada del complemento; 2) La lisis celular provocada por la activación de células NK (natural killer) o 3) la liberación de factores tóxicos al medio externo debido a una fagocitosis frustrada; provocando en todos los casos la posterior destrucción de las células y daño en el tejido.

c) Tipo III (Complejos Inmunes).

La reacción de hipersensibilidad es causada por la deposición de agregados antígeno:anticuerpo o complejos inmunes en tejidos particulares, provocando una respuesta de inflamación local (Figura 3).^[15, 17,18]

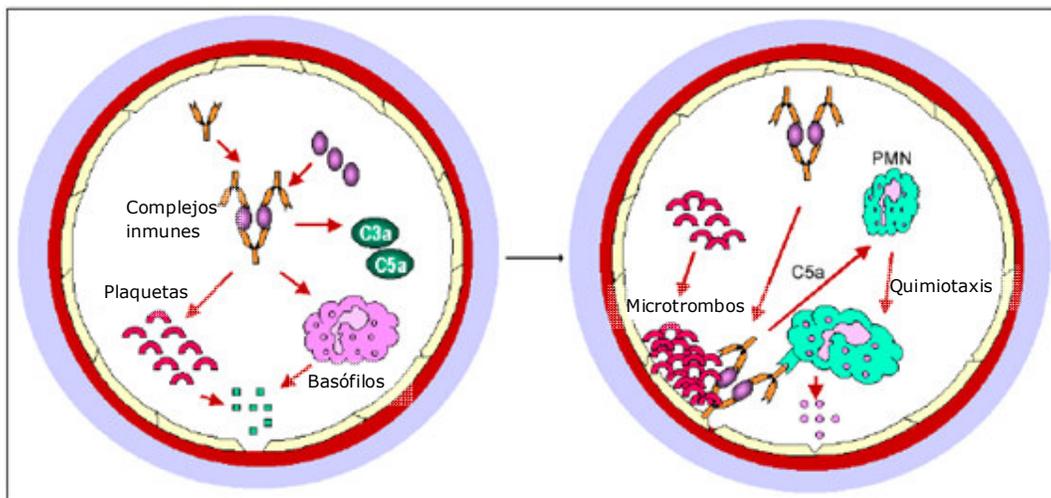


Figura 3. Mecanismo de daño de la hipersensibilidad tipo III. Las inmunoglobulinas de clase IgG, IgM y factores de la cascada del complemento (C3a, 4a y 5a) se unen a los antígenos que se encuentran en la circulación, formando los complejos inmunes solubles. Estos complejos interactúan con el endotelio de los vasos de pequeño calibre iniciando un proceso inflamatorio (vasculitis). A continuación se causa un daño al tejido del vaso mediado por las plaquetas y neutrófilos; dependiendo del grado y la extensión de la lesión se determinan las manifestaciones clínicas.

d) Tipo IV (Reacción mediada por células).

Los mecanismos de daño incluyen linfocitos T, monocitos y/o macrófagos (Figura 4). Los alérgenos reaccionan directamente con las células T cooperadoras (Th1) provocando la secreción de citocinas que activan macrófagos. Es una reacción retardada que puede presentarse junto con la reacción tipo III.^[17,18]

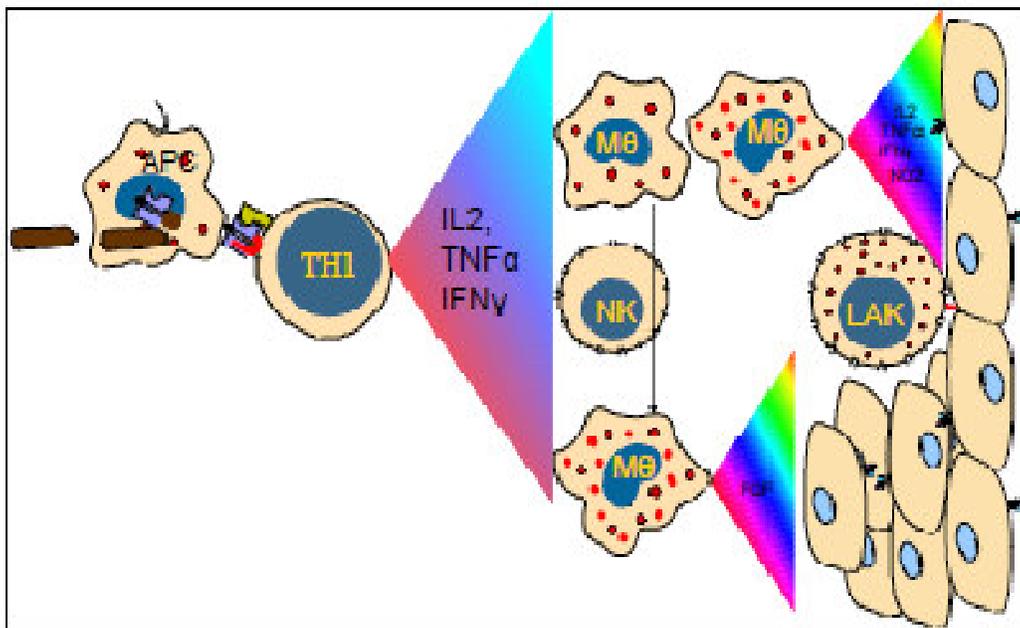


Figura 4. Mecanismo de daño en la hipersensibilidad retardada. Las células presentadoras de antígeno en este caso son los macrófagos que secretan IL-12, el cual estimula la proliferación de más linfocitos T. Los Th1 secretan también IL-2 e interferón gamma (IFN-γ), estimulando aún más la liberación de citocinas, de ese modo mediando la respuesta inmunitaria. Las células NK destruyen las células diana al entrar en contacto con ellas mientras que los macrófagos activados producen enzimas hidrolíticas y, ante ciertos patógenos intracelulares, se transforman en células gigantes multinucleadas.

3. TOLERANCIA ORAL.

Es una respuesta de hiporreactividad o de nula reactividad de las células maduras B y T a la exposición de antígenos (Ag`s) ingeridos por vía oral.^[13, 16] Los mecanismos involucrados en la tolerancia oral están influenciados por la magnitud de la dosis administrada. Las dosis bajas de Ag ejercen un efecto supresor mediado por citocinas producidas por la respuesta Th3 (Treg) ò induciendo anergia; mientras que, las dosis altas de Ag inducen una respuesta Th2. La respuesta dominante del GALT (tejido linfoide asociado al intestino) es la supresión o tolerancia de los Ag`s. Los métodos por los cuales el sistema inmune es "educado" para evitar la sensibilización a los antígenos derivados de los alimentos no se conoce por completo. Sin embargo, se sabe que los Ag`s conformados por proteínas y los patógenos intactos son tomados por las células M y procesados por CPA. La tolerancia a este tipo de Ag`s es mediada por una respuesta tipo Th3 (Treg).^[20, 21, 22]

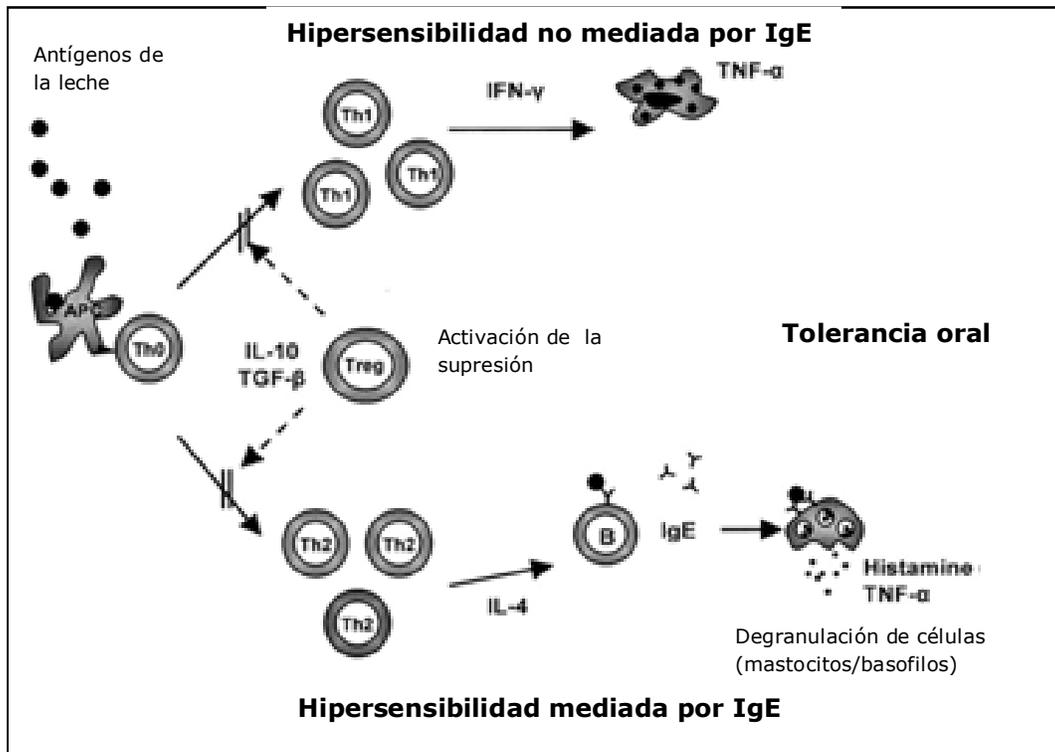


Figura 5. Mecanismos de reacciones de hipersensibilidad a las proteínas de leche. Las proteínas de leche son pinocitadas y procesadas por las CPA y los péptidos con los epítopes son presentados a las células T. En las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE las células T se diferencian a Th2 que señalizan a los linfocitos B vía IL-4, provocando la producción de anticuerpos específicos IgE que se unen a los receptores de los mastocitos (sensibilización). Posteriormente, cuando las proteínas de leche se unen a las IgE unidos a los mastocitos causan su degranulación y el aumento del poder inflamatorio de los mediadores (activación). El mecanismo no mediado por IgE aun no está claro, pero puede involucrar la activación de células inflamatorias vía interferón-gamma (INF- γ). La tolerancia oral es activada por la anergia de las células T o por la acción de las células T reguladoras (Treg) que suprimen la acción efectora de las células T (Th1 y Th2) vía interleucina-10 (IL-10), factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) o por contacto célula-célula.^[10]

D) MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

La gran diversidad de expresión clínica de la hipersensibilidad a los alimentos se debe a que todos los mecanismos de hipersensibilidad pueden presentarse de forma aislada o combinada.

Normalmente la clínica se manifiesta en el primer año de vida. El inicio de los síntomas coincide con la introducción temprana, frecuente o inadecuada, de fórmulas derivadas de la leche de vaca, y excepcionalmente con leche materna asociada a consumo de lácteos por la madre durante la lactancia.^[1, 19]

La prematurez, enfermedad hipóxica-isquemia, resecciones intestinales, desnutrición, diarrea toxigénica, enterocolitis necrosante, deficiencia de IgA, son factores de riesgo para la sensibilización a las proteínas de leche.^[7, 8]

Las manifestaciones clínicas de hipersensibilidad a las proteínas de leche, de acuerdo al órgano afectado, pueden agruparse en:

- 1) **Reacciones Gastrointestinales**: Diarrea crónica, diarrea con moco y sangre, náusea/vómito, dolor abdominal, distensión abdominal, disquecia, sangrado oculto.
- 2) **Reacciones en el Aparato Respiratorio**: Rinoconjuntivitis, broncoespasmo, laringoespasmos, asma, cianosis, tos crónica, neuropatías.
- 3) **Reacciones Cutáneas**: Urticaria aguda, angioedema, eczema (dermatitis aguda).
- 4) **Reacciones Neurológicas**: Pseudoconvulsiones, irritabilidad, llanto nocturno y alteraciones en el patrón de sueño.
- 5) **Reacciones Sistémicas**: Choque anafiláctico, expresión cutánea, respiratoria, gastrointestinal y cardiovascular, hipotensión, colapso vascular y disrritmias agudas.^[1, 2,5,19]

Los factores que determinan porqué aparece un determinado cuadro clínico y qué tipo de respuesta inmunológica está interviniendo en cada caso, en la actualidad no están bien determinados. [2,9]

E) PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS.

Las técnicas diagnósticas para la HPLV comprenden 3 etapas:

- 1) Historia clínica compatible con las manifestaciones típicas de hipersensibilidad.
- 2) Demostración o no de sensibilización mediada por IgE mediante pruebas cutáneas en prick o con el alérgeno adecuado y/o IgE sérica específica para la leche y sus proteínas.
- 3) Prueba de provocación/tolerancia controlada salvo contraindicación clínica. [12, 19,23]

1. Historia Clínica.

Para el diagnóstico clínico es esencial elaborar un historial detallado de datos subjetivos con referencia a la presencia de antecedentes familiares y/o personales de atopía, tipo de alimentación (materna, fórmulas, presencia de biberones esporádicos); edad al comienzo de los síntomas, tiempo transcurrido entre la ingesta de leche y la aparición de los síntomas; tipo de síntomas, etc... La anamnesis debe completarse con una exploración física detallada y, si existen síntomas digestivos, búsqueda de signos de malabsorción y/o malnutrición. [1, 2, 5, 6, 19]

2. Pruebas Cutáneas.

Se utilizan para diagnosticar los cuadros mediados por IgE. En general, la fiabilidad diagnóstica parece similar a la determinación de IgE específica en suero. Estas pruebas consisten en reproducir la reacción alérgica de una forma estrictamente localizada en un punto de la piel, en el que se inocula el alérgeno. Su práctica se basa en la suposición de que si un individuo está sensibilizado y posee anticuerpos IgE específicos contra un antígeno, éstos están fijados a las membranas de los mastocitos de la piel además de los órganos responsables de la manifestación clínica, de forma que al inocular el alérgeno en la piel, se provoca la degranulación de los mastocitos presentes. ^[5,12, 19]

a) SKIN/PRICK TEST (SPT)

Se realiza aplicando en la piel punciones de extractos estandarizados de diferentes alérgenos presentes en la leche (caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina), un control positivo (histamina) y un control negativo (solución salina). Tiene una sensibilidad del 69% y una especificidad de 91% con la presencia de una pápula mayor de 3 mm, lo que indica la posibilidad de que el paciente tenga síntomas debidos a la leche. Sin embargo, los resultados en lactantes menores de 1 año son negativos debido a su inmadurez inmunológica ya que en muchos casos, la reacción de hipersensibilidad no es mediada por anticuerpos. ^[1,19]

3. Pruebas de provocación/tolerancia.
DBPC (*Double blind placebo controlled challenge*): Reto de provocación controlado doble ciego.

Aunque diversos autores utilizan distintos protocolos, en general la prueba consiste en establecer una secuencia aleatoria de administración de una o varias fórmulas experimentales y una control. La fórmula experimental se introduce en diluciones crecientes y se miden una serie de resultados como la sintomatología.

Cuando se desencadena la clínica se interrumpe la provocación y algunos autores desenmascaran la asignación, mientras otros administran el placebo hasta terminar el período de seguimiento.

Las fórmulas se preparan de forma ciega, así ni los padres ni los clínicos conocen la asignación. El período de seguimiento y los tiempos de evaluación y medida de resultados varían según los distintos protocolos. Algunos autores requieren una fase de supresión para el diagnóstico, de tal forma que si después de ésta desaparece la sintomatología y reaparece con la reintroducción, la HPLV queda confirmada. [4, 10, 11]

F) TRATAMIENTO.

Actualmente no existe cura para la HPLV, el tratamiento incluye la eliminación del alérgeno específico de la dieta (proteínas de leche). El tratamiento farmacológico y las medidas preventivas, donde la única estrategia eficaz es evitar la ingesta de las proteínas causantes de la reacción inmunológica. [4, 10, 13]

1. Dietas de eliminación del alérgeno.

La eliminación de la proteína causante es el único tratamiento bien probado. Es necesario proporcionar información suficiente a familiares para la correcta eliminación del alérgeno y para seleccionar fuentes alternas de nutrientes, que aseguren el adecuado crecimiento y desarrollo.^[10]

La HPLV es la hipersensibilidad más frecuente en la edad pediátrica. Esto se debe a que las proteínas de leche bovina es el alérgeno con el que más tempranamente se enfrentan los individuos susceptibles no alimentados con leche materna. La alimentación al seno materno es la primera elección en la alimentación del paciente con HPLV. Cuando no es posible la lactancia materna, una posible selección es utilizar una fórmula hipoalérgica a base de hidrolizados de proteínas de leche. ^[1, 5,12]

a) Fórmulas hidrolizadas.

La leche de vaca contiene numerosos componentes proteicos que pueden actuar como potenciales alérgenos como son: la β -lactoglobulina, caseína, albúminasérica, γ -globulina y la α -lactoalbúmina.

Existen dos tratamientos a las que son sometidas las proteínas de la leche de vaca, con el fin de reducir su alergenicidad: tratamiento térmico e hidrólisis enzimática.

La pasteurización (calentamiento a 75°C por 15 seg) no reduce la carga antigénica; mientras que, el calentamiento a mayor intensidad (120°C por 20 seg) destruye la antigenicidad de la mayor parte de las proteínas solubles, sin embargo la α -lacto albúmina se renaturaliza al enfriarse y sólo se reduce moderadamente a la caseína.

Para una auténtica reducción hay que recurrir a técnicas de hidrólisis enzimática y posterior ultrafiltración.

- ✓ **Hidrólisis enzimática**. Destrucción progresiva de las proteínas por medio de proteasas como la tripsina, quimiotripsina y pepsina, sin destruir aminoácidos.
- ✓ **Ultrafiltración**. Se eliminan proteínas y péptidos de alto peso molecular y las proteasas residuales.

Según el grado de hidrólisis podemos hablar de:

- **Hidrolizados parciales** (péptidos de peso molecular superior a 5000 Da)
- **Hidrolizados extensivos** (péptidos de peso molecular entre 1500 y 5000 Da)
- **Fórmulas altamente hidrolizadas** (péptidos de peso molecular menor a 2000 Da)

La antigenicidad y alergenicidad se relaciona directamente con el tamaño de los péptidos; por lo que las fórmulas altamente hidrolizadas presentan menor capacidad alergénica que los otros hidrolizados. Sin embargo, aun hay riesgo de que el lactante desarrolle alguna respuesta ante la exposición de los péptidos presentes en estos hidrolizados. El uso de la hidrólisis enzimática da como resultados péptidos amargos. El sabor amargo está en función de la enzima utilizada, del sustratoproteico y de la extensión de la hidrólisis. Los hidrolizados parciales, por tener un menor grado de hidrólisis, tienen mejores características organolépticas.^[11, 13]

2. Tratamiento farmacológico.

No existe medicamento alguno que prevenga o cure las hipersensibilidades alimentarias. Los antihistamínicos H1 y H2, antileucotrienos, Ketotifeno, esteroides y bloqueadores de la bomba de protones pueden utilizarse para aliviar los síntomas por hipersensibilidad a los alimentos.^[5, 10, 23]

3. Niveles de prevención para la HPLV.

La HPLV puede abordarse en tres niveles de prevención:

- ✓ **Prevención primaria:** Bloquea la sensibilización inmunológica a la leche, mediada particularmente por IgE. La mejor estrategia para evitar la sensibilización a PLV es la lactancia materna exclusiva hasta los 4-6 meses de edad del lactante.
- ✓ **Prevención secundaria:** Suprime la expresión de la enfermedad después de la sensibilización. Para evitar las reacciones adversas ante el contacto con las proteínas alergénicas, el alimento que contiene dichas proteínas es retirado de la dieta del paciente. En el caso de los pacientes con HPLV se les recomienda tomar fórmulas extensivamente hidrolizadas.
- ✓ **Prevención terciaria:** Inducción de tolerancia en individuos sensibilizados (Inmunoterapia Específica). Se induce la regulación inmune mediante la exposición controlada a él alérgeno que a menudo se modifica para evitar que se desencadenen reacciones adversas.^[5, 10, 23]

II. JUSTIFICACIÓN

La hipersensibilidad a las proteínas de leche de vaca (HPLV) es un desorden complejo; en México la incidencia de esta patología es incierta, sin embargo se calcula que entre 5 y 7% de los lactantes son afectados. El diagnóstico se basa principalmente en la historia clínica del paciente, en la identificación o no de IgE específicas y en pruebas de provocación/tolerancia que en muchos casos resultan riesgosas para el paciente. Muchas veces debido a la complejidad y variabilidad de los cuadros clínicos presentados en los pacientes, el diagnóstico es equivoco. Esto repercute directamente en el crecimiento y desarrollo normal, además de causar problemas metabólicos en los infantes con HPLV. Actualmente en la población mexicana no existen estudios acerca de los mecanismos inmunológicos que provocan la sintomatología de la HPLV; tampoco de cuál es la proteína o proteínas que contienen las regiones antigénicas que causan la reacción de la respuesta inmune. Por lo anterior se sugiere el desarrollo de nuevas técnicas más seguras; que apoyen al diagnóstico certero de esta patología y al estudio de las proteínas antigénicas causantes de este desorden. Sugerimos que la inmunoproteómica puede ser una herramienta valiosa para la obtención del análisis certero del diagnóstico para la HPLV.

III. HIPÓTESIS

- ✓ **C**on la aplicación de métodos bioquímicos, inmunológicos y de proteómica se pueden desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico para la hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca, las cuales permitan diseñar estrategias para la identificación de las proteínas que causan la reacción de hipersensibilidad.

IV. OBJETIVOS.

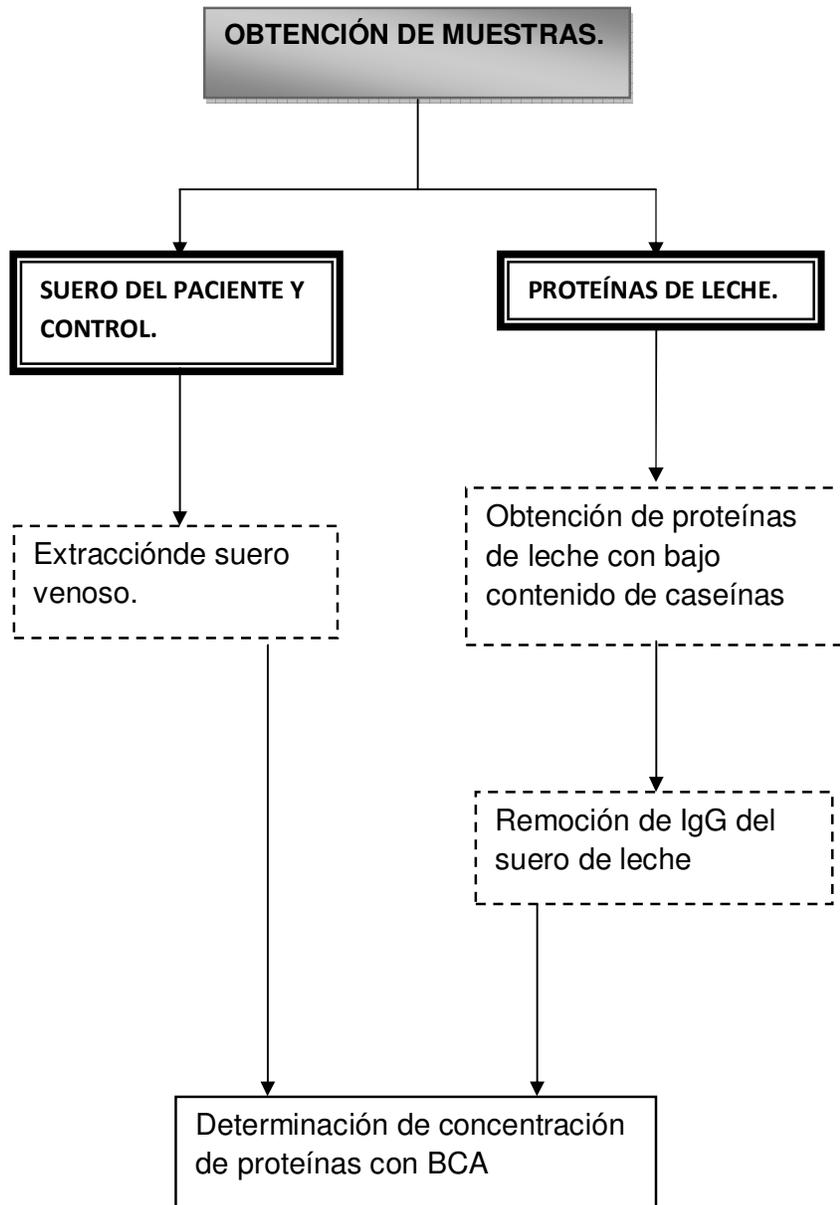
OBJETIVOS GENERALES:

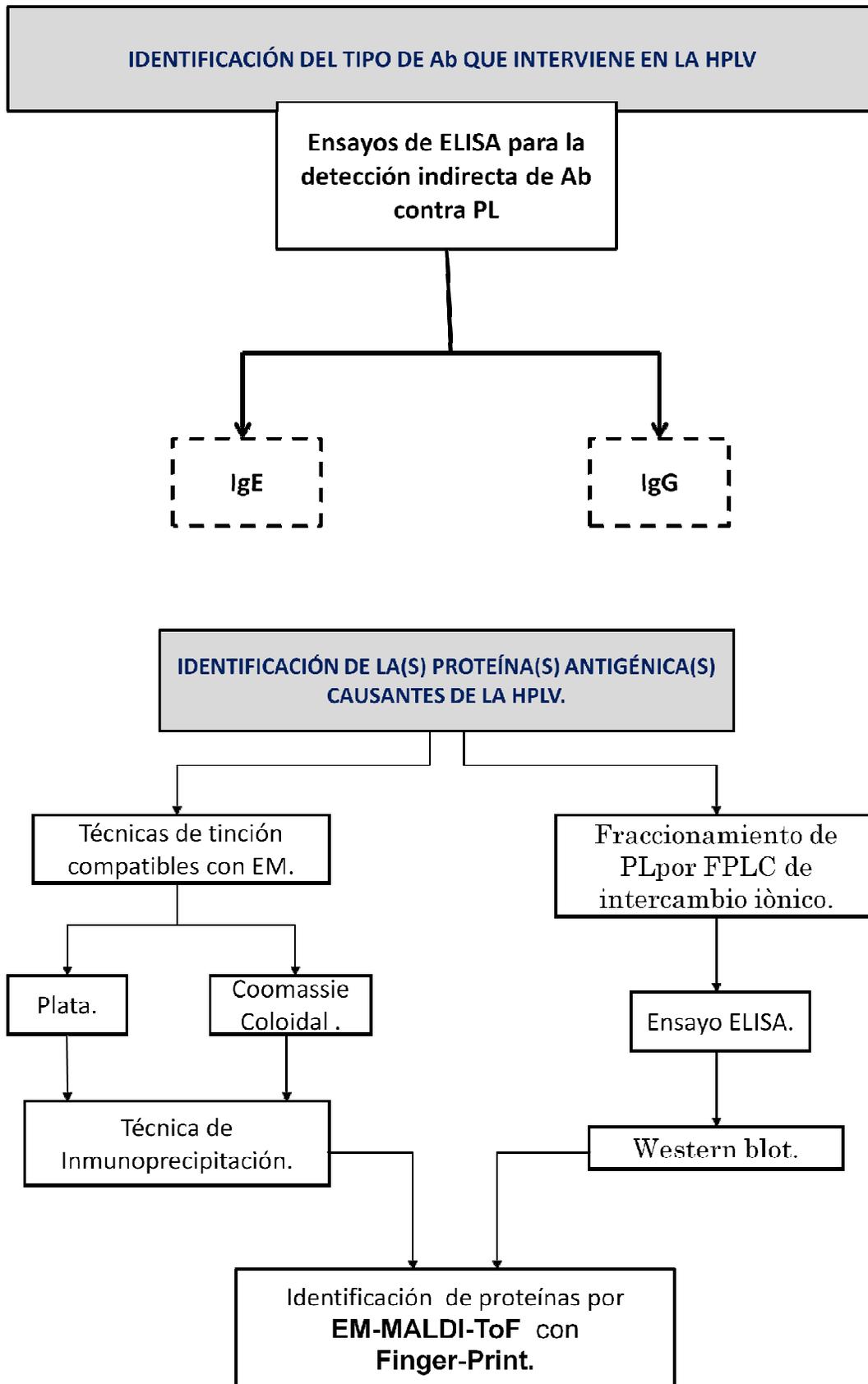
- ✓ Implementar y estandarizar nuevas metodologías para el apoyo al diagnóstico rápido y certero de HPLV en pacientes pediátricos utilizando técnicas bioquímicas, inmunológicas y proteómica.
- ✓ Desarrollar estrategias para la identificación de las proteínas alergénicas de la leche de vaca.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✓ Estandarizar las condiciones para llevar a cabo ensayos de ELISA para la detección de Ab contra PL.
- ✓ Determinar el tipo de inmunoglobulina que interviene en la respuesta inmune mediante técnicas de ELISA.
- ✓ Estandarizar metodologías que ayuden a aislar a las proteínas alergénicas basadas en cromatografía líquida.
- ✓ Estandarizar técnicas de proteómica que ayuden en la identificación de las proteínas basándose en electroforesis y Western blot.
- ✓ Identificar las proteínas alergénicas que despiertan la respuesta inmune utilizando técnicas de EM-MALDI-ToF.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.





A) OBTENCIÓN DE SUEROS.

i) EXTRACCIÓN DE SUERO VENOSO.

Se tomaron 5 mL de sangre venosa de dos infantes, el primero con 9 meses de edad el cual presenta trastornos gastrointestinales severos desde los 6 meses y con diagnóstico clínico de alergia alimentaria. El segundo, control pareado por edad sin sintomatología alérgica o gastrointestinal.

La sangre se almacenó en un tubo Vacutainer, se incubó 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 1,500 rpm/10 min a 25°C para separar las células del suero.

Se recuperó el suero con ayuda de una pipeta Pasteur y adicionalmente se volvió a centrifugar a 12,000 rpm/10 min a 4°C, para eliminar todo el resto celular. El suero se recuperó nuevamente para determinar la concentración de proteínas por el método colorimétrico del Ácido bicinónico (BCA), los sueros se fraccionaron en volúmenes de 100 μ L y se almacenaron a -70°C para su preservación por tiempo prolongado.

ii) OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE LECHE CON BAJO CONTENIDO DE CASEÍNAS^[29]

Se tomaron 50 mL de leche entera de vaca, para remover los lípidos, grasas y gran parte de las caseínas; la leche se colocó en agitación y se le agregó HCl concentrado. El pH se fue midiendo con ayuda de tiras hasta llegar a un pH aproximado de 5; se incubó a 4°C toda la noche para permitir la precipitación de las caseínas y posteriormente se centrifugó a 9,000rpm/20 min a 4 °C. Inmediatamente se extrajo el suero con una pipeta evitando tomar la fracción que contiene lípidos y grasas. Se repitió la centrifugación para remover lo mejor posible los lípidos y grasas y, a continuación se midió el pH para llevarlo a 4.6 con HCl y se incubó a 4°C toda la noche para precipitar las caseínas restantes. Posteriormente, la

muestra se centrifugó a 30,000 rpm/30 min a 10°C y el suero se recuperó y se le determinó la concentración de proteína por el método colorimétrico de BCA.

Se hicieron alícuotas de 500 µL y se almacenaron a -70 °C para su preservación.

a) REMOCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G (IgG) DEL SUERO DE LECHE.

- 1) Se tomaron 100 µL de proteína-G agarosa y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL
- 2) Las perlas de agarosa se lavaron 4 veces con 500 µL de buffer PBS. Las perlas se centrifugaron a 10,000 rpm/25°C y se retiró el sobrenadante en cada ocasión.
- 3) Posteriormente, se agregaron 700µL de suero de leche y la muestra se dejó incubar toda la noche a 4°C en agitación suave.
- 4) Después de la incubación, se centrifugó a 10,000rpm/5seg y el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo, en esta fracción se encuentra el suero de leche libre de IgG.
- 5) La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico del BCA.

B) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SUERO Y LECHE.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA).^[30]

Se prepararon 100 mL de las soluciones A y B, de la siguiente manera.

- ✓ Solución A (pH 11.3)

Reactivo	PM (grs/mol)	Para 100mL pesar: (grs)
Ácido bicinconínico	388.29	1.0
Bicarbonato de sodio (Na₂CO₃)	105.99	1.71
Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O)	282.23	0.181
Hidróxido de sodio (NaOH)	40.0	0.4
Carbonato de sodio (NaCO₃)	84.01	0.946

El pH se ajustó con NaOH 1N.

- ✓ Solución B (CuSO₄.5H₂O 160.2 mM)

Reactivo	P.M (g/mol)	Para 100mL pesar: (grs)
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O)	249.68	4.0

Se preparó la curva de calibración siguiendo la siguiente tabla.

Tubo No.	Muestra	Reactivo A+B* (µL)	BSA (mg/mL)	BSA (µL) (Stock: 1.37mg/mL)	H₂O (µL)
1	Blanco	950	0	0	50
2	A	950	4	2.917	47.083
3	B	950	8	5.84	44.16
4	C	950	16	11.68	38.32
5	D	950	24	17.52	32.48
6	E	950	32	23.36	26.64
7	F	950	40	29.2	20.8
8	G	950	50	36.49	13.51
9	H	950	60	43.79	6.21

*Se preparó una mezcla de reactivo A+B adicionando 24.5 mL de reactivo A y 0.5 mL de reactivo B, la cual se preparó en fresco.

El volumen final en cada tubo es de 1 mL.

Para las diferentes muestras se colocaron:

Reactivo A+B* (µL)	H₂O (µL)	Dilución de la muestra	µL de muestra
950	40/45	Sin dilución	10/5
950	40	Dil 1:10	10
950	45	Dil 1:10	5
950	40	Dil 1:20	10
950	45	Dil 1:20	5
950	40	Dil 1:100	10
950	45	Dil 1:100	5

El volumen final es de 1 mL .

Después de colocar lo indicado en cada tubo, las muestras se agitaron y se incubaron durante 30 min/37°C.

Después de transcurrido el tiempo, se leyeron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm.

Se calcularon las concentraciones de proteínas de las diferentes muestras, considerando la curva de calibración, las diluciones realizadas y los microlitros (μL) tomados de cada suero.

C) **DETECCIÓN POR MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) DE INMUNOGLOBULINAS "G" Y "E" ESPECÍFICAS CONTRA PROTEÍNAS DE LECHE** ^[31,32]

i) SOLUCIONES UTILIZADAS:

1. Amortiguador de carbonato 0.15M pH 9.6

- ✓ 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- ✓ 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Disolver las sales en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 9.6, aforar a 1 Litro y mantener a 4°C.

2. Solución salina de fosfatos (PBS) 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2

Medir 800mL de agua destilada

Agregar 100mL de *PB 10X y 8.75 grs de NaCl.

Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2

Aforar a 1000mL con agua destilada.

*PB 10X. 2.62 grs de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 11.5 grs de fosfato de sodio dibásicoanhídrido. Disolver en 200 mL de agua destilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1L con agua bidestilada.

3. Amortiguador de lavado (PBS-Tween 20, 0.05%)

A un litro de PBS pH 7.2, añadir 500 µL de Tween 20 y guardar a 4°C.

4. Solución de bloqueo (Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS-TWEEN 20)

Para 100 mL:

Pesar 1 gramo de albúmina sérica bovina y agregar 100 mL de agua destilada, disolver y guardar a -20°C.

5. Solución cromógeno/sustrato para peroxidasa.

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina o ½ tableta de OPD y añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M y adicionar 4 µL de H₂O₂ al 30 %.

ii) PROCEDIMIENTO:

✓ **SENSIBILIZACIÓN DE LOS POZOS DE POLIESTIRENO CON EL ANTÍGENO:** Para realizar los ensayos de ELISA primero se adhirieron a la placa las proteínas del suero de leche (antígenos), para lo cual se hicieron diluciones con amortiguador de carbonatos 0,15 M pH 9.6, las concentraciones utilizadas fueron: 2.5µg/mL, 1.25µg/mL, 0.625µg/mL y 0.312 µg/mL y se colocaron 100 µL/pozo de las diluciones hechas. La placa se incubó a 4°C toda la noche.

✓ **LAVADO DE LA PLACA:** Después de la incubación, la placa se lava para retirar las proteínas que no se adhirieron, se lavó 3 veces con 200 µL/pozo de un buffer de PBS-Tween 20 y finalmente se lavó una vez más con PBS (200 µL/pozo),

durante 5 min cada lavado. Se elimina el buffer y se seca el exceso sobre una gasa.

- ✓ **BLOQUEO DE LA PLACA:** Enseguida se agregó a la placa 200 μL /pozo de una solución de bloqueo (albúminasérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween 20). La placa se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente, se realizó el lavado de la placa.

- ✓ **REACCIÓN Ag-Ab:** Se añadió 100 μL /pozo de diluciones de suero de los individuos (paciente con sintomatología de HPLV e individuo con ausencia de ésta) en buffer de PBS-Tween 20; las diluciones utilizadas fueron 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, y 1:800, éstas se colocaron en pozos con diferentes concentraciones de antígeno. Se incubó por 2 hrs. a 37°C . Se realizó el lavado nuevamente.

- ✓ **ADICIÓN DEL CONJUGADO:** Se colocaron 100 μL /pozo del conjugado anti-IgG humana–peroxidasa a una dilución 1:5000 en PBS-Tween 20. Se incubó por 2 hrs. a 37°C . y posteriormente se realiza el lavado.

- ✓ **REVELADO:** se añadieron 100 μL /pozo de la solución cromógeno/sustrato para peroxidasa, se deja incubar a 25°C . hasta que los controles negativos empiecen a hacer fondo, la reacción enzimática se detiene con 100 μL /pozo de ácido sulfúrico 2N.

Se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

D) TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE IgG`s CON PROTEÍNA-G ACOPLADA A PERLAS DE AGAROSA. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO Ag-Ab.

1. Separar el suero de la sangre venosa. Cuantificar la concentración de proteína

2. Formar el complejo Ag-Ab

- a) Diluir el suero a una concentración de 1mg/mL en buffer PBS.
- b) Colocar 500µg de proteína de suero en un microtubo de 1.5 mL.
- c) Añadir cantidades crecientes de proteína de leche para formar el complejo Ag-Ab.

TUBO	µg de proteína del suero de paciente y sujeto control	µg de proteína de leche
1	500	160
2	500	320
3	500	480
4	500	972
5	500	1900
6	500	3900

- d) Incubar toda la noche a 4°C en agitación suave.

3. Inmunoprecipitación de IgG.

- a) Tomar 60 μ L de proteína-G agarosa y colocarlos en un microtubo de 1.5 mL.
- b) Añadir 500 μ L de buffer PBS y agitar suavemente con la pipeta, para lavar las perlas de agarosa.
- c) Centrifugar a 10,000rpm/5 seg y retirar el sobrenadante.
- d) Repetir el lavado por lo menos 3 veces más.
- e) Añadir al tubo con la proteína-G agarosa el contenido del tubo donde se formó el complejo Ag-Ab
- f) Incubar toda la noche a 4°C en agitación suave.
- g) Colectar la proteína G-agarosa, centrifugando a 10,000rpm/5 seg y retirar el sobrenadante.
- h) Lavar con 500 μ L de buffer PBS y agitar suavemente con la pipeta, centrifugar a 10,000rpm/5 seg y retirar el sobrenadante.
- i) Repetir el lavado por lo menos 3 veces más.
- j) Resuspender la proteína-G en 60 μ L de buffer de carga Laemmli.
- k) Para recuperar las muestras hervirlas 5 min.
- l) Correr las muestras en un gel SDS-PAGE al 12%.
- m) Teñir el gel y comparar para identificar las proteínas de interés y tratarlas para la identificación por *Fingerprint*.

E) GELES DE ACRILAMIDA SDS-PAGE.^[33,34]

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Preparación de los geles:

- a. Lavar las placas de vidrio con agua y etanol.
- b. Colocar el juego de placas de vidrio y separadores en la base para preparar el gel.
- c. De acuerdo a la cantidad de geles y el volumen de los mismos preparar las cantidades descritas en las tablas I y II para el gel separador al 12% y el gel concentrador al 4% respectivamente.

Tabla 1. Mezcla de soluciones para preparar el gel separador al 12% y el gel concentrador al 4%.

Soluciones	12% (Gel separador)	4% (Gel concentrador)
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	1.995mL	0.33 mL
Buffer Tris pH 8.8 y pH 6.8	1.3 mL (pH 8.8)	0.5 mL (pH 6.8)
Agua destilada	1.7 mL	1.1 mL
*PSA 10% (Persulfato de Amonio)	50 µL	20 µL
*TEMED	2 µL	2 µL

*Estos reactivos se agregan hasta el final.

- d. Una vez preparada la mezcla para el gel separador, se vierte la mezcla entre las dos placas de vidrio dejando un marco de 1.5 mm del borde superior y se deja polimerizar.
- e. Se coloca el peine apropiado, de acuerdo al número de muestras; se prepara la mezcla de soluciones para gel

concentrador, se agrega la mezcla sobre el gel separador tratando de no formar burbujas y se deja polimerizar.

- f. Cuando la polimerización del gel concentrador haya terminado, se retira el peine con cuidado y se lavan los carriles con agua destilada.
- g. Las placas se colocan en la cámara de electroforesis, y se llena la cámara con amortiguador de electroforesis.
- h. Preparación de muestras.
- i. Preparar las muestras mezclándolas con buffer de corrida y añadir DTT a una concentración 25 mM.
- j. Hervir las muestras 1min a baño María.
- k. Colocar las muestras en el carril correspondiente, incluyendo en cada gel un carril con estándares de pesos moleculares.
- l. Agregar el amortiguador de electroforesis que haga falta para que la cámara tenga el volumen adecuado.
- m. Colocar los electrodos y conectar la cámara a la fuente de poder y ajustar la corriente a 120 volts constantes.
- n. Mantener la electroforesis hasta que el frente este a medio centímetro del final de la placa.
- o. Al terminar la electroforesis sacar el gel.
- p. Se procede a realizar la transferencia a la membrana para realizar el Western-blot o a teñirlo para observar las proteínas; el gel se tiñe con Coomassie Coloidal o con plata modificada o con alguna otra técnica de tinción compatible con espectrometría de masas.

F) ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D). [35,36]

i) ISOELECTROENFOQUE (IEF).

Las muestras para el IEF se preparan de la siguiente manera:

Para un volumen final de 125 μ L:

- ✓ Muestra: 50-150 μ g de proteína. Para las proteínas de leche se colocaron 15 μ L (80 μ g aprox.).
- ✓ Anfólitos (*Bio-Rad*): 1% (1.25 μ L)
- ✓ DTT 4M: 1.2% (1.5 μ L)
- ✓ Buffer de IEF (*Bio-Rad*): c.b.p. 125 μ L (107.25 μ L).

Tomar los 125 μ L de muestra y colocarlos a lo largo del pozo de la cámara de IEF.

Sacar la tira de IEF de pH 3-10, y quitar el empaque; colocar la tira encima del pozo con la muestra y posteriormente cubrir con 1 mL de aceite mineral.

Colocar la tapa de la cámara de IEF y cerrarla. Correr el equipo a las siguientes condiciones:

Paso (Rehidratación)	12hrs	20°C (PASIVA)	
Paso 1	250 v	20min	LINEAL 
Paso 2	4000v	2hrs	LINEAL 
Paso 3	4000v	10000/hr	RÁPIDA 
Mantenimiento (opcional)	500v	8hrs	RÁPIDA 

Al terminar de correr el IEF, detener el equipo y sacar la tira. Escurrir el exceso de aceite mineral.

Colocar en los pozos de lavado 800 μ L de Buffer I (*Bio-Rad*) con 5 μ L de DTT 4M (Concentración final 25mM).

Posteriormente colocar la tira en el pozo con la mezcla del buffer y dejar en agitación por 10 min.

Sacar la tira y quitar el exceso de Buffer I.

Preparar el buffer II con iodoacetamida a una concentración final de 100mM. Colocarlo en un pozo de la placa de lavado y colocar la tira. Agitar 10 min en oscuridad.

Sacar la tira y quitar el exceso de Buffer II.

ii) SEGUNDA DIMENSIÓN.

Prepara un gel al 12% (separador), dejando un espacio de 1.5cm del borde superior de las placas, y sin preparar el gel concentrador. Dejar polimerizar.

Preparar una tira de papel filtro con el marcador de peso molecular (MPM), (0.8µL de MPM+ 3µL de Buffer de carga).

Calentar la agarosa del Kit Bio-Rad y colocar 400µL de este sobre el gel al 12%.

Colocar la tira del IEF al fondo del gel y posteriormente colocar la tira con el MPM en el extremo izquierdo del gel.

Montar la cámara y correr a 120 volts hasta que el frente del gel esté a 0.5 cm del borde de los vidrios.

Apagar el equipo y desmontar la cámara para sacar el gel, teñirlo con Coomassie Coloidal.

G) TÉCNICA DE TINCIÓN DE COOMASSIE COLOIDAL PARA GELES DE SDS.^[36,37]

1. Lavar el gel de una o dos dimensiones en agua Milli-Q durante 2 minutos; repetir el proceso tres veces. Se debe remover bien el exceso de SDS o la sensibilidad de la tinción disminuye significativamente.
2. Agitar previamente la solución para teñir antes de usarse.
3. Incubar los geles con la solución para teñir durante 2-12 horas en agitación. La tinción genera un fondo marginal. Nota: después de 10 min se pueden ver las primeras proteínas

teñidas, después de 2 horas se alcanza a ver el 80% del total de proteínas.

4. Después de la incubación remover la solución para teñir y lavar el gel dos veces con agua Milli-Q. Nota: Se puede reusar la solución para teñir hasta que las partículas permanezcan, después, eliminarla.
5. Remover las partículas y el colorante pegado al recipiente con gasa e incubar el gel con solución para desteñir de 10-60min.
6. Finalmente, lavar el gel con agua Milli-Q, dejándolo en agitación toda la noche.

Preparación de las soluciones:

SOLUCION PARA TEÑIR		
REACTIVO	CANTIDAD PARA 100mL	CANTIDAD PARA 1 L
Sulfato de aluminio y Potasio	5 grs	50 grs
Etanol absoluto	10 mL	100 mL
Commassie Brilliant Blue G-250 (90%)	22.2 mg	222 mg
Ac. Fosfórico	5.5 mL	55 mL
Agua Milli-Q	cbp 100mL	cbp 1L

No filtrar la solución, guardar en botella oscura.

SOLUCION PARA DESTENIR		
REACTIVO	CANTIDAD PARA 100mL	CANTIDAD PARA 1 L
Etanol absoluto	10 mL	14 mL
Ac. Fosfórico	1.4 mL	55 mL
Agua Milli-Q	cbp 100mL	cbp 1L

H) TÉCNICA DE TINCIÓN DE PLATA PARA GELES DE SDS-PAGE. [38,39]

- ✓ **FIJACIÓN.** Dejar incubando el gel toda la noche 4 veces por 30 min en una solución de Etanol 30%/Ac. Acético 10%.
- ✓ **SENSIBILIZACIÓN.** Embeber los geles durante 45 min. En una solución: 3g/L de tetratiónato de potasio/0.5M de acetato de potasio/etanol 30%.
- ✓ **LAVADO.** Lavar 6 veces por 10 min con agua destilada.
- ✓ **IMPREGNACIÓN.** Incubar con una solución 2grs/L de nitrato de plata, durante 1 a 2 horas (Hacerlo en oscuridad).
- ✓ **LAVADO.** Lavar los geles durante 5-15 seg en agua (Hacerlo en oscuridad).
- ✓ **REVELADO.** Incubar los geles con una solución de carbonato de potasio(30grs/L)/300 µL de formaldehído (37-40%), 125 µL de tiosulfato de sodio pentahidratado al 10 %/ L. (Hacerlo en oscuridad).
- ✓ **STOP.** Incubar por 30 min en una solución 40grs/L de Tris y 20 mL de ácido acético/L.

I) CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO PARA FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LECHE.

Para fraccionar las proteínas de leche por cromatografía de intercambio aniónico se utilizó:

- ✓ Columna Mono-Q de 8 mL
- ✓ Buffer A (Bicarbonato de amonio 50mM pH 9.0)
- ✓ Buffer B (Bicarbonato de amonio 50mM pH 9.0, NaCl 2M)

Se equilibró la columna con 10 volúmenes de Buffer A, y se inyectaron 45 mg de proteína total (5mL), después se aplicó un gradiente de NaCl para desprender las proteínas que se unieron a la columna Mono-Q desde 0% hasta 25% y posteriormente hasta 100% de NaCl. Se realizaron 4 corridas con las mismas condiciones y se colectaron todas las fracciones.

Después de coleccionar todas las fracciones, se concentraron con Speed-Vac, hasta un volumen final de 1mL, las fracciones fueron dializadas con PBS y se cuantificó la concentración de proteína por el método colorimétrico del BCA.

J) WESTERN BLOT.^[31,40]

Se preparó un gel SDS-PAGE al 12 % con diferentes fracciones de proteínas de leche, además se colocó un carril con marcador de peso molecular y un carril con proteínas totales de leche. El gel se corrió a 120 volts.

En tanto, en un recipiente se colocaron papeles filtro de diferentes grosores, los cuales se embebieron en amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3 y MeOH 20% v/v) por 30 min. Una membrana de PVDF se cortó del tamaño del gel y se embebió en el mismo amortiguador.

Al terminar de correr el gel, se embebió en amortiguador de transferencia. Se prepara la cámara de transferencia acomodando los papeles filtro, sobre de estos se colocó el gel y encima la membrana de PVDF. Se cubrió con los papeles filtro, ahora empezando con los papeles filtro delgados y terminando con el más grueso. Al colocar los papeles, el gel y la membrana, se cuidó que no quedaran burbujas de aire ya que podrían interferir en la transferencia; además, se aseguró que el sistema estuviera lo suficientemente húmedo para que no se secase durante la transferencia.

Al terminar de colocar el sistema la cámara se cerró y se transfirió a 150 mA por 2 hrs.

Después de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar que las proteínas se transfirieron del gel a la membrana. La membrana se lavó varias veces con agua destilada hasta desteñirla por completo. La membrana se guardó a 4°C entre dos papeles filtro humedecidos con PBS-Tween 20.

Al día siguiente la membrana se bloqueó con una solución de albumina sérica bovina al 3%, se incubó a 37°C/2hrs. Después de la incubación se lavó 3 veces por 5 min con PBS-Tween 20.

Se preparó una solución de suero del paciente con sintomatología, con dilución 1:50, ésta se agregó a la membrana y se incubó a 37°C/2hrs. Después de la incubación se lavó 3 veces/5 min con PBS-Tween 20.

Se preparó el anti-IgG peroxidasa a una dilución 1:2,000 y se incubó a 37°C/2hrs, posteriormente se lavó 3 veces/ 5min con PBS-Tween 20.

El revelado de la membrana se llevó a cabo por Quimioluminiscencia, se preparó 1 mL del reactivo (luminol +agua oxigenada).

La membrana se incubó por 30 seg y se tomaron 5 imágenes cada 5 seg.

K) IDENTIFICACIÓN POR FINGERPRINT DE DISTINTAS PROTEÍNAS A TRAVÉS DE DIGESTIÓN IN-GEL CON TRIPSINA-TPCK. ^[41,42,43]

1. Correr un gel de una o dos dimensiones, teñirlo con alguna técnica compatible con espectrometría de masas y determinar las proteínas de interés que deben ser identificadas.

2. PRIMER DÍA: Corte, decoloración y deshidratación de las bandas.

- a) Las bandas se cortan con bisturí, aprox. 2 a 3 mm². Se utilizaron bisturís nuevos para los cortes y eliminar lo más posible la acrilamida.
- b) Las bandas se colocan en microtubos de 0.5 mL previamente lavados con ACN/TFA 0.1%.
- c) Las bandas se destiñeron incubándolas dos veces durante 45 min/37°C en una solución conteniendo 100 mM de NH₄HCO₃/50 % ACN. Utilizar esta solución en fresco.
Para 10 mL de buffer: 79 mg NH₄HCO₃+5mLACN+5mLH₂O.
- d) Los fragmentos de geles se deshidrataron incubándolos dos veces durante 10 min a temperatura ambiente con 100 µL de ACN. Los fragmentos se reducen significativamente, se opacan y se ponen blancos. Remover el ACN.
- e) Los fragmentos se secan en Speed-Vac durante 10 a 15 min a temperatura ambiente para remover el ACN.
- f) Los fragmentos se guardaron a -70°C.

3. SEGUNDO DÍA: Reducción, bloqueo y digestión de las proteínas In-gel con Tripsina-TPCK.

REDUCCIÓN Y BLOQUEO.

L) Para reducir a las proteínas, los fragmentos de gel se incubaron 30 min a temperatura ambiente con 30 μL de DTT 10 mM (fresco).

Para 100 μL : 15.4 mg/100 μL H_2O = 1M. Luego, 1 μL DTT(1M)+99 μL H_2O = 10 mM.

M) El DTT es removido de los fragmentos lavando las muestras tres veces con agua milli-Q y desechar el agua.

N) Las proteínas se bloquearon incubando durante 20 min a temperatura ambiente y oscuridad con 50 μL de Iodoacetamida 100 mM (fresco). La reacción se detuvo añadiendo 50 μL de DTT 100 mM, incubar 15 min.

Para 200 μL de iodoacetamida: 3.7 mg Iodoacetamida + 200 μL H_2O = 100 mM.

O) Remover el líquido y lavar tres veces con agua milli-Q y luego secar.

P) El gel se deshidrató durante 5 min dos veces con ACN al 100 %. Secar el gel en Speed-Vac durante 10 a 15 min a temperatura ambiente.

PROTEÓLISIS EN GEL CON TRIPSINA-TPCK.

La tripsina es una endoproteinasa miembro de la familia de las serina proteasas con alta especificidad por los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los aminoácidos arginina (Arg) y lisina (Lys).

a) Se preparó una solución de Tripsina a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuelta en amortiguador de digestión (40mM de NH_4HCO_3 /10 % ACN):

- b) Los geles se incubaron durante 1 hr a 25°C con 20 µL de Tripsina (40 µg/mL) en amortiguador de digestión. Si durante este tiempo el gel no se hidrata completamente, adicionar otros 10 a 20 µL de Tripsina e incubar 1 hr a 25°C.
- c) Se añadió suficiente amortiguador de digestión para cubrir los geles; los tubos se sellaron y se incubaron toda la noche a 37°C y en agitación.
- d) La proteólisis se detiene añadiendo 7 µL de TFA 10 %. Guardar a 4°C.

4. TERCER DÍA: Extracción de los péptidos.

- a) Las muestras se incubaron 10 min en agitación con 150 µL de agua milli-Q. El agua se removió y almacenó en un microtubo nuevo y lavado.
- b) Los péptidos se extrajeron con dos incubaciones de 1 hr/25°C en 50 µL de una solución de 50 % ACN/5 % TFA.
- c) Los péptidos se concentraron a 10 µL en Speed Vac a temperatura ambiente. No permitir que la muestra se seque.
- d) Se tomaron 4 µL de los extractos y se purificaron, concentraron y lavaron con puntas Zip-Tip. El resto del extracto se guardó a -70°C.

5. Lavado de las muestras con puntas ZIP-TIP.

- i) Preparar Zip-Tip lavando la punta con 10 µL de ACN 100 %, después lavar 5 veces la punta con 10 µL de TFA 0.1 %.
- ii) Tomar 4 µL de cada muestra y diluirlos con 4 µL de TFA 0.1 %.
- iii) Pasar las muestras completamente en los Zip-Tip inyectándolas 7 veces. Eliminar el líquido.
- iv) Lavar las puntas 5 veces con TFA 0.1 % para remover los contaminantes.
- v) Eluir las muestras con 5 µL de ACN/TFA 0.1%. Repetir este proceso para otra muestra.

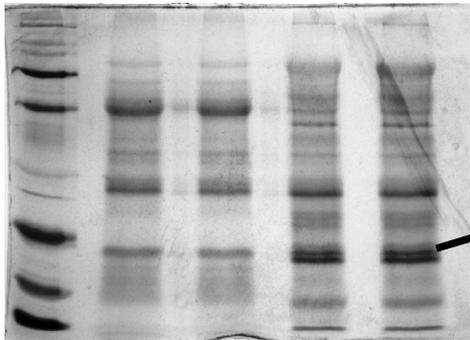
- vi) Mezclar 1.5 μL de los péptidos con 1.5 μL de CHCA (estándar 9), o bien, 1.5 μL de péptidos y 3 μL de CHCA.
- vii) Aplicar a la placa 2 μL de la mezcla.

6. Sintonización del MALDI con GFP (1570.6 g/mol):

- Diluir 5 μL de GFP (estándar 3) en 5 μL de TFA 0.1%
- Mezclar 3 μL de la dilución con 3 μL de CHCA
- Aplicar 1 μL de la mezcla en la placa del MALDI.

PRIMER DÍA: Corte, decoloración y deshidratación de las bandas.

Gel SDS-PAGE 12%



Corte

Desteñir:

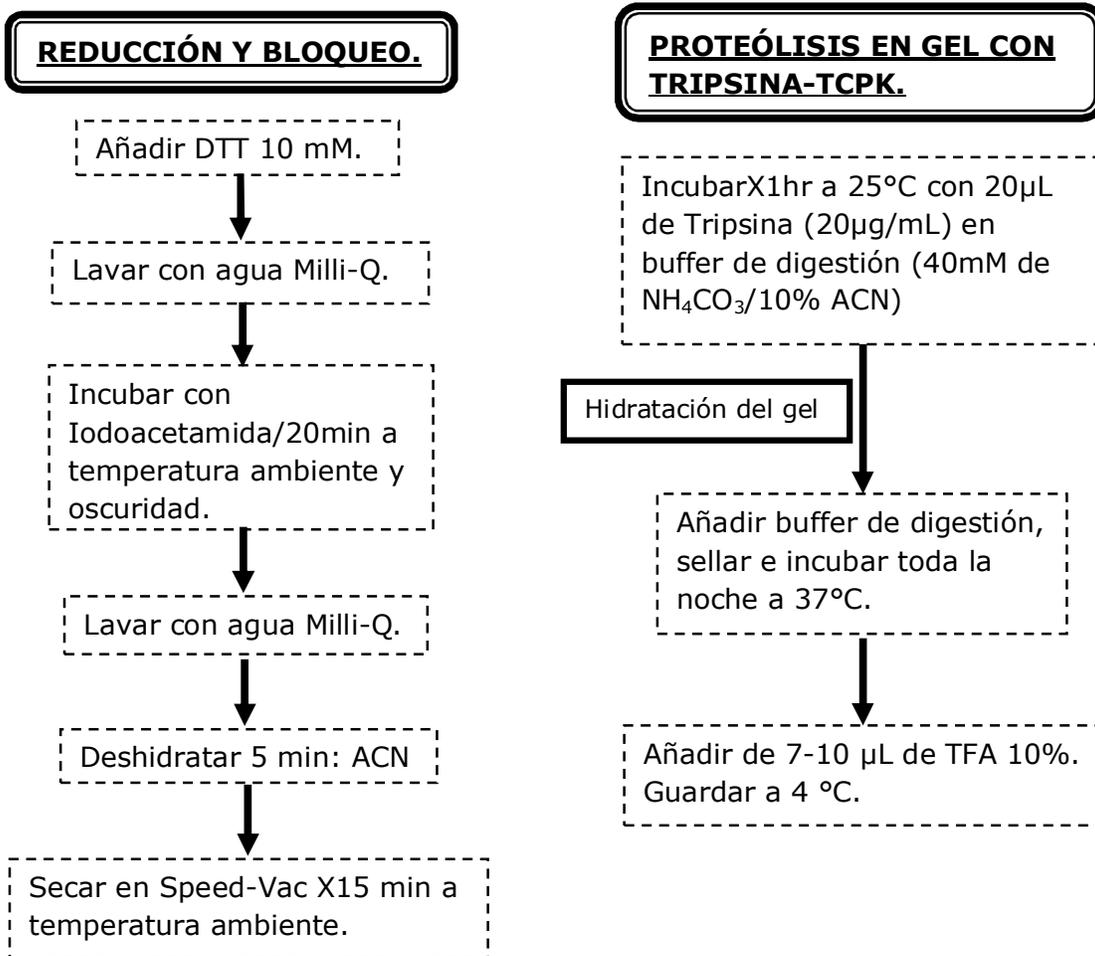
100 mM de NH_4HCO_3 /50% ACN

Deshidratar:

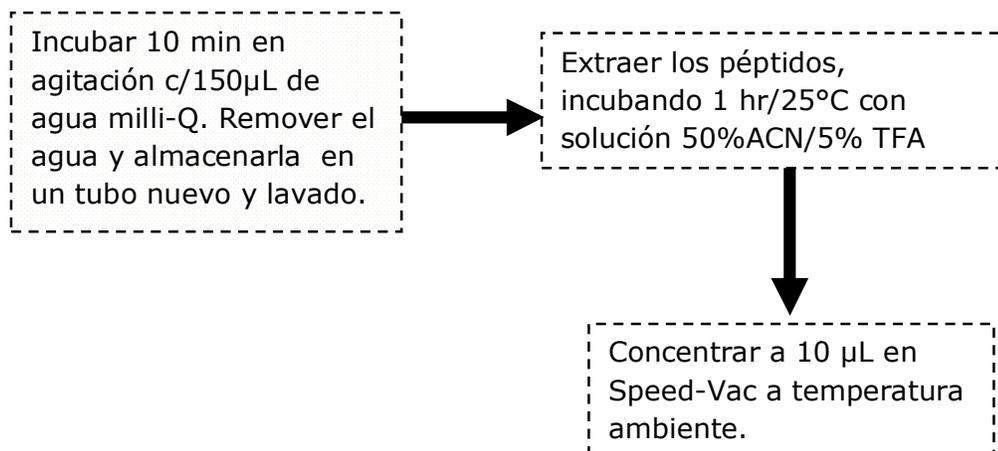
10 min con ACN

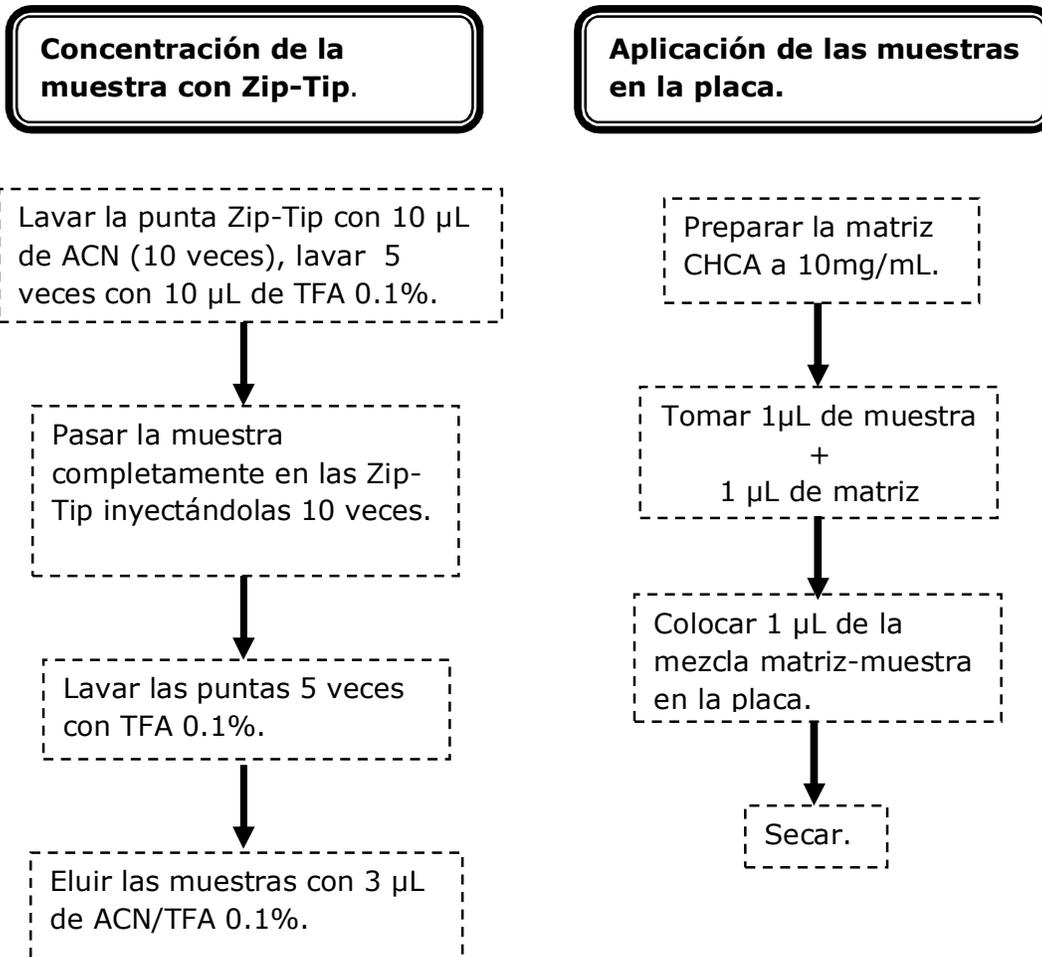
Secar en Speed-Vac X 15min a temperatura ambiente. Guardar a -70°C .

SEGUNDO DIA: Reducción, bloqueo y digestión de las proteínas In-Gel con Tripsina-TCPK.



TERCER DIA: Extracción de los péptidos.



**Sintonización del MALDI con GFP(1570.6 g/mol):**

- 1) Diluir 5 μL de GFP (estándar 3) en 5 μL de TFA 0.1%.
- 2) Mezclar 3 μL de la dilución con 3 μL de CHCA.
- 3) Aplicar 1 μL de la mezcla en la placa del MALDI.

VI. DATOS CLÍNICOS: PACIENTE Y CONTROL.

i. RESUMEN CLÍNICO DEL PACIENTE.

Paciente de 6 meses de edad, que vemos por alergia intestinal. Nació de 41 semanas por cesárea con peso de 3000g, tuvo ictericia fisiológica y ameritó fototerapia. Tomaba leche materna y fórmula NAN I. A los 20 días inició con diarrea crónica intermitente, se hospitalizó por deshidratación y se diagnosticó acidosis tubular renal, la cual se ha manejado por nefrología controlada con bicarbonato. Ingresó a gastroenterología por diarrea y desnutrición. Se practicó colonoscopia encontrando colitis nodular y biopsia con infiltrado eosinófilo. Se manejó con varias fórmulas que no toleró hasta que se manejó con NEOCATE fórmula elemental. El paciente continuó con vómito; la panendoscopia se encontró normal, con biopsias de esófago y estómago sin alteraciones y duodenitis crónica moderada.

a) EXPLORACIÓN FÍSICA.

De edad aparente igual a la cronológica con datos de dermatitis atópica, cardiorespiración sin compromiso, abdomen levemente distendido sin visceromegalias, resto sin alteraciones.

b) DIAGNÓSTICO

Alergia alimentaria.

ii. CONTROL

Control pareado por edad sin sintomatología alérgica o gastrointestinal.

VII. RESULTADOS.

1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO DE SANGRE VENOSA Y DE LECHE.

Se obtuvieron los sueros del paciente con diagnóstico clínico de alergia gastrointestinal y del infante que se utiliza como control; las proteínas de leche se obtuvieron conforme a las técnicas descritas anteriormente.

De las muestras de sangre venosa, se obtuvieron fracciones de suero de color amarillo traslucido. De la leche entera de vaca se obtuvo el suero de color amarillo traslucido con las siguientes características: libre de grasas y lípidos, libre de IgG y con un contenido bajo de caseínas. Para conocer la concentración de proteínas de cada suero, se realizó la técnica colorimétrica del ácido bicinconínico(BCA).

Con la técnica de BCA se midieron las absorbancias de la curva de albúmina sérica bovina (BSA) y de cada suero. Utilizando la curva de calibración se calculó la concentración de proteína en los sueros (Gráfico 1).

Para los cálculos se tomaron en cuenta los microlitros (μL) de las muestras y las diluciones realizadas (Tabla 3).

Curva de calibración:

BSA [mg/mL]	ABSORBANCIA A 562nm
4.0	0.1015
8.0	0.2070
16.0	0.3885
24.0	0.5370
32.0	0.6932
40.0	0.8553
50.0	1.0508
60.0	1.2894

Tabla 3. Absorbancia de las diferentes concentraciones de BSA a 562 nm.

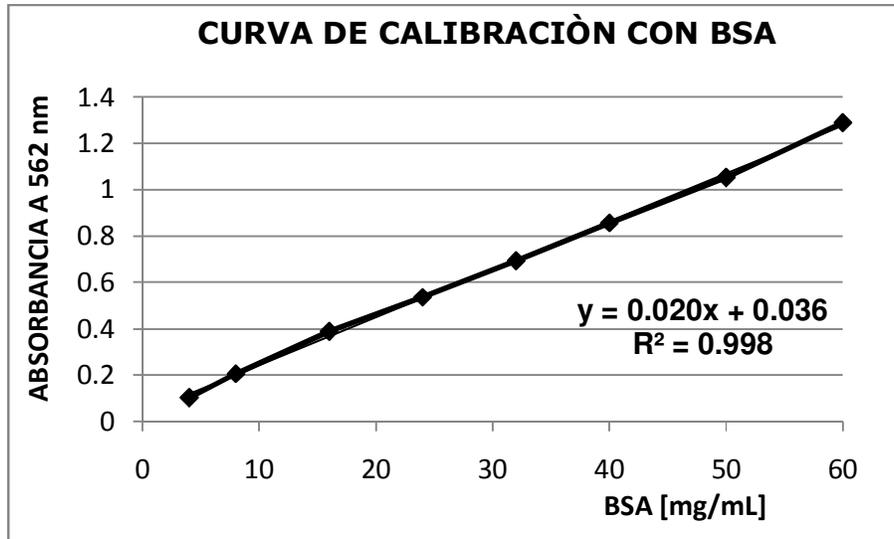


Figura 6. Curva de calibración de BSA.

Las concentraciones obtenidas para cada suero se muestran en la tabla 4.

MUESTRA	ABSORBANCIA A 562 nm	CONC. [mg/mL]	CONC. PROMEDIO [mg/mL]
Suero del individuo sano Dil 1:10 (10µL)	0.9562	44.65	43.71
Suero del individuo sano Dil 1:100 (10 µL)	0.1246	42.77	
Suero del paciente Dil 1:10 (10 µL)	0.7951	36.83	36.375
Suero del paciente Dil 1:100 (10 µL)	0.1105	35.92	
Suero de leche (sin dilución) (5 µL)	0.5852	5.33	5.31
Suero de leche (sin dilución) (10 µL)	1.1263	5.29	

Tabla 4. Concentraciones de los sueros (paciente, sujeto control y proteínas de leche). Las concentraciones se calcularon con base a las absorbancias de cada muestra y a la curva de calibración de BSA.

2. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS PARA IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.

Los estudios se realizaron utilizando el suero de leche de vaca con los posibles antígenos (Ag) y con dos sueros; el primero, el suero del paciente con hipersensibilidad a la leche (PHps) y el otro suero del sujeto sano (Control).

Los ensayos inmunoenzimáticos para la identificación de anticuerpos (Ab) en el suero del paciente se realizaron aplicando el método indirecto. Así, el conjugado enzima-Ab (HPR-Ab) reacciona con un primer Ab (IgG`s o IgE`s presentes en suero del paciente), el cual ya reaccionó con el antígeno (Ag) adsorbido a la fase sólida (proteínas de leche). En los ensayos se agregó el sustrato peróxido de hidrogeno con orto-fenilendiamina y se midió la absorbancia del color desarrollado en cada pozo a 490 nm, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción Ag-Ab (Figura 9).

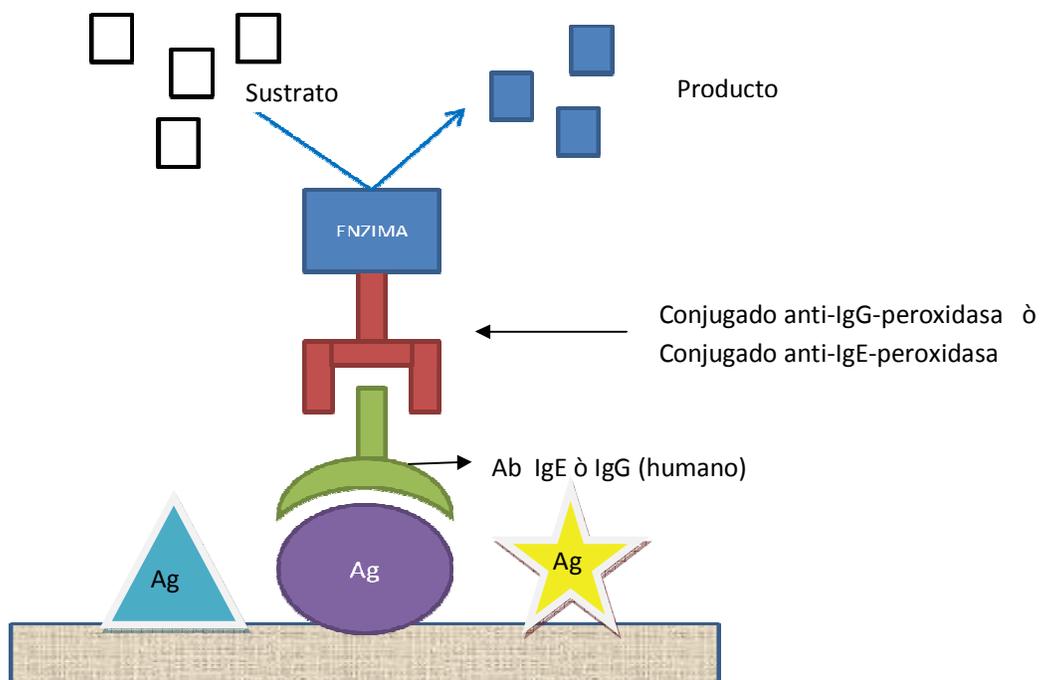


Figura 7. Diseño del ensayo de ELISA para detectar indirectamente inmunoglobulinas G y E.

Las ELISAS se realizaron con las siguientes condiciones:

i. **ELISAS PARA IgG** (identificación indirecta).

Condiciones:

Antígeno (Ag):

- Proteínas de suero de leche [2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.3125 µg/mL]

Dilución de sueros:

- Paciente (PHps): 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800.
- Sujeto sano (control): 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800.

Dilución del conjugado anti-IgG-peroxidasa: 1:5000

ii. **ELISAS PARA IgE**(Identificación indirecta).

Condiciones:

Antígeno (Ag):

- Proteínas de suero de leche [2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.3125 µg/mL]

Dilución de sueros:

- Paciente (PHps): 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800.
- Sujeto sano (control): 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800.

Dilución del conjugado anti-IgE-peroxidasa: 1:1000

Las lecturas de las placas de todos los ensayos se realizaron a 490 nm.

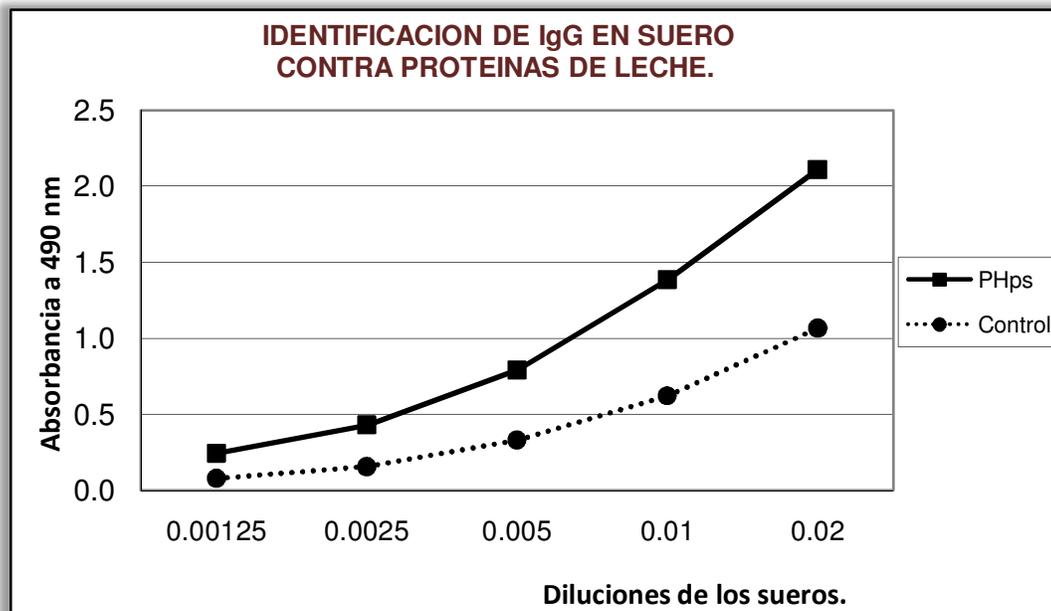
NOTAS:

- *En todos los ensayos se colocaron blancos, controles negativos y controles positivos.*
- *Los resultados que se muestran en las gráficas presentan los blancos restados de las absorbancias obtenidas de las diferentes condiciones.*

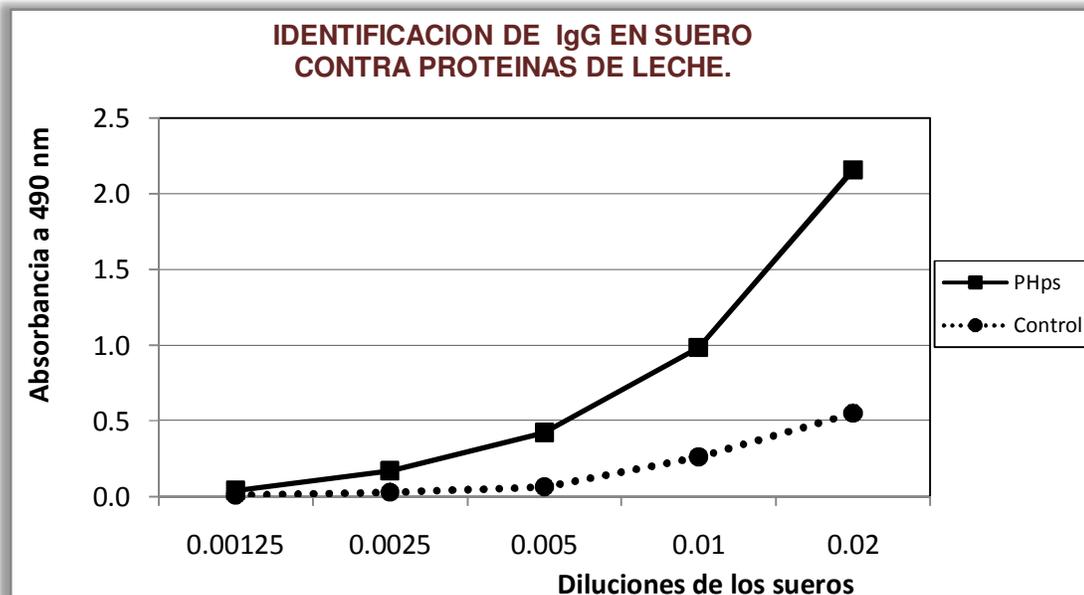
Bajo estas condiciones realizamos dos ensayos de ELISA para la identificación de inmunoglobulina G. En el primero utilizamos el suero

de los sujetos (paciente y control) sin ajustar la concentración de proteína para realizar las diluciones (Gráfica 1), en el segundo ensayo se colocaron en los pozos las mismas concentraciones de proteína del suero control y del paciente (Gráfica 2). Igualmente, los ensayos para la identificación de inmunoglobulina E se realizaron con diluciones de los sueros ajustados a la misma concentración (Gráfica 3).

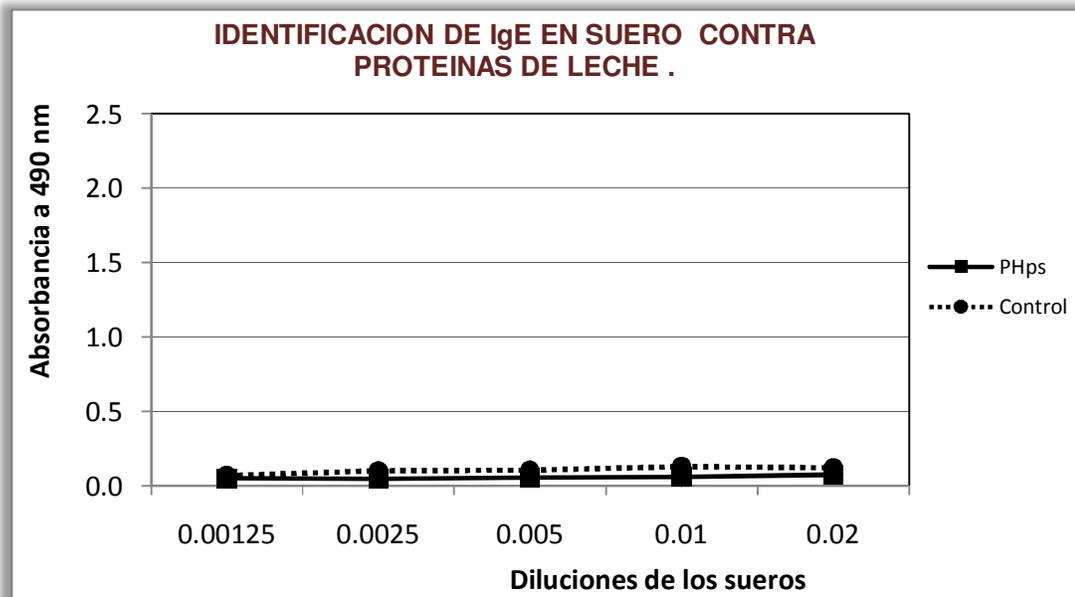
Las absorbancias se graficaron para cada concentración de proteínas de leche vs el inverso de las dilución de sueros. Las gráficas que se presentan son las obtenidas con 2.5 µg/mL de proteínas de leche; en los ensayos utilizando otras concentraciones se observó la misma tendencia.



Gráfica 1. ELISA para identificación de IgG. Absorbancias a 490 nm obtenidas con las diferentes diluciones de los sueros tanto del sujeto sano (Control) como del paciente con posible hipersensibilidad (PHps) a las proteínas de la leche. La concentración de proteínas de leche fue de 2.5 µg/mL. Las diluciones hechas se hicieron tomando directamente del stock de cada suero, las concentraciones de los sueros no fueron ajustados.



Grafica 2. ELISA para identificación de IgG`s. Absorbancias a 490 nm obtenidas con las diferentes diluciones de los sueros tanto del sujeto sano (Control) como del paciente con posible hipersensibilidad (PHps) a las proteínas de la leche, la concentración de proteínas de leche fue de 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Las concentraciones de los sueros fueron ajustadas para manejar la misma cantidad de proteína.



Grafica 3. ELISA para identificación de IgE`s. Absorbancias obtenidas en el ensayo de ELISA con los sueros del paciente (PHps) y el sujeto sano (Control).

3. TÉCNICAS DE TINCIÓN COMPATIBLES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Para poder llevar a cabo los estudios de espectrometría de masas de las proteínas identificadas en los experimentos de inmunoprecipitación, se evaluaron técnicas de tinción que nos permitieran visualizar proteínas que se encontraran en concentraciones de decenas de nanogramos, con el fin de poder observar la mayor cantidad de proteínas y que además sea compatible con espectrometría de masas.

Se evaluaron dos técnicas que se han utilizado para espectrometría de masas; la tinción con plata modificada y la tinción con Commassie Coloidal. Para evaluar ambas técnicas se corrieron dos geles de un extracto total de hígado. Uno se tiñó con plata y el otro con Commassie Coloidal, ambos geles fueron fotodocumentados y analizados con el programa PD-Quest, obteniendo las imágenes de la Figura 8.

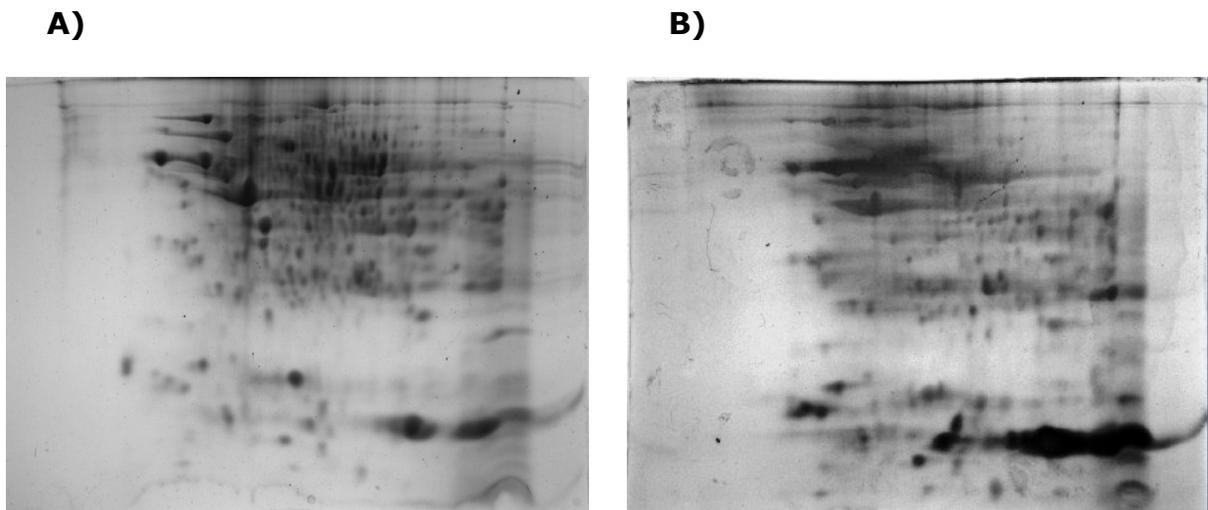


Figura 8. Geles teñidos con distintas técnicas compatibles con espectrometría de masas. A) Gel teñido con Commassie coloidal, B) Gel teñido con plata modificada. El análisis densitométrico se realizó con el programa PDQuest; cada mancha o spot se asumió que corresponde a una proteína. Para el caso del panel (A) se obtuvieron 307 spots, mientras que para el panel (B) se obtuvieron 189.

La técnica elegida fue la tinción con Commasie coloidal, con la cual se obtiene muy bajo fondo y mayor resolución logrando observar una gran cantidad de proteínas de la muestra.

4. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para tratar de identificar la o las proteínas que contienen las regiones antigénicas desencadenando la reacción exacerbada de la repuesta inmune, aplicamos la técnica de inmunoprecipitación utilizando proteína-G acoplada a agarosa. Esta técnica permite recuperar las IgG del suero del paciente que previamente se han puesto en contacto con los antígenos (proteínas de leche).

En esta fase se utilizaron tanto las proteínas de la leche como los sueros de los dos sujetos; el suero del paciente (PHps) y suero del sujeto sano (Control), ambos sueros se ajustaron a una concentración de 1mg/mL.

Se incubaron una serie de relaciones entre el suero de los sujetos (500µg) y diferentes cantidades de proteínas de leche. Se dejaron que interaccionaran toda la noche a 4°C y en agitación suave para formar el complejo Ag(proteínas de leche)- Ab (IgG).

TUBO	µg de proteína del suero de paciente y sujeto control	µg de proteína de leche
1	500	160
2	500	320
3	500	480
4	500	972
5	500	1900
6	500	3900

Tabla 5. Relaciones de suero y proteínas de leche para formar el complejo Ag-Ab.

Posteriormente las distintas soluciones con el complejo Ag-Ab se vertieron a microtubos con Proteína G-agarosa para poder recuperar el complejo Ag-Ab (Figura 9).

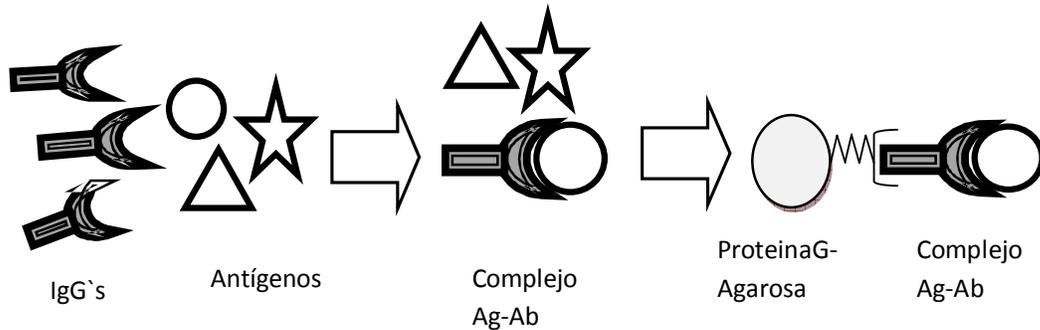


Figura 9. Diseño del experimento de inmunoprecipitación.

Las inmunoglobulinas se separaron de la proteína G-agarosa y se corrió un gel SDS-PAGE al 12%, para poder observar cuáles proteínas de la leche reaccionaron con las inmunoglobulinas del suero.

En los geles no se logró apreciar una diferencia concreta entre el patrón obtenido del paciente y el control (Figura 10) que indique una respuesta específica a alguna proteína.

Después se realizó un análisis densitométrico entre los geles de las bandas de proteínas que fueron recuperadas al reaccionar con las IgG. Se eliminaron aquellas bandas que pertenecen a los pesos moleculares de las IgG y de sus cadenas pesadas y ligeras. Con este análisis se logró identificar una banda en los geles del paciente, la cual incrementaba su densidad conforme aumentaba la cantidad de proteína de leche. Considerando los marcadores de peso molecular, se estimó que la banda presentaba una masa de 90kDa. Esta banda se extrajo del gel para procesarse e identificarse por espectrometría de masas.

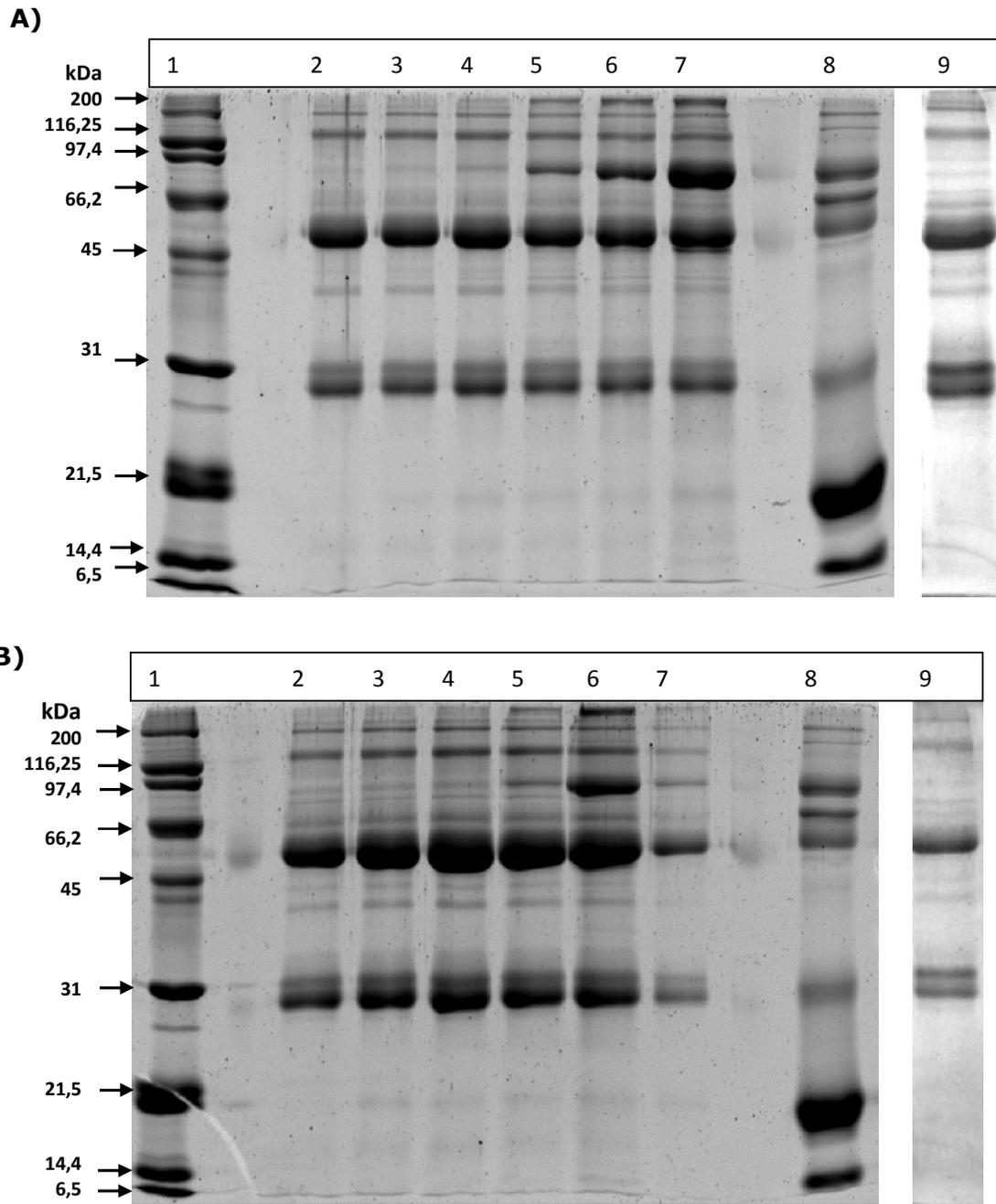


Figura 10. Gel SDS-PAGE donde se corrieron las muestras con los complejos Ag-Ab formados con diferentes cantidades de proteínas de leche (PL) recuperados con proteína-G-agarosa, A) Reacción con suero del paciente (PHps) ,B) Reacción con suero de sujeto control; (1): marcador de peso molecular (MPM), (2): reacción con 160 μg de PL, (3): reacción con 320 μg de PL, (4): reacción con 480 μg de PL, (5): reacción con 972 μg de PL, (6): reacción con 1900 μg de PL, (7): reacción con 3900 μg de PL, (8): PTL, en (9) se presentan las IgG`s del suero de los sujetos.

5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR "FINGER-PRINT" EN MALDI-ToF.

Del gel se extrajo la banda con un peso molecular aproximado de 90 kDa, de la cual se extrajeron los péptidos para su identificación por *Finger-Print* (Huella digital) con espectrometría de masas en formato Maldi-ToF. Con el análisis en las bases de datos (Mascot y Protein Lynx) de los espectros obtenidos de la proteína, se identificaron dos proteínas: la **lactoferrina** y la **lactoperoxidasa**(Figura 11).

A) B)

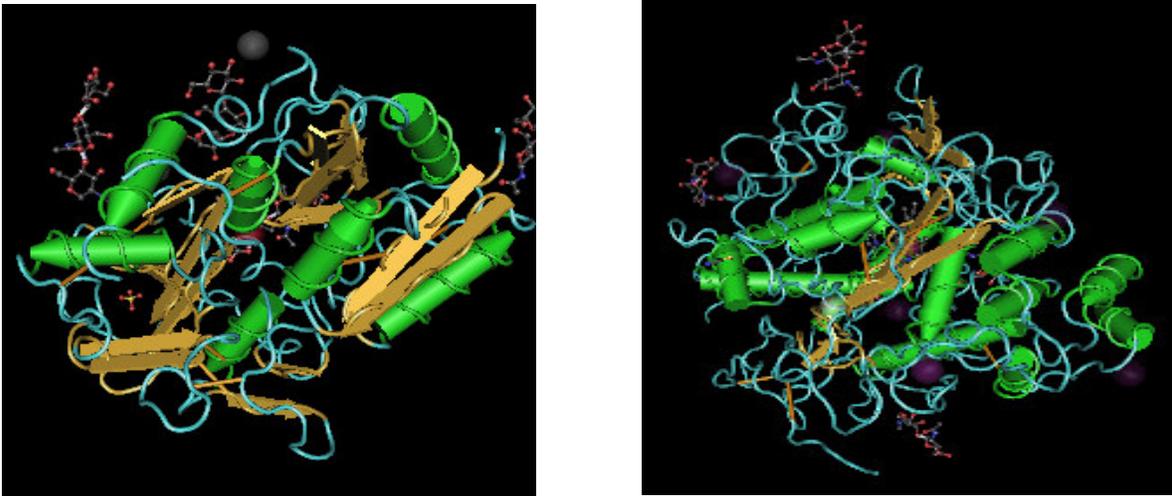


Figura 11. A) Lactoferrina, proteína identificada con un 100% de probabilidad. **B)** Lactoperoxidasa, proteína identificada con un 77.6% de probabilidad. Las base de datos utilizadas fueron Uniprot y NCBI. Los programas utilizados fueron ProteinLynx y MASCOT.

PROTEINA	M.W. (kDa)	pI (pH)	Probabilidad (%)	Péptidos	Cobertura (%)
Lactoferrina	78.006	8.2	100	33	49.6
Lactoperoxidasa	80.236	8.6	77.6	9	13.9

Tabla 6. Características de las proteínas identificadas con MALDI-ToF

6. FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE.

Después de realizar la inmunoprecipitación, buscamos abordar el problema con nuevas estrategias que nos permitieran determinar la existencia de otras proteínas antigénicas. Por lo tanto, decidimos separar en fracciones a las proteínas de leche utilizando métodos de cromatografía líquida. Esto con el objetivo de realizar ensayos inmunoenzimáticos que nos indicaran en que fracción se encuentra las proteínas antigénicas.

Con el patrón de proteínas obtenido de un gel en dos dimensiones (2-D), se eligió el método cromatográfico adecuado para el fraccionamiento (Figura 12). En este gel se observa que la mayoría de las proteínas presenta un punto isoeléctrico por debajo de 8. Por tanto, si el medio que contiene a las proteínas de leche se ajusta a pH de 9, la mayoría de las proteínas presentarán cargas negativas.

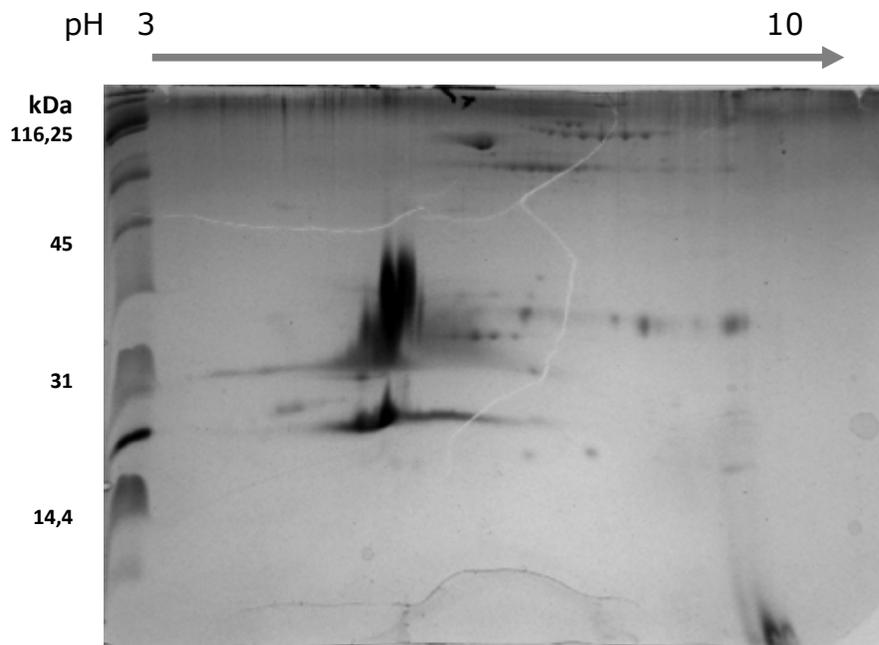


Figura 12. Patrón bidimensional de las proteínas de leche.

Con esta información consideramos utilizar cromatografía de intercambio iónico; en particular, para poder separar la mayor cantidad de proteínas aplicamos cromatografía de intercambio aniónico, utilizando un gradiente continuo de NaCl y una columna mono-Q de 8mL.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes.

- **Columna Mono-Q:** 8mL
- **Buffer A:** Bicarbonato de Amonio 50mM pH 9.0
- **Buffer B:** Bicarbonato de Amonio 50mM / NaCl 2M pH 9.0

La columna se equilibró con buffer A. Posteriormente, se inyectaron 45 mg de proteínas de leche y después las proteínas se separaron de la resina con el buffer B en un gradiente de concentración de sal, obteniendo el perfil de la Figura 14.

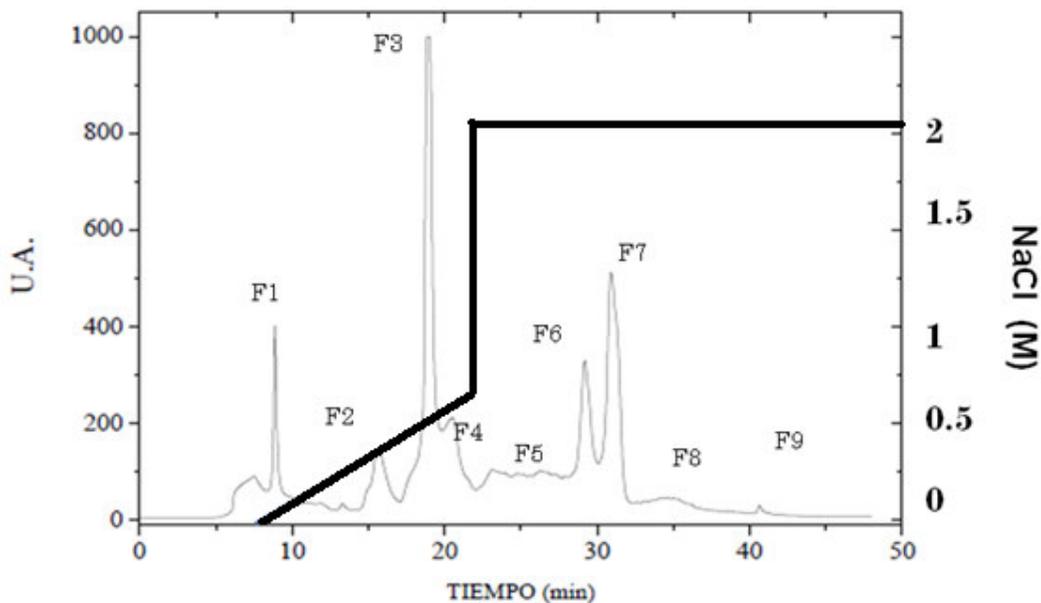


Figura 13. Cromatograma del fraccionamiento de las proteínas de leche
U.A. (Unidades arbitrarias de absorbancia).

Se obtuvieron 9 fracciones, las cuales se concentraron en membranas de diálisis secando con Aquacide. Se determinó concentración de proteína por BCA y se corrió un gel SDS-PAGE al 12% para observar las proteínas que contenía cada fracción.

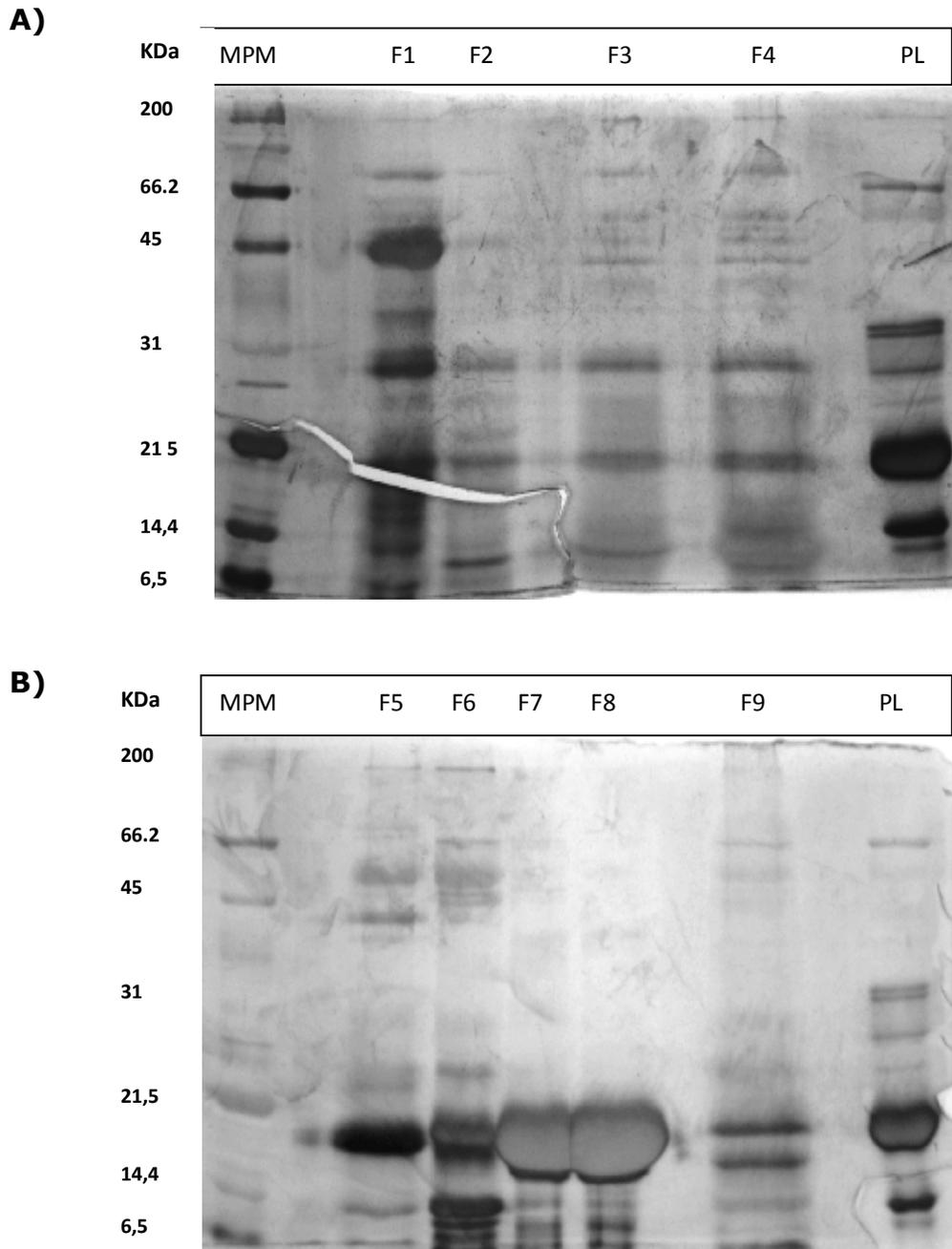


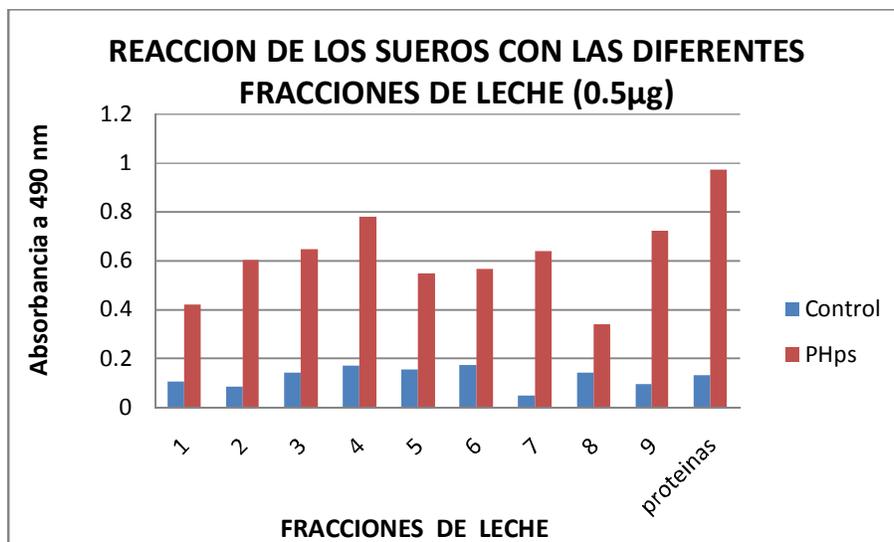
Figura 14. Distribución de las proteínas obtenidas en el fraccionamiento. (A) Marcador de peso molecular (MPM), fracciones 1-4 y proteínas de leche totales (PL); (B) MPM, fracciones 5-9 y PL.

7. ENSAYOS DE ELISA CON LAS FRACCIONES DE PROTEÍNAS DE LECHE.

Con cada fracción de leche obtenida se realizó un ensayo de ELISA donde se utilizó el suero del paciente (PHps) y el suero del sujeto Control.

Condiciones:

- Concentración de las diferentes fracciones: $1\mu\text{g/mL}$ y $0.5\mu\text{g/mL}$
- Dilución de sueros: 1:100
- Conjugado IgG: 1:5000



Gráfica 4. Absorbancias obtenidas en la ELISA, se utilizaron los sueros del paciente (PHps) y el sujeto sano (Control) y las nueve fracciones obtenidas; además se incluyeron las proteínas de leche totales (las fracciones y las proteínas de leche totales fueron ajustadas a una concentración de $0.5\mu\text{g}$).

En las gráficas obtenidas se observó que el suero del paciente reaccionó con las diferentes fracciones aunque con diferente intensidad.

8. WESTERN BLOT.

Otra estrategia que se llevó a cabo fue realizar Western Blot con las fracciones 1, 2, 3 y 4 que se observan en la Figura 14(A). Los Westernse revelaron por Quimioluminiscencia.

Se corrió un gel SDS-PAGE con marcadores de peso y las fracciones, las cuales se colocaron por duplicado. El gel se dividió en dos partes las cuales se transfirieron a membranas de PVDF. Después de la transferencia, una membrana se tiñó con rojo de Ponceau y la otra se uso para el Western-blot. A la par se corrió otro gel con marcadores de peso y las proteínas totales de leche, el gel se tiñó con Azul de Coomassie Coloidal, este sirvió para ubicar las proteínas que se revelaran por Western-blot.

Las condiciones a las que se trabajó fueron las siguientes:

- MUESTRAS: Fracciones de leche (1, 2, 3 y 4).
- SUERO C/ ANTICUERPOS PRIMARIOS: Suero de paciente con sintomatología, dilución: 1:75.
- ANTICUERPO SECUNDARIO: Anti-IgG-peroxidasa, dilución: 1:2000.

En el Western-blot revelado por quimioluminiscencia se detectaron 3 bandas: una en la fracción 2 de un peso aproximado de 45 kDa; en las fracciones 3 y 4 se detectaron 2 bandas, la primera de aproximadamente 31 kDa y la otra de 20 kDa.

Las proteínas detectadas en los Western están en proceso de identificación por espectrometría de masas.

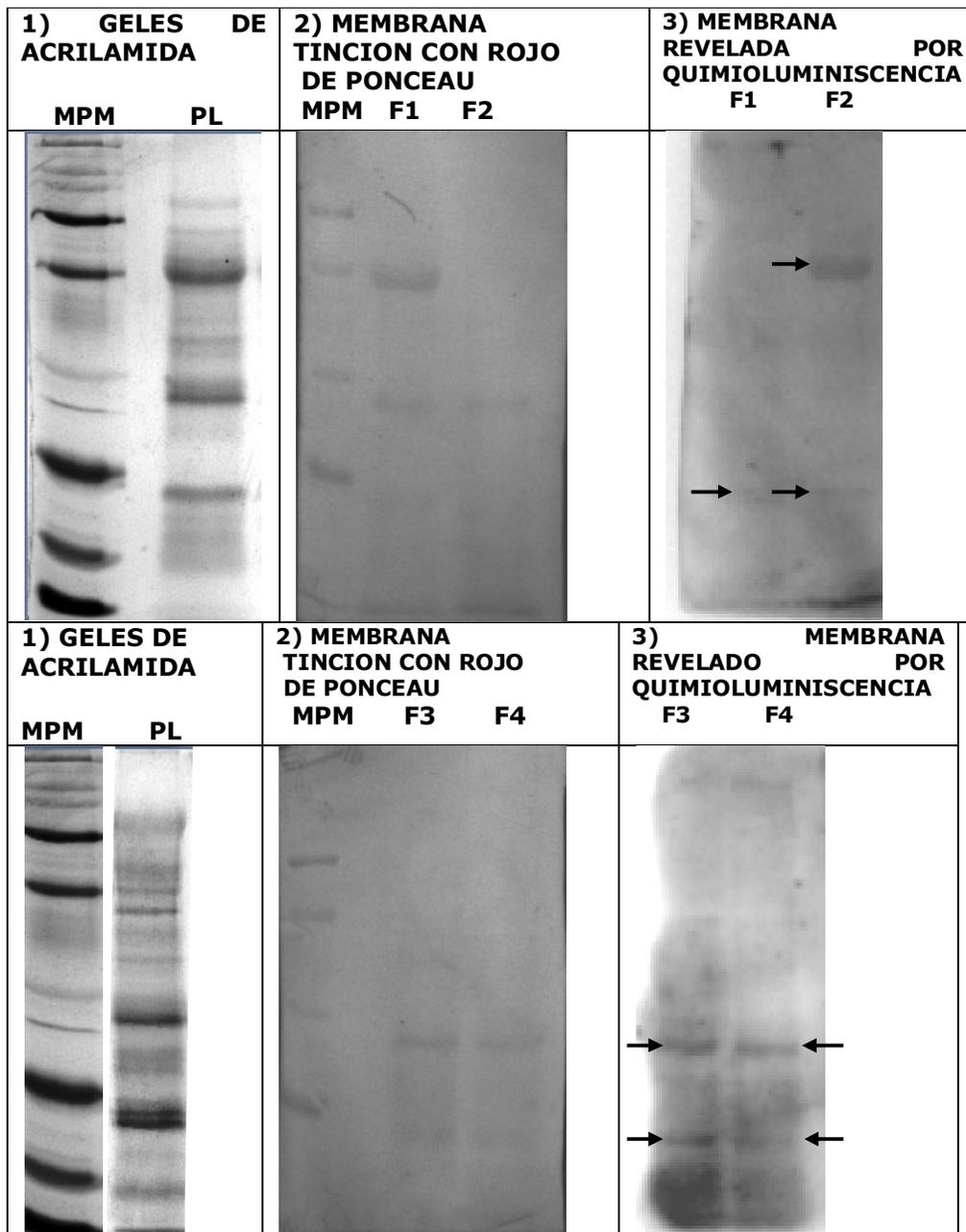


Figura 15. Western-blot de las fracciones 1,2,3 y 4 de las proteínas de leche. Para localizar las proteínas que fueron reveladas por quimioluminiscencia, una membrana se tiñó con rojo de Ponceau a la cual se le transfirieron las mismas proteínas que a la membrana para el Western. Además, se corrió un gel con marcadores de peso y proteínas de leche totales (PL).

VIII. DISCUSIÓN.

ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

Después de obtener la concentración de proteínas de cada suero, se realizaron los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para identificar qué tipo de mecanismo inmunológico está involucrado en el proceso patológico (intervención de IgG o IgE). Los ensayos se realizaron con diferentes parámetros para establecer las condiciones óptimas a las cuales se pueden trabajar. Lo anterior debido a que en el futuro, las técnicas estandarizadas podrían usarse para el diagnóstico rápido y certero de esta patología.

En la actualidad el diagnóstico es realizado con una historia clínica detallada y una exploración física cuidadosa. Además, usualmente se miden las reacciones de pruebas cutáneas, se analizan los títulos de IgE específica, en el suero de los pacientes. Sin embargo, hay pacientes con HPLV que muestran datos clínicos agudos de alergia sin niveles detectables de IgE específica. Por lo que el estándar de oro para el diagnóstico continua siendo el reto de alimentos oral, doble ciego placebo controlado. Donde los pacientes con HPLV mediada por IgE muestran respuesta en un tiempo de entre 15 y 30 minutos; y aquellos con HPLV mediada por otros mecanismos inmunológicos muestran respuesta en tiempos mucho mayores (de horas a días). Este tipo de estudios traducen una probable reactividad clínica, sin embargo, no proveen información pronóstica ni distinguen entre los diferentes fenotipos de la hipersensibilidad alimentaria.

En las ELISA realizadas para la identificación de IgG como anticuerpo involucrado en la respuesta a la hipersensibilidad a la leche, se observó que las señales obtenidas en los pozos con el suero del paciente con hipersensibilidad fueron mayores, en comparación con la señal obtenida con el suero del sujeto control. Así mismo, al

ajustar los sueros a la misma concentración y realizar el ensayo, se observó que las absorbancias del sujeto control disminuyeron, observándose una mayor diferencia entre la señal del paciente y el control.

Con los ensayos indirectos para la identificación de inmunoglobulina E, se observa que la reacción de los sueros del paciente y del control fueron similares ya que se observa una señal muy baja en ambos casos. Lo anterior nos indica la ausencia de la intervención de la inmunoglobulina E en el desarrollo de la sintomatología, ya que se observa una muy baja reacción entre las IgE y las proteínas de la leche.

Con todo lo observado en los ensayos de ELISA, se descarta la posibilidad de que la respuesta hipersensible en el paciente es provocada por la inmunoglobulina E; en tanto que, se sospecha fuertemente que la respuesta que prevalece es la causada por la inmunoglobulina G que se une a las epítopes presentes en las proteínas nativas de la leche y que resultan muy alergénicas en el paciente. Lo anterior nos indica que las inmunoglobulinas G del paciente con hipersensibilidad reconoce regiones en las proteínas que, si bien también lo hacen las IgG del control, las IgG del paciente lo hacen en mayor proporción, debido posiblemente a la cantidad de IgG que se encuentra en el suero, o a que reconocen más epítopes de las proteínas de leche.

Con los resultados obtenidos en las diferentes condiciones, consideramos que para futuros estudios el intervalo de concentración de las proteínas de leche para ensayos de ELISA fluctúa entre $0.312\mu\text{g/mL}$ a $2.5\mu\text{g/mL}$; mientras que las diluciones de suero sanguíneo para identificación de IgG pueden ser desde 1:50 hasta 1:200. En el caso del ensayo de identificación de IgE, sería conveniente probar la técnica con un paciente con HPLV causada por

esta inmunoglobulina y evaluar si las condiciones utilizadas en nuestro ensayo son las correctas.

TÉCNICAS DE TINCIÓN COMPATIBLES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Para identificar a las proteínas alergénicas, lo primero que se hizo fue elegir una tinción adecuada para llevar a cabo las técnicas de espectrometría de masas. La tinción debe cumplir con dos características principales; la primera, es que deben ser muy sensibles para poder visualizar proteínas que se encuentren en concentraciones de hasta centenas o decenas de nanogramo; la segunda, que sean compatibles con espectrometría de masas para poder llevar a cabo correctamente la identificación de la proteína.

Para esto se eligieron dos técnicas de tinción: la de plata modificada y la de Azul de Coomassie coloidal. Al hacer una comparación entre el gel teñido con plata y el gel teñido con Azul de Coomassie Coloidal (Figura 8), mediante un estudio densitométrico hecho con el programa PD-Quest, encontramos que la técnica de tinción con Azul de Coomassie coloidal nos permite visualizar un número mayor de proteínas que las que pueden ser visualizadas con la técnica de tinción con plata; la cual presenta un fondo oscuro donde se pierden varias proteínas.

INMUNOPRECIPITACIÓN.

En los geles obtenidos de la inmunoprecipitación no se logró observar una diferencia contundente entre el patrón de proteínas que se obtuvo en el paciente y en el control. En principio, después de obtener los resultados de las ELISAS, se esperaba observar un patrón característico en el gel obtenido con las IgG del paciente en comparación con el patrón de proteínas del control. Así, se permitiría identificar con claridad una o varias proteínas que sólo se unieran a las IgG que están presentes en el suero del paciente. Sin embargo,

aún con esto observamos una banda con un peso molecular estimado electroforéticamente de 90 kDa, la cual se va incrementando conforme se aumenta la concentración de proteínas de leche en la reacción. A pesar de que las IgG del paciente y del control unieron a esta proteína, en el gel del paciente dicha proteína se observa más abundante en los carriles 5 y 6 en comparación con el gel del control.

El carril 7 no se puede comparar ya que desafortunadamente la cantidad colocada en dicho carril del gel del control no fue la misma que en el carril correspondiente del gel del paciente.

En la inmunoprecipitación las IgG's reaccionaron con los epítopes conformacionales que se encuentran en las proteínas nativas del suero de leche; igual que lo hicieron en los ensayos de ELISA. Hasta este punto podemos observar que las IgG tanto del paciente como del control, reconocen los epítopes conformacionales, aunque en diferente grado, provocando que en uno se exacerbe la respuesta inmune y en el otro no.

Con estos resultados procedimos a hacer dos cosas: la primera, identificar la proteína con espectrometría de masas en formato MALDI-ToF; y la segunda buscar más opciones para identificar más proteínas antigénicas causantes de la hipersensibilidad en el paciente.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR *FINGER-PRINT* EN MALDI-ToF.

La identificación de la proteína se llevó a cabo con espectrometría de masas en formato MALDI-ToF; esta técnica nos permite una ionización suave para los péptidos que se lograron obtener con la tripsinización.

Con este equipo, las bases de datos Uniprot y NCBI, y los programas de análisis Protein Lynx y MASCOT, se identificaron dos

proteínas: la lactoferrina con un 100% de probabilidad y la lactoperoxidasa con un 77.6% de probabilidad.

Con los datos obtenidos que se muestran en la tabla 6 observamos que ambas proteínas tienen pesos moleculares y puntos isoeléctricos similares: lactoferrina 80.236 kDa, p.I 8.6, y lactoperoxidasa 78.006 kDa, p.I 8.2. Esto nos sugiere que ambas proteínas estaban presentes en la banda que fue extraída del gel y que las dos fueron reconocidas por las IgG` s del suero del paciente. Por lo que es muy posible que se traten de proteínas con epítopes conformacionales que son alergénicas para este paciente.

FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE Y ENSAYOS DE ELISA.

Con el afán de encontrar más proteínas alergénicas que pudieran presentarse en pequeñas cantidades en la leche, procedimos a separarlas con la finalidad de enriquecerlas. Utilizando la cromatografía de intercambio aniónico se separaron 9 fracciones.

En los geles de la figura 15 se observa que la mayoría de las fracciones (1-6 y 9) tienen un patrón muy parecido en el que se observan varias bandas de proteínas. Para el caso de las fracciones 7 y 8 se observa un patrón similar entre ambas, pero con mucho menos bandas de proteínas. El parecido entre las diferentes fracciones puede deberse a las distintas isoformas que las proteínas de la leche contiene y que pueden observarse también en el gel 2-D de la figura 13.

Al llevar a cabo los ensayos de ELISA, se utilizó el suero del paciente y el suero del control observándose que las IgG tanto del paciente como del control reaccionan con todas las fracciones. Se observa que la reacción del control es muy baja con respecto ala del paciente. Además, la muestra del paciente reaccionó con diferente intensidad para las distintas fracciones de leche. Esto podría indicar que las

proteínas alergénicas se encuentran repartidas en todas las fracciones; por ejemplo, las distintas isoformas de proteínas alergénicas podrían generar este resultado. Otra posibilidad es que algunas proteínas podrían compartir las regiones antigénicas que son reconocidas por las IgG; ya que al analizar el patrón de proteínas observado en cada fracción tenemos una distribución diferente, observándose mayor diferencia en las fracciones 7 y 8 comparadas con las demás fracciones.

WESTERN-BLOT

Se planeó realizar Western-blot con todas las fracciones de proteínas de leche para tratar de identificar aquellas que son reconocidas por las IgG; desgraciadamente, por la escasa cantidad de suero que se tenía del paciente sólo se logró realizar los Western con las primeras cuatro fracciones.

Al revelar la membrana por quimioluminiscencia, se detectaron 3 bandas de proteínas: una en la fracción 2 de un peso estimado electroforéticamente de 45 kDa, otra en la fracción 3 con un peso de 32 kDa, la última se encontró en la fracción 4 con un peso aproximado de 20 kDa. En este caso, los epítopes que reconocieron las IgG fueron de tipo lineal, ya que las proteínas fueron desnaturalizadas en la electroforesis SDS-PAGE. Esta circunstancia probablemente provocó que los epítopes conformacionales reconocidos anteriormente tanto en las ELISAS como en la inmunoprecipitación, se perdieran. Por tanto, es probable que tales epítopes no pudieran reconocerse por las IgG del suero del paciente.

Estas proteínas actualmente están en proceso de identificación.

IX. CONCLUSIONES.

- ✓ El mecanismo por el que se desarrolla la respuesta exacerbada de la respuesta inmune del paciente que se estudió en éste trabajo ante la exposición a proteínas de la leche, parece mediarse por las inmunoglobulinas de tipo G.

- ✓ Dos de las proteínas alergénicas causantes de la respuesta inmune que reaccionan con las IgG, fueron identificadas por MALDI-ToF/*fingerprint* como lactoferrina y lactoperoxidasa, las cuales presentarían epítopes de tipo conformacional.

- ✓ Las IgG se unen también a epítopes lineales de otras proteínas de leche que están en proceso de identificación.

X. PERSPECTIVAS.

- ✓ Identificar las proteínas detectadas a través del Western blot.
- ✓ Con los avances que se han tenido en las técnicas realizadas en este trabajo, se espera que en corto tiempo estén montadas completamente y que en un futuro puedan aplicarse como auxiliares para el diagnóstico de la hipersensibilidad a las proteínas de leche.
- ✓ Elucidar el conjunto de proteínas en la leche que causan hipersensibilidad en la población infantil mexicana y que podrían formar un "perfil" característico en dicha población.

XI. BIBLIOGRAFIA.

1. M. Orsi, A. Fernández, F.R. Follet, S. Marchisone, G. Saieg, V.B. Busoni, O. Tabacco, C. Toca. **"Alergia a la proteína de leche de vaca. Propuesta de Guía para el manejo de los niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca"**, Arch Argent Pediatr; 107(5):459-473 (2009).
2. R. Cervantes-Bustamante, M.P. Sánchez-Pérez, D. Bacarreza-Barrios, E. Montijo-Barrios, F. Zárate-Mondragón, **"Actualidades en alergia a la proteína de leche de vaca"**, Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría; 21(82):51-59 (2007).
3. E.A. Lebrero, M.L. Fernández, A.M. Somoza. **"Alergia a alimentos en niños"**, Allergol Inmunol Clin; 16 (Extraordinario Núm2): 96-115 (2001).
4. A. Host. **"Frequency of cow's milk allergy in childhood"**, Ann Allergy Asthma Immunol; 89(6) (Supplement 1): 33-37 (2002).
5. S. Hèller-Roussant, S. Flores-Huerta, M.E. González-Muñoz, B. del Río-Navarro, S. Placencia- Inclán. **"Consenso de Alimentación en el Niño con Alergia Alimentaria. Asociación Mexicana de Pediatría"**, Acta Pediátrica Mexicana; 26(5):270-292 (2005).
6. P.G. Rodríguez-Ortiz, D. Muñoz-Mendoza, A. Arias-Cruz, S.N. González-Díaz, D. Herrera-Castro. **"Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey"**, Revista Alergia México; 56(6):185-191 (2009).
7. G. López-Pérez, B.M. Morfín-Maciél, J. Huerta-López, J. López-López, J.L. Rivera-Pérez, L. López-Medina. **"Factores de riesgo**

- relacionados con enfermedades alérgicas en la Ciudad de México**", Revista Alergia México; 57(1):18-25 (2010).
8. E.M. Hidalgo-Castro, B.E. del Río-Navarro, J.L. Sienra-Monge. **"Factores de riesgo de alergia alimentaria"**, Revista Alergia México; 56(5):158-164 (2009).
 9. S.Guillèn-Lòpez, M.Vela-Amieva. **"Desventajas de la introducción de la leche de vaca en el primer año de vida"**, Acta Pediátrica Mexicana; 31(3):123-128 (2010).
 10. R.G. Crittenden, L.E. Bennet. **"Cow`s Milk Allergy: A Complex Disorder"**, Journal of the American College Nutrition, 24(6):582S-591S (2005).
 11. S. Benot-Lòpez. **"Alergia a las proteínas de la leche de vaca. Edad límite de uso apropiado "**, Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía ,Informe de Evaluacion, 19-23 (2000).
 12. L. Avila-Castañon, E.M. Hidalgo-Castro, B.E del Río-Navarro, J.L. Sienra-Monge. **"Alergia a la proteína de la leche de vaca"**, Revista Alergia México; 52(5):206—2012 (2005).
 13. A.H. Benhamou, M.G. Schäppi-Tempia, D.C. Belli, P.A. Eigenmann. **"An overview of cow`s milk allergy in children"**, Swiss MedWKLY ; 139(21-22):300-307 (2009).
 14. J.G. Romero-Valdez, R. Atilio-Zini. **"Reacciones de Hipersensibilidad"**, Revista de Posgrado VIa Càtedra de Medicina 168:11-17 (2007).
 15. E. Alonso-Lebrero, C. Pedròn-Giner. **"Reacciones adversas a las proteínas de leche"**, Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud; 6(26):141-151 (2002)
 16. <http://pathmicro.med.sc.edu/2009-immpdf/17-18toleranceautoimmunity2009.pdf>
 17. <http://pathmicro.med.sc.edu/2009-immpdf/19-20Hypersensitivity2009.pdf>

18. K. Murphy, P. Travers, M. Walport. **"Immunobiology"**, Garland Science, Taylor&Francis Group, LLC (Ed 7a): 555-592 (2008)
19. J.F. Cadena-León, R. Cervantes-Bustamantes, E. Montijo-Barrios, V. Hernández-Bautista, F. Zárate-Mondragón. **"Métodos diagnósticos de alergia a la proteína de la leche de vaca. Revisión cualitativa de la literatura"**. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 18(3):113-120 (2009).
20. J. Mestecky, Z. Moldoveanu, C.O. Elson. **"Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens"**, Elsevier, *Vaccine* 23:1800-1803 (2005).
21. M.G. Spiekermann and W.A. Walker. **"Oral tolerance and its role in clinical disease"**, *Journal of Pediatric, Gastroenterology and Nutrition*; 32:237-255 (2001).
22. L. Mayer, K. Sperber, L. Chan, J. Child. **"Oral tolerance to protein antigens"**, *Allergy* 56(67):12-15 (2001)
23. H.A. Sampson. **"Update on food allergy"**, *J. Allergy Clin Immunol*; 113:805-191 (2004).
24. <http://www.uniprot.org/>
25. A.M. Edwards, C.H. Arrowsmith. B. Pallieries. **"Proteomics: News tools for a new era"**, *Drug Discov*; 3:34-45 (2000).
26. R.E. Banks, M.J. Dunn, D.F. Hochstrasser, J.C. Sánchez, W. Blackstock, D.J. Pappin, P.J. Selby. **"Proteomics: news perspectives, new biomedical opportunities"**, *The Lancet*; 356:1749-56(2000).
27. T. Mojica, O. Sánchez, L. Bodadilla. **"La proteómica, otra cara de la genómica"**. *NOVA*, 1: 1794-2370 (2003).
28. R. Erra-Balsells. **"Del vuelo de las Proteínas y de cómo lograrlo"(Espectrometría de Masas UV-MALDI)**. *Química Viva*, 2:56-69 (2004).
29. C. Kuns and B. Lønnerdal. **"Human milk proteins: separation of whey keys and their analysis by acrilamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography"**

- (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography**", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49:464-70 (1989)
30. P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke. **"Measurement of protein using bicinchoninic acid"**. *Analytical Biochemistry*; 150:76-85 (1985)
31. E. Medina, O. Mata, J.C. Carpio, A. Zavala, A. Ruiz, J. Gavilondo, M. Ayala, J. Vázquez, H. Bell, M. Dueñas. **"Manual de Técnicas Modernas en Inmunología Teoría y Práctica"**. Secretaria de Salud; 15-41 (2000).
32. Gottschall, P.E., Ajmo J.M, Eakin A.K., Howell M.D., Bailey L.A. **"Panel of synaptic protein ELISAS for evaluating neurological phenotype"**. *Exp Brain Res*;201:885-893 (2010)
33. H.M. Garcia. **"Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia"**. *UNIV DIAG* 1(2):31-41 (2000).
34. A. Alban, S. O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, I. Currie. **"A novel experimental design for comparative two dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard"**, *Proteomics* 36-44 (2003).
35. S. Encarnación, M. Hernández, G. Martínez-Batallar, S. Contreras, M. C. Vargas, J. Mora. **"Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes"**. *Biol. Proced. Online* 7(1):117-135 (2005).
36. G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci. **"Blue silver: A very sensitive colloidal comassie G-250 staining for proteome analysis"**. *Electrophoresis*, 25:1327-1333 (2004).

37. M. Pink, N. Verma, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke. **"CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility"**. Electrophoresis, 31:593-598 (2010).
38. F. Gharahdaghi, C. R. Weinberg, D. A. Megher, B. S. Imai, S. M. Mische. **"Mass spectrometric identification of proteins from silver stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity"**. Electrophoresis;20:601-605 (1999)
39. J.X. Yun, R. Wait, R. A. Harry, J.A. Westbrook, C. H. Wheeler, M. J. Dunn. **"A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption\ ionization and electrospray ionization mass spectrometry "**. Electrophoresis;21:3666-3672 (2000)
40. B.S. Antharavally, B. Carter , P.A. Bell, K. Mallia. **"A high-affinity reversible protein stain for Western blots"**. Analytical Biochemistry;329:276-280 (2004)
41. K. Biemann, **"Mass spectrometry of peptides and proteins"**, Rev Biochem; 61:997-1010 (1992).
42. K. Hjerno, P. Hojrup. **"Protein identification by MALDI-ToF MS and Data base searching"**.
43. M. André, M. Karas. **"Investigation of sample-purification procedures for MALDI-based proteomic studies"**. Anal Bioanal Chem; 389: 1047-1053 (2007)

XII. APÈNDICE

G) PROTEÓMICA

La proteómica es la ciencia que determina la expresión de las proteínas que se producen en una célula, tejido u organismo en condiciones determinadas, normales o fisiopatológicas, así como la identificación precisa e inequívoca de aquellas proteínas de interés. Además se encarga de establecer las propiedades funcionales y estructurales de dichas proteínas.

Los objetivos de la proteómica son principalmente de dos clases: estudiar los cambios globales de la expresión de las proteínas celulares y determinar la identidad y las funciones de todas las proteínas de los proteomas de los organismos. El conjunto completo de proteínas sintetizadas por una célula recibe el nombre de proteoma. ^[24,25]

Las potenciales aplicaciones de la investigación proteómica son cuantiosas y variadas, además de proporcionar oportunidades para resolver problemas biológicos básicos. La tecnología basada en la proteómica tiene evidentes aplicaciones en la investigación biomédica. Entre las últimas investigaciones se encuentran las causas y los diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas y las enfocadas en la búsqueda de nuevos fármacos.

La proteómica puede clasificarse en cinco grandes áreas de aplicación centradas en:

- La identificación masiva de proteínas.
- La microcaracterización de proteínas (análisis de modificaciones postraduccionales).
- Análisis de expresión diferencial (cuantificación relativa y absoluta).

- Análisis de las interacciones proteína-proteína.
- Búsqueda, verificación y validación de biomarcadores.^[26]

En la actualidad la investigación de los proteomas se centra principalmente en el desarrollo de métodos exactos y relativamente rápidos para identificar y caracterizar a las proteínas, las principales tecnologías en desarrollo son las siguientes:

- Tecnología reproducible de electroforesis en geles 2-D.
- Tecnología de tinción y análisis de los geles.
- Tecnología para la identificación de las proteínas, tal como la espectrometría de masas.
- Tecnologías de manejo electrónico tales como bases de datos (de genomas y de proteínas) y también algoritmos de búsqueda y de recuperación de datos.^[24, 25, 26]

1. HERRAMIENTAS DE LA PROTEÓMICA.

a) ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL (2-D).

La expresión de las proteínas se analiza en la actualidad con geles bidimensionales (2-D). En esta técnica primero se extraen las proteínas de las células o de los tejidos y luego se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la primera dimensión del gel, las proteínas se separan según la carga (dentro de un gradiente de pH). A continuación el gel se gira en otra dimensión y se añade dodecil sulfato sódico (SDS) al amortiguador.

Las proteínas se separan en la segunda dimensión por diferencias de masa molecular. Normalmente pueden visualizarse millares de proteínas, utilizando técnicas de tinción muy sensibles (p.ej., tinción

con plata o tinción con azul de Coomassie) y mediante Software especializados se analizan las imágenes de los geles para determinar la presencia, ausencia o intensidad de las diferentes proteínas (Figura 16).^[30, 31, 35]

Para la identificación experimental de las proteínas, se pueden extraer las manchas del gel e hidrolizar la proteína para obtener pequeños péptidos por digestión enzimática proteolítica (p. ej., con tripsina o quimiotripsina), que pueden analizarse por espectrometría de masas.^[35]

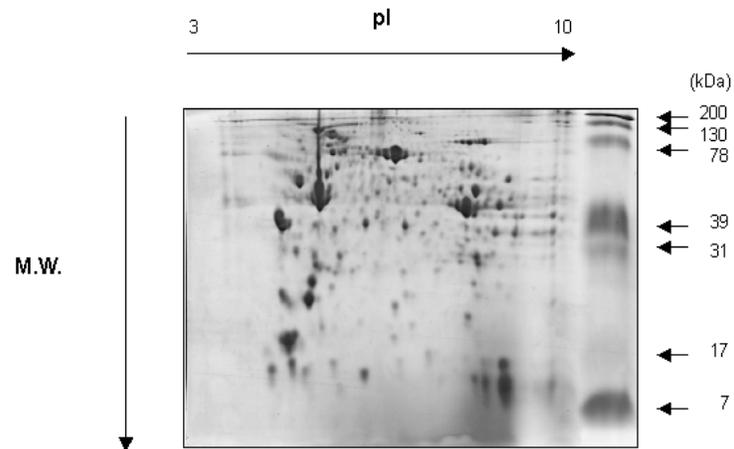


Figura 16. Patrón bidimensional en gel.

b) ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS.

En años recientes los bioquímicos abandonaron el método de degradación de Edman para secuenciar proteínas. Ahora se utiliza con más frecuencia la espectrometría de masas (EM), una técnica poderosa y sensible para separar e identificar moléculas y determinar su masa aprovechando diferencias en sus relaciones entre masa y carga (m/z).

En un espectrómetro de masas, por un campo magnético fluyen moléculas ionizadas. La fuerza del campo magnético desvía los iones dependiendo de las proporciones m/z ; y el detector mide la deflexión de cada ion. Además de la identificación de proteínas y de la determinación de la masa, la EM también permite detectar cofactores ligados y modificaciones en las proteínas.

Dado que el análisis por EM implica la ionización y la vaporización de las sustancias por investigar, el uso de macromoléculas térmicamente inestables como proteínas y ácidos nucleicos no fue factible hasta que se desarrollaron métodos como la ionización por electroaspersión y la ionización/desabsorción asistida por matriz (MALDI).^[29, 30]

i. MALDI-ToF

MALDI-ToF es una técnica de ionización suave utilizada en EM. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization" (*desabsorción/ionización con láser asistida por matriz*) y ToF por el separador de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés "Time-of-Flight" (tiempo de vuelo).

En MALD-ToF (figura 17), un pulso láser vaporiza los péptidos de la proteína, la cual ha sido proteolizada anteriormente, y que se embebe en una matriz sólida. Una vez que la muestra se ha ionizado, sus moléculas (ahora en la fase gaseosa) se separan conforme atraviesan el tubo de vuelo debido a sus proporciones m/z individuales, la razón m/z de los iones individuales son calculados basándose en el tiempo en que atraviesan el tubo.

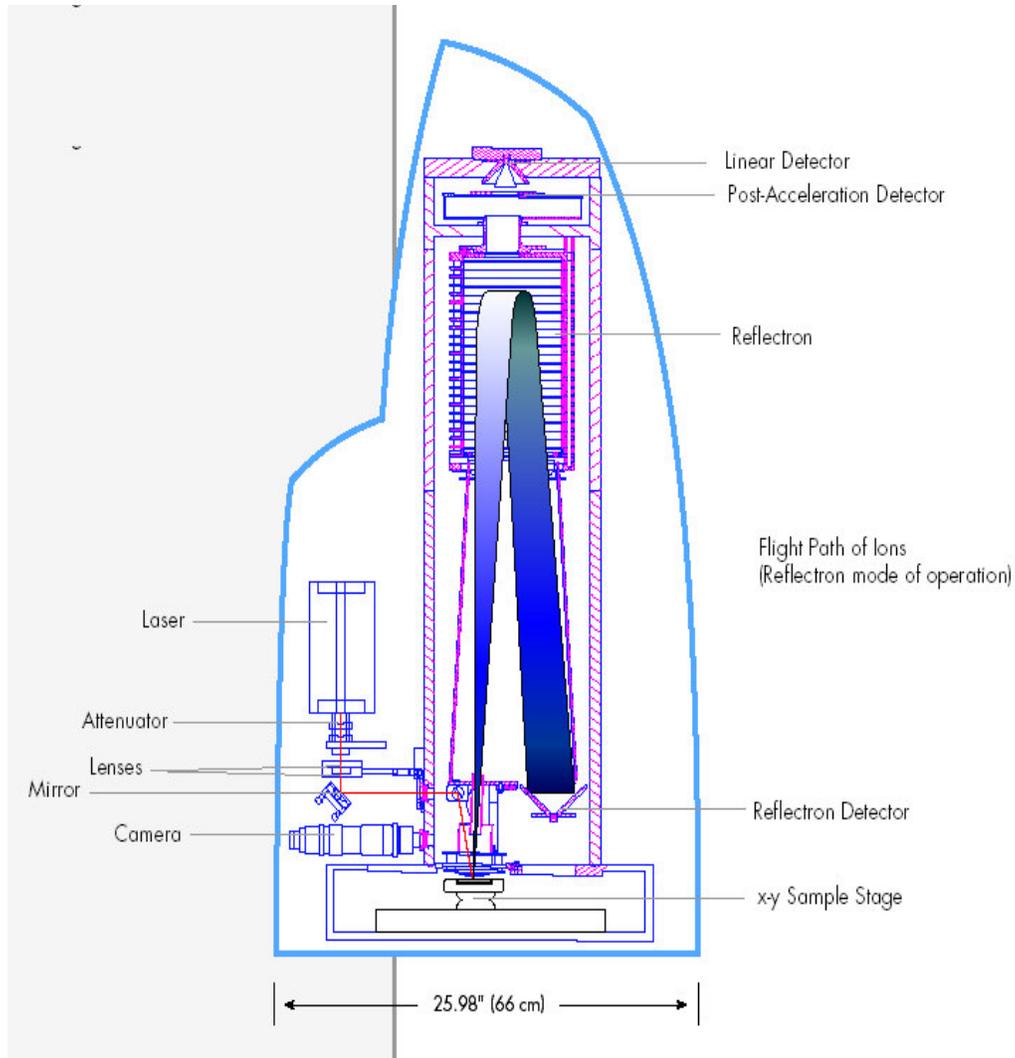


Figura 17. Maldi-ToF modo Reflectron.

Los péptidos con alta masa tienen un tiempo de vuelo largo en el tubo antes de alcanzar el detector al final de su recorrido a través del tubo de vuelo. Dicho detector produce un pico para cada ion, con esto se produce un patrón de péptidos al que se le llama "huella peptídica" de la proteína. Posteriormente, en un proceso asistido por computadora, la información concerniente a la masa de cada ion se compara con datos de iones de estructura conocida y se usa a fin de determinar la identidad molecular de la muestra. [29,36]

B) TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

1. ELISA

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA (del inglés Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay), fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. En este sistema, el antígeno o el anticuerpo se adsorben a una fase sólida (microplacas de poliestireno, o bien membrana de nitrocelulosa) sobre la cual se llevan a cabo las reacciones. Se utilizan anticuerpos conjugados a enzimas; los primeros conservan su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que las enzimas son capaces de catalizar una reacción en la cual el sustrato se transforma en un producto de color.

Existen variantes de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio, en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno. En los de captura de antígenos, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido antes a un primer anticuerpo, adsorbido a la fase sólida. Se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.

Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y a la reproducibilidad de resultados.

Los sustratos para la enzima HRP son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por

lo que se acompañan de cromógenos que al oxidarse en la reacción enzimática desarrollan color. De estos, la empleada con mas frecuencia es la orto-fenilendiamina, que continua en forma soluble después de oxidarse.

Los sustratos para la FA son el p-nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores de 30°C; el 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato, se puede emplear en los ELISAS en tubo o en ELISA de punto (conocido como dot-ELISA), que se lleva a cabo sobre una membrana de nitrocelulosa en la que aparecen manchas (puntos).

El ELISA es muy versátil, por lo que tiene aplicaciones muy variadas como diagnóstico de enfermedades infecciosas, cuantificación de hormonas, haptenos y titulación de anticuerpos, entre otras. [32]

2. WESTERN-BLOT

El Western blot o inmunoblot es una técnica analítica para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una muestra compleja de proteínas, como un extracto celular), es uno de los métodos más útiles con que se cuenta para el análisis antigénico.

Esta metodología combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), con las reacciones inmunoenzimáticas en fase sólida. En el primer paso, las proteínas se separan atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc...lo que permite su identificación. Posteriormente, son electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, nylon o PVDF, en donde las proteínas se unen a los grupos reactivos de éstas, quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón que se obtiene sobre la membrana es

una copia del patrón de separación obtenido en el gel. A continuación, se bloquean los sitios reactivos de la membrana que quedan libres, con alguna proteína que no interfiera. Posteriormente, se hace reaccionar con los anticuerpos problema, los cuales podrán unirse a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel.

La siguiente reacción que se efectúa corresponde a la primera interacción antígeno-anticuerpo, que se pone de manifiesto al agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima como peroxidasa u otro conjugado marcado. En el ensayo enzimático se agrega el sustrato y un cromógeno que precipite *in situ* para hacer visible la reacción.^[32]

XIII. GLOSARIO.

Alérgeno: es una sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles, que han estado en contacto previamente con el alérgeno.

Anergia: es un estado de los linfocitos en el cual éstos, pese a estar presentes, no son activos. Esta situación suele deberse a falta de alguno de los factores de activación esenciales y parece ser un mecanismo de regulación básico en la biología del sistema inmune por ejemplo, en cuanto a la tolerancia frente a los antígenos propios.

Anticuerpo (inmunoglobulina): son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño.

Antígeno: La definición moderna abarca todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas), de virus y otros microorganismos.

Atopía: para referirse al tipo de mecanismo inmunitario que presentan las enfermedades atópicas (correctamente, enfermedades por atopía), las cuales constituyen un grupo de trastornos alérgicos mediados por el efecto y acción de anticuerpos IgE sobre las células.

Citocinas: son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación.

Especificidad en una prueba diagnóstica: es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la capacidad de test para detectar sanos.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos}(-)}{\text{Verdaderos}(-) + \text{falsos}(+)}$$

Sensibilidad en una prueba diagnóstica: es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos}(+)}{\text{Verdaderos}(+) + \text{falsos}(-)}$$

Sucedáneos: sustancia o elemento que puede reemplazar a otro por tener propiedades similares.

Trombocitopenia: es cualquier situación con un recuento plaquetario inferior a 100.000/mm³, es decir, la disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales. En términos generales los valores normales se ubican entre 150.000/mm³ y 450.000/mm³ (Plaquetas por cada milímetro cúbico).