



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

*“Proliferación de Linfocitos Totales en Presencia de Escamas
Humanas en Pacientes Alérgicos al Ácaro del Polvo”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Ilayalid García Ortega

ASESOR:

Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice general:

Índice de tablas.....	ii
Índice de figuras.....	ii
Abreviaturas.....	iii
1.-Resumen.....	1
2.-Introducción.....	2
2.2.-Hipersensibilidad.....	4
Hipersensibilidad tipo I.....	4
Anafilaxia.....	5
Hipersensibilidad tipo II.....	6
Hipersensibilidad tipo III.....	6
Hipersensibilidad tipo IV.....	8
2.3.-Alérgenos.....	10
2.4.-Procesamiento del antígeno.....	11
2.5.-Predisposición Genética y Epigenética.....	12
2.6.-Ácaros.....	13
2.7.-Diagnóstico.....	14
Pruebas <i>in vivo</i>	15
Pruebas <i>in vitro</i>	17
Proliferación de linfocitos.....	18
2.8.-Linfocito.....	19
3.-Planteamiento del Problema.....	23
4.-Justificación de la Investigación.....	23
5.-Hipótesis.....	24
6.-Objetivos de la Investigación.....	24
6.1.-Objetivo general.....	24
6.2.-Objetivos particulares.....	24
7.-Metodología.....	25
7.1.-Descripción de Procedimiento.....	26
8.-Resultados.....	29
9.-Discusión.....	45
10.- Conclusiones.....	48

11.-Anexos:.....	49
11.1.-HOJA DE RECOLECCION DE DATOS	49
12.-Referencias.....	50

Índice de tablas

📄 Tabla 1	27
📄 Tabla 2	29
📄 Tabla 3	33
📄 Tabla 4	36
📄 Tabla 5	37
📄 Tabla 6	39
📄 Tabla 7	39
📄 Tabla 8	41
📄 Tabla 9	43

Índice de figuras

Figura 1.....	9
Figura 2.....	12
Figura 3.....	15
Figura 4.....	20
Figura 5.....	32
Figura 6.....	35
Figura 7.....	36
Figura 8.....	38
Figura 9.....	40
Figura 10.....	41
Figura 11.....	42

Abreviaturas

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ISAAC: Estudio Internacional de Asma y Alergias en Niños
- IgE: Inmunoglobulina E
- MHC: Moléculas del complejo de histocompatibilidad
- MEM: Medio Mínimo Esencial
- SSF: Solución Salina Fisiológica
- TTC: Cloruro de-2, 3,5 Trifeniltetrazolio
- I.E: Índice de Estimulación
- PEC: Prueba de Exposición Controlada
- Abs: Absorbancia
- Cel.: Células
- Ag: Antígeno
- mL: Mililitro
- µL: Microlitro
- g: Gravedades
- nm: Nanómetro

AGRADECIMIENTOS

No hay palabras para demostrar el profundo agradecimiento que tengo a todas aquellas personas que me han ayudado a lograr esta meta.

Para empezar a Mario y Lorena quienes desde el principio me apoyaron en todas mis excentricidades y nunca dejaron de creer en mí sin importar lo que los demás dijeran.

A mi abuelitos quienes me brindaron su amor, sabiduría y apoyo

Los amigos que tuve la dicha de encontrar en mi loco camino, gracias José, Emilio, Karen, Toño, Cecy, Dalia, Edgar, Héctor, Hermanito (Edgar), Mario Martínez y Tania por compartir desde una torta hasta alegrías penas y tiempo.

También quisiera mencionar a todos los profesores que me ayudaron compartiendo su conocimiento y consejos: Víctor Zendejas, Sandra, Erik, Ana Laura, Susana Mendoza, Gloria Arellano y Raquel Tapia.

A todas las personas del Hospital Juárez que tan amablemente me abrieron las puertas para que este trabajo fuera posible: Dra Rojo, Q. QFB Misael, Dr Mellado, Dra Castillo, Hugo y a todos los del laboratorio de micología del área de investigación y del departamento de alergia ya que de una u otra forma pusieron su granito de arena.

Pero a quienes no podría olvidar en esta importante ocasión son a todas aquellas personas que nunca creyeron en mí les estoy agradecida porque cada vez que me hacían menos o insultaban diciéndome cosas como rara, loca, fenómeno, monstruo y otras cosas me daban fuerzas para demostrar lo que esta niña rara loca y enferma podría llegar a ser.

Y finalmente quisiera agradecer a mi abuelito Ponciano quien siempre estará en mi corazón, ya que sin él esto nunca hubiera sido posible. Gracias abuelito por creer en mí todo el tiempo, por cuidarme, enseñarme desde las sumas hasta la belleza de las cosas simples de la vida. **Abuelito este trabajo te lo dedico a ti especialmente.**

Proliferación de Linfocitos Totales en Presencia de Escamas Humanas en Pacientes Alérgicos al Ácaro del Polvo

1.-Resumen

Hoy en día las alergias constituyen un problema de salud pública ya que su incidencia en poblaciones de distintas edades las posiciona como una de las principales causas de ausentismo tanto laboral como escolar. Para los mexicanos el tratamiento de este tipo de padecimientos representa una gran carga económica, se encontró que el 30% de los pacientes no recibe ningún tratamiento, y el 26% refirió no tener dinero para pagarlo. (1)

Los alérgenos más comunes son: Der p1 y Der p2 de los ácaros presentes en el polvo casero (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Fel d1 del gato, así como antígenos de árboles y pastos como Ph1 p1 y Ph1 p5 (*Phleumpratense*). En estudios previos utilizando ensayos *in vitro* como ELISA, Western Blot y degranulación de basófilos se demostró que los pacientes alérgicos a los ácaros reaccionaron ante las propias escamas de piel humana. (2)

La proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos es una de las pruebas más empleadas con este fin. Se basa en que ciertas lectinas, como la Concanavalina A, se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T, estimulando su proliferación policlonal, transformando la sal de tetrazolio, de color amarillo, en cristales de formazán de color azul por parte de enzimas mitocondriales de las células activas (3).

Este estudio se realizó una prueba *in vitro* con el fin de determinar si las escamas humanas son capaces de inducir la proliferación de los linfocitos de individuos alérgicos a los ácaros.

Participaron un total de 81 pacientes (30 mujeres y 51 hombres) alérgicos al ácaro del polvo casero que por técnica de escarificación presentaron una reactividad de tres o más cruces de acuerdo a los controles positivos aplicados, dicho procedimiento fue realizado en el área de Alergia e Inmunología del Hospital Juárez de México, a estos pacientes se les

realizo un ensayo de proliferación de linfocitos (EPL) hacia el ácaro del polvo y las escamas humanas.

Los resultados obtenidos de las pruebas de proliferación linfocitaria de los pacientes alérgicos a los ácaros del polvo casero mostraron que casi uno de cada dos presenta una respuesta positiva al Ag de escamas humanas. Se presentó un gran parecido en la reactividad tanto para los ácaros del polvo casero como para las escamas de piel humana con un valor de coeficiente de correlación de 0.91. Se confirmó la posibilidad de que las escamas de la piel humana jueguen un papel como fuente de alérgenos. Queda por determinar cuestiones sobre el orden de los eventos, si primero se produce la hipersensibilidad tipo I y después la autoinmunidad o viceversa.

2.-Introducción:

El primer registro de la anafilaxia es del faraón Menes, de Menfis, quien falleció a consecuencia de una picadura de avispa, en el año 2640 antes de Cristo. El segundo caso documentado es el del emperador Augusto, en la dinastía Julio-Claudia, quien presentaba en la primavera "catarro," dificultad para respirar y lesiones constantes con intenso purito en la piel. Así se refieren de otros miembros de la familia, con datos de rinoconjuntivitis y alergia a los caballos. Esta parece ser la primera evidencia de historia familiar de atopia, tal como se la considera en la actualidad. (4)

En 1906 Clemens Freiherr von Pirquet acuña el término "alergia" que viene del griego *allos* (extraño) y *ergos* (trabajo o actividad). Este término se refiere a las reacciones de tipo inmunológico en las cuales se presenta una respuesta de hipersensibilidad contra alérgenos presentes en pólenes, desechos de animales (ácaros, perro, gato, cucaracha), conidios y micelios de hongos y otras partículas suspendidas en el aire contaminado. Estas reacciones están mediadas por anticuerpos de la clase inmunoglobulina E (IgE) y forman parte de las enfermedades respiratorias de naturaleza no infecciosa como la rinitis y el asma. (5)

Hoy en día las alergias constituyen un problema de salud pública ya que su incidencia en poblaciones de distintas edades las posiciona como una de las principales causas de ausentismo tanto laboral como escolar. (6)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) acepta la rinitis, sinusitis, asma, neumonitis por hipersensibilidad, conjuntivitis, urticaria, eczema, dermatitis de contacto, choque anafiláctico, angioedema y algunos trastornos gastrointestinales mediadas por IgE como enfermedades alérgicas. (7)

Se estima que el 20% de la población mundial sufre alguna enfermedad mediada por IgE, tal como asma, rinitis, conjuntivitis, rinoconjuntivitis, eccema atópico, anafilaxia, entre otros y se considera que más del 50% del asma del adulto y alrededor del 80% del asma infantil, son de origen alérgico siendo afectada del 5 al 15% de la población infantil mundial. (7) La rinitis alérgica es la enfermedad por hipersensibilidad tipo I con mayor prevalencia en todo el mundo, pues afecta hasta 25% de la población. (1)

El estudio ISAAC (Estudio Internacional de Asma y Alergias en Niños) ha proporcionado desde 1991 los datos epidemiológicos en todo el mundo de la prevalencia de enfermedades alérgicas (asma, rinitis y eccema) y de los factores de riesgo relacionados con las mismas en grupos de niños de 6 a 7 y de 13 a 14 años de edad. Actualmente, comprende más de 100 países, entre los que se encuentra la República Mexicana, y se han incluido más de dos millones de niños. En estos estudios se ha demostrado que la prevalencia de enfermedades alérgicas se ha incrementado en los países en desarrollo, como México. (1)

Para los mexicanos el tratamiento de este tipo de padecimientos representa una gran carga económica, se encontró que el 30% de los pacientes no recibe ningún tratamiento, y el 26% refirió no tener dinero para pagarlo. El 35.6% gasta menos de 100.00 pesos al mes en remedios; 12.3% gasta entre 100.00 y 200.00 pesos al mes; y 6.8% hasta 600.00 pesos mensuales. El 20.4% gasta mensualmente entre el 10% y el 20% de su salario en medicamentos. (1)

Además diversos estudios demuestran la coexistencia de diferentes enfermedades alérgicas en un mismo individuo. Por ejemplo, se ha detectado que hasta 90% de los pacientes con asma padecen también, rinitis alérgica. En el reporte mundial de prevalencia de rinitis alérgica, del estudio ISAAC, se encontraron síntomas de conjuntivitis alérgica en 40.2% de los niños de entre 6 y 7 años, y en 50.2% de entre 13 y 14 años de edad. En los niños latino americanos, la rino-conjuntivitis alérgica se encontró asociada con asma en 71 y 44.3% de los niños de 6-7 y 13-14años, con eccema en 27.6 y 20.6%, y coexistieron las tres enfermedades en 27.6 y 14.4%, respectivamente. (1)

2.2.-Hipersensibilidad

El término hipersensibilidad se ha utilizado para describir la excesiva o inadecuada respuesta inmunitaria frente a antígenos ambientales, habitualmente no patógenos, que causa inflamación tisular y mal funcionamiento orgánico. (8)

En 1963 Peter Gell y Robert Coombs identificaron cuatro tipos de hipersensibilidad clasificándolas de acuerdo a la naturaleza de la respuesta que el sistema inmunológico monta frente al antígeno y a la sintomatología clínica que se observa. (4; 5)

Hipersensibilidad tipo I

Reacciones de hipersensibilidad inmediata que se producen dentro de los 15 minutos desde la interacción del Ag con la Ig E de las personas previamente sensibilizadas a ese antígeno. (9; 10)

En primer lugar se produce la entrada del Ag el cual es captado por las células presentadoras de Ag, que estimulan a los linfocitos Th2 a secretar citocinas estimulando a los linfocitos B- Ag específicos para producir Ig específica; ésta se fija a los mastocitos y basófilos. Es aquí donde se produce la sensibilización al alérgeno; en una segunda exposición al Ag se produce la unión del mismo a la Ig específica fijada a la membrana de dichas células provocando la degranulación, Esto da lugar a la liberación de mediadores vasoactivos e inflamatorios, que causan vasodilatación, espasmo del músculo liso e

infiltración tisular de eosinófilos y otras células inflamatorias, responsables de la sintomatología. (9; 10)

Anafilaxia

La Anafilaxia es una reacción de hipersensibilidad inmediata que afecta a diversos órganos de manera simultánea. Esta reacción ocurre con rapidez y puede causar la muerte por obstrucción respiratoria o colapso vascular irreversible. La liberación de histamina también puede ocurrir en ausencia de IgE, los anticuerpos IgG o IgM que activan el sistema del complemento pueden generar anafilotoxinas como la C3a y C5a, que son productos del desdoblamiento de C3 y C5, capaces de estimular la liberación de histamina por las células cebadas. (11)

Su aparición requiere de 3 etapas: una exposición sensibilizante, un tiempo de latencia, en el cual el antígeno se difunde por todo el organismo estimulando a los linfocitos B. este periodo dura de 7 a 10 días. Posteriormente una exposición desencadenante que hace que se manifieste el fenómeno. (8; 11; 12)

Los anticuerpos responsables de este cuadro son las IgE las cuales se unen con gran especificidad por su fracción cristalizante a receptores glicoproteínicos de las células cebadas y basófilos. (12)

La síntesis de IgE resulta de la colaboración entre el subtipo 2 de los linfocitos T cooperadores CD4⁺ y los linfocitos B. Los linfocitos Th2 proveen a los linfocitos B de IL-4 e IL-13 para inducir la expresión de un RNA mensajero utilizado en la síntesis de las IgE. Además de esta señal soluble, se requiere la interacción física de los linfocitos Th2 con la célula B a través del marcador de superficie CD154 con el CD40 expresado en el linfocito B. En contraste los linfocitos T cooperadores CD4⁺ tipo 1 que producen altas concentraciones de interferón gama, no producen IL-4, así que no contribuyen en la síntesis de IgE. (13)

La unión de un antígeno bivalente o multivalente a dos moléculas de IgE adyacentes determina la estimulación de las células cebadas o basófilos, que secretan las sustancias

preformadas acumuladas en sus gránulos y de mediadores lipídicos formados en el curso de la estimulación. Estas sustancias incluyen histamina, serotonina, SRS-A, bradicinina, factor de transformación plaquetario, prostaglandinas y factor quimiotáctico. (13)

Hipersensibilidad tipo II

Este tipo de hipersensibilidad se halla implicado en la patogenia de numerosas enfermedades auto-inmunitarias, donde los Ac son dirigidos contra Ag propios atacando o destruyendo diferentes tejidos. (9; 10)

Los mecanismos de lesión mediada por Ac requieren la cooperación de los leucocitos, estos se unen por sus receptores a la Fc de la IgG, que se encuentra en célula diana y producen la lisis celular sin fagocitosis; el proceso citolítico resulta de la acción lesiva sobre la membrana de la célula diana, ejercida por elementos moleculares presentes en los gránulos de secreción de diferentes células como; monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células NK cuando son liberados al espacio intercelular. Los gránulos presentan capacidad lítica frente a eritrocitos, y otras células manifestando su capacidad citotóxica. (14)

Reacciones dependiente del complemento: se puede producir lisis directa cuando los anticuerpos IgG o IgM reaccionan con el antígeno presente en la superficie celular y activan el complemento, o bien las células son marcadas por el anticuerpo para ser fagocitadas o lisadas a través de células. Muchos fármacos inducen este tipo de reacciones, provocando anticuerpos dirigidos contra el fármaco unido a receptores de superficie o sobre la membrana de las plaquetas. (15) En las reacciones de hipersensibilidad anti-receptor: los anticuerpos pudiendo alterar o modificar su función. Esta hipersensibilidad está involucrada en la patogenia de muchas enfermedades autoinmunes como la tiroiditis. (16)

Hipersensibilidad tipo III

Esta se lleva a cabo por la formación de inmuno-complejos, los cuales se forman por la unión del antígeno con el anticuerpo. (13)

La patogenicidad del inmuno-complejo dependerá en gran medida de sus características fisicoquímicas. Estos activan al complemento poniendo en marcha una secuencia de reacciones que llevan a la migración de células polimorfonucleares, la liberación de enzimas proteolítica lisosomales y factores de permeabilidad responsables de la inflamación. (16)

La unión de antígeno anticuerpo puede tener por consecuencia la formación de un amplio espectro de complejos inmunitarios según la proporción relativa de antígeno y de anticuerpo que actúan mutuamente. En la zona de exceso de anticuerpo, los complejos tienden a ser insolubles, pudiendo desencadenar una reacción de Arthus si se producen las condiciones adecuadas; en la zona de exceso de antígeno los complejos son mas solubles y tienen capacidad para liberar aminas vasoactivas y producir vasculitis. (12; 16)

Dado que cada antígeno tiene varios determinantes antigénicos y que cada anticuerpo tiene al menos 2 lugares de combinación se pueden formar distintos complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se agrupan en los siguientes tipos (15):

- Tipo I- son formados en excesos de antígeno (pequeños y solubles).
- Tipo II- son complejos de tamaño intermedio y poco soluble.
- Tipo III- son formados en exceso de anticuerpos (grandes e insolubles).

Además de la proporción de antígeno y de anticuerpo, el tamaño de los complejos inmunes está influenciado por:

- Fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo.
- Tamaño de la molécula de antígeno.
- Tipo de inmunoglobulina que forma el anticuerpo.
- El tamaño y la solubilidad de los complejos puede verse alterada por el complemento y el factor reumatoide.

Hipersensibilidad tipo IV

Este tipo de hipersensibilidad se caracteriza por que los signos y síntomas se manifiestan después de pasadas unas 24-48 horas del contacto con el alérgeno, es por esto que se le llama retardada.

En ella no intervienen las inmunoglobulinas, los responsables de este tipo de reacciones son los linfocitos T, macrófagos, citotóxicas y otras células. (15; 13; 16)

Al penetrar un antígeno capaz de poner en marcha una reacción de hipersensibilidad celular, es captado por los macrófagos que lo presentan a los linfocitos T. La respuesta de estos esta modulada por dos poblaciones de linfocitos T, los reguladores y los cooperadores Th1. En el caso de que se determine una respuesta, existe una transformación blástica de la que surgen dos poblaciones de linfocitos T efectores y de memoria. Estos últimos tienen una vida muy larga y guardarán el recuerdo del contacto. Los efectores están específicamente sensibilizados frente al antígeno y pueden dar lugar a dos fenómenos: un efecto citotóxico directo y secreción de citocinas. En el primer contacto, la respuesta suele tardar en aparecer un tiempo similar a la humoral, unos 7 días. En un contacto posterior, la respuesta es más rápida y surge entre 24 y 48 horas después del contacto.

Citotoxicidad celular: los linfocitos T citotóxicos se unen al antígeno para destruirlo. Este efecto se desarrolla cuando el antígeno es un constituyente de la célula o se ha fijado a ella. Para su destrucción, el linfocito T citotóxico y los antígenos de la célula deben ponerse en contacto por el MCH clase I y CD16; los linfocitos T citotóxicos destruyen las células diana a través de la liberación de los factores citotóxicos como la perforina y fragmentinas mediante el proceso de exocitosis de los gránulos donde se encuentran almacenados. La consecuencia es la muerte de la célula blanco por necrosis. Una vez conseguida la destrucción, el linfocito T inicia de nuevo su actividad. Este tipo de citotoxicidad no requiere la intervención de anticuerpos ni del complemento. Cuando en las reacciones de citotoxicidad celular intervienen los anticuerpos y las células NK, se habla de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. (17)




INMEDIATAS	TIPO DE REACCIÓN	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	Diagnóstico		
			"In vitro"	"In vivo"	
MEDIADAS POR ANTICUERPOS	 TIPO I. Mediadas por IgE, mastocitos/basófilos	LATENCIA: <1 hora - Urticaria - Angioedema - Rinitis - Broncoespasmo - Anafilaxia	- IgE específica - Triptasa seriada - TAB (T. de activación de basófilos)	- P. cutáneas (prick, IDR) - Prueba de exposición controlada (PEC)	
	 TIPO II. Lisis celular inducida por IgG o IgM	LATENCIA: desde días a meses - Anemia hemolítica - Trombopenia - Neutropenia	- Test de Coombs - Ac. frente a plaquetas - Ac. frente a neutrófilos	PEC CONTRAINDICADA	
	 TIPO III. Inmunocomplejos IgG y/o activación de complemento	LATENCIA: de días a meses (se acorta en reexposición) - Enf. del suero (2-21 días) - Vasculitis - Glomerulonefritis - Fiebre medicamentosa	- C3, C4, ANA, ANCA, función hepática y renal - Anatomía patológica	PEC CONTRAINDICADA	
TARDÍAS	MEDIADAS POR CÉLULAS T	TIPO IVa. Linfocitos Th1, síntesis de INF- γ , TNF- α , IL-18 con activación de macrófagos	LATENCIA: 7-21 días - Dermatitis de contacto	- TTL (test de transformación linfocitaria) - Estudios de citotoxicidad - Estudios de activación - Producción de citocinas	Pruebas de PARCHE
		TIPO IVb. Linfocitos Th2, con secreción de IL-4, IL-5, IL-13, y eosinofilia	LATENCIA: de 4-21 días - Exantemas maculopapulosos - S. de hipersensibilidad inducido por fármacos (DIHS/DRESS)		- Pruebas de PARCHE - Lectura tardía IDR - PEC CONTRAINDICADA (en DRESS)
		TIPO IVc. Mediadas por células T citotóxicas, eliminan las células tisulares o inducen su apoptosis	LATENCIA: 4-21 días - S. de Stevens-Johnson (SJS) y necrólisis epidérmica tóxica (TEN) - R. organoespecíficas: - Nefritis intersticial - Neumonitis - Hepatitis		- No se recomiendan pruebas de parche, ni lectura tardía de la IDR - PEC CONTRAINDICADA
		TIPO IVd. Inflamación neutrofílica, mediada por células T	LATENCIA: >3 días - Pustulosis exantemática aguda generalizada (AGEP)		- Pruebas de PARCHE - Lectura tardía IDR
OTRAS	Autoinmunidad inducida por fármacos	- Lupus - Pseudo-pénfigo - Dermatitis bullosa por IgA			
	Exantema fijo pigmentario				Pruebas de PARCHE (en el área afectada)
	Anafilaxia no mediada por IgE		Triptasa seriada TAB (T. de activación de basófilos)		

Figura 1.- Tipos de reacción de hipersensibilidad, características y método de diagnóstico (22)

2.3.-Alérgenos

Los alérgenos suelen ser proteínas solubles que funcionan como enzimas, estos frecuentemente tienen cadenas laterales de carbohidratos y son capaces de inducir la síntesis de anticuerpos del tipo IgE, y por tanto de sensibilizar a personas potencialmente alérgicas. Tras volver a exponerse al mismo antígeno, el paciente antes sensibilizado manifiesta los signos y síntomas de la alergia a medida que el alérgeno reacciona con los anticuerpos IgE situados en las células y estos generan los mediadores de la inflamación. Otras cualidades comunes entre los alérgenos son: un peso molecular bajo, elevada glicosilación y una gran solubilidad en líquidos corporales es que deberá tener al menos dos epitopos para la unión de la IgE y cada uno deberá tener mínimo 15 residuos para que la unión con el anticuerpo sea posible. (15; 16)

Los alérgenos pueden clasificarse de muchas maneras: según su vía de entrada al organismo como exógeno y endógeno. También pueden ser clasificados según su origen: pólenes, fúngico y animal. (15)

Los alérgenos responsables de las enfermedades respiratorias alérgicas, como el asma y la rinitis, son sobre todo aero-alérgenos. Estos pueden estar en el interior y en el exterior. Los alimentos y otras sustancias que se ingieren, incluidos los fármacos son importantes, en especial para las enfermedades digestivas y cutáneas alérgicas. Las sustancias que se tocan como cremas son responsables de la dermatitis por contacto. Además de los fármacos, en el grupo de sustancias que se inyectan se encuentran los venenos y la saliva de los insectos. (15; 16)

Los alérgenos más comunes en países occidentales son: Der p1 y Der p2 de los ácaros presentes en el polvo casero (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Fel d1 del gato, así como antígenos de árboles y pastos como Ph1 p1 y Ph1 p5 (*Phleumpratense*). (15) En 1967 se descubrió que el principal componente alergénico del polvo casero era un ácaro. Los ácaros del polvo domestico o de los colchones (*Dermatophygoides*), así como otras especies de ácaros, se encuentran en todo el mundo. *D. pteronyssinus* es más común en

Europa, junto con *Euroglyphus maynei*, *D. farinae*, que se encuentran en EE.UU. y Japón. (14). Estos ácaros se alimentan de epitelio humano o animal y de otros restos ricos en proteínas que se encuentran en el polvo del entorno humano. Las mayores concentraciones de ácaros se han encontrado en los colchones, las almohadas, las alfombras, el mobiliario tapizado y las bolsas de aspiradores. (16)

Los alérgenos de los ácaros provienen de 2 fuentes, del cuerpo del ácaro (Der-p2) y las heces de este (Der-p1). Las heces son una mezcla de escamas humanas parcialmente digeridas y enzimas proteolíticas. Las cuales cuando son excretadas y aerolizadas, entrando en contacto con las mucosas de los pacientes alérgicos e induciendo los síntomas de alergia. (16; 15)

Y es debido a la presencia de escamas humanas en las heces que existe la posibilidad de que los individuos alérgicos tengan una reacción de sensibilización tanto a las enzimas de los ácaros como a las escamas humanas. En estudios previos utilizando ensayos *in vitro* como ELISA, Western Blot y degranulación de basófilos se demostró que los pacientes alérgicos a los ácaros reaccionaron ante las propias escamas de piel humana. Se concluyó que un gran porcentaje de los pacientes alérgicos al ácaro del polvo presentan auto-reactividad contra las escamas, lo cual sugiere la participación de las mismas en inducir fenómenos de hipersensibilidad. (2)

2.4.-Procesamiento del antígeno

En general las proteínas son los únicos elementos capaces de generar una respuesta inmunitaria y para lograrlo requieren un procesamiento por las células auxiliares, seguido de la presentación en su membrana asociadas con moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC); lo anterior está determinado por la forma en que el antígeno ingresa a la célula. Así los antígenos exógenos entran a ella por fagocitosis, donde la célula presentadora del antígeno (macrófago, célula dendrítica y linfocito B) los degradan en fragmentos *peptídicos* mediante un procesamiento que se lleva a cabo por la vía endocítica. Dentro de esta vía se expresan moléculas de clase II, de tal modo que los

péptidos que se producen se unen a estas moléculas; este complejo se envía a la superficie celular donde las células T $CD4^+$. La expresión de las moléculas clase II del MHC se transfiere a las células que presentan el antígeno, por lo que la presentación de Ag exógenos se limita a estas células (18).

Por otra parte, el Ag endógeno se produce dentro de la célula del hospedador, como suele suceder en una infección viral o por el efecto de una transformación tumoral. Los péptidos se forman por degradación, y se enlazan en el retículo endoplasmático a moléculas de clase I del MHC, donde son transportados, a la membrana celular. En este caso los linfocitos $TCD8^+$ reconocen al antígeno vinculado con moléculas de clase I del MHC. Como es evidente, el origen del antígeno define el tipo de moléculas de MHC con las que se asocia, lo que restringe su reactividad con células $CD4$ o $CD8$. (18)

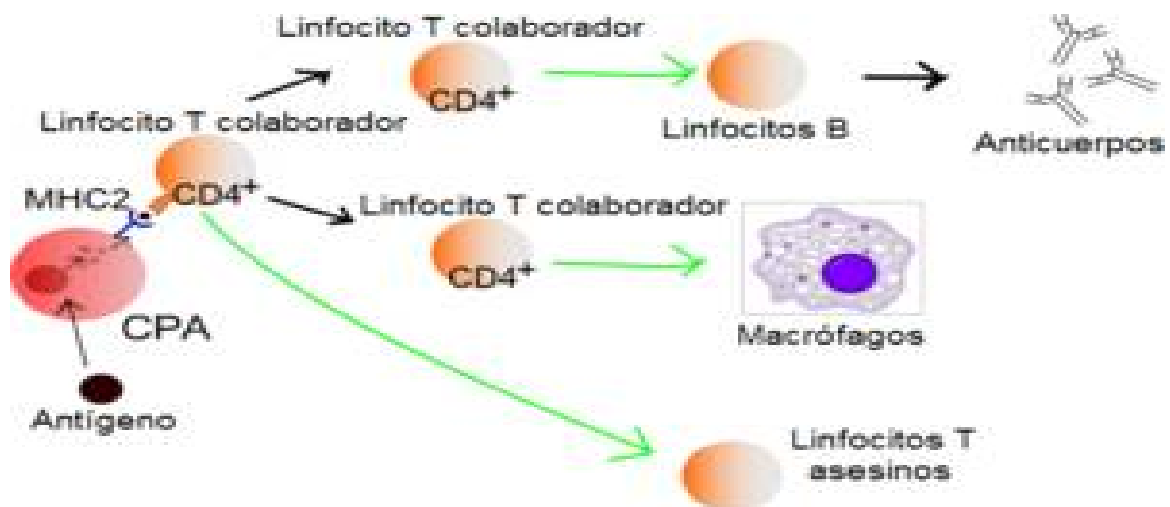


Figura 2.- Procesamiento de los antígenos y presentación a los linfocitos T

2.5.-Predisposición Genética y Epigenética

En el desarrollo de las enfermedades alérgicas influyen múltiples factores genéticos y ambientales. Los hijos de padres alérgicos tienen un riesgo mayor de sufrir una enfermedad alérgica. Si uno de esos padres es alérgico el riesgo es del 30%, si ambos lo son, se eleva a 50%. En gemelos idénticos el riesgo es del 70%. En familiares en primer

grado de consanguinidad es frecuente encontrar niveles altos de IgE, aun en individuos sanos. (7; 5)

Las enfermedades alérgicas hacen parte del grupo de "Enfermedades Complejas" ya que múltiples genes pueden participar en su desarrollo. Se han descrito genes de los cromosomas 1, 2, 5, 6, 7, 11,12 y 17 que confieren un riesgo o una protección para el desarrollo de estas enfermedades. Los genes más frecuentemente involucrados se pueden agrupar así (7):

1. Los que modulan la respuesta a la exposición a factores ambientales como el *CD14* y *TLR4*.
2. Los que controlan la integridad de las barreras corporales (piel, mucosas) como *FLG*, *AMCase* y *YKL-40* de especial importancia en la dermatitis atópica porque regulan la producción de quitinasa.
3. Los genes que regulan la respuesta inmunológica como *IL13*, *TLRa*, *STAT6*, *TBX21*, *HLAC*, *GATA3* e *IRAKM*.
4. Los que controlan la respuesta tisular como *ADAM32*, *POE40* y *COL29A1* que regulan la función de los fibroblastos la musculatura lisa y la producción de colágeno.

2.6.-Ácaros

Los ácaros son artrópodos que pertenecen a la clase *Arachnida*, de respiración aérea, sin antenas y con cuatro pares de patas. Pertenecen al orden *Acari*, es decir, son arácnidos de abdomen no segmentado y con el cuerpo formado por la fusión del cefalotórax y el abdomen. Solamente resalta la región portadora de las piezas bucales, denominada gnatosoma. Los adultos tienen cuatro pares de patas y dos pares de apéndices bucales: quelíceros y pedipalpos. En cambio, las larvas solo tienen sólo tres pares de patas. (19) Su alimentación consiste principalmente en escamas humanas o animales que encuentran en los colchones, sofás y alfombras. En cuanto a la vida media de los *Dermatophagoides* en cultivo varía en función de las condiciones ambientales, y la de las hembras supera a la de los machos. A 25 °C de temperatura y 80% de humedad relativa (HR), la vida media de

hembras de *D. pteronyssinus* es de 100-150 días frente a los 60-80 días de vida media de los machos. (19)

En 1928 se sugirió por primera vez el papel de los ácaros en la alergia al polvo por H. Dekker, tras encontrar un gran número de ácaros no identificados en el polvo doméstico, sobre todo en los colchones, y observar que los pacientes alérgicos tenían menos síntomas en un ambiente sin ácaros. (19)

La principal vía de exposición a los ácaros domésticos es a través de la inhalación de macropartículas (10 a 30 micras de diámetro) que pueden derivarse del cuerpo o de las heces de estos artrópodos, los cuales por su tamaño, permanecen poco tiempo suspendidas en el aire y se depositan preferiblemente en telas y colchones. Además de ser inhaladas, los alérgenos contenidos en estas partículas pueden causar reacciones de hipersensibilidad tipo IgE al entrar en contacto con la piel de individuos con dermatitis atópica. Otra forma de exposición a los alérgenos de ácaros es a través de la ingestión de sus proteínas presentes en alimentos contaminados (17; 20; 21)

La especie de ácaro responsable de la alergia que predomina en la mayoría de los países es *Dermatofagoides pteronyssinus*, mientras que *Dermatofagoides farinae* y *Euroglyphus maynei* pueden estar presentes en cantidades variables, según el clima. Las especies *Dermatofagoides pteronyssinus* y *Dermatofagoides farinae* suman más del 90% de los ácaros encontrados en muestras de polvo doméstico, y son la causa principal de alergia respiratoria. (19)

2.7.-Diagnóstico

El diagnóstico en alergia debe ser de certeza, sobre todo si se da un diagnóstico negativo. Los protocolos de diagnóstico suelen requerir una prueba de exposición controlada (PEC) y el grado de riesgo de ésta condiciona el protocolo diagnóstico. (22)

El diagnóstico se basa en cuatro pilares, la historia clínica, las pruebas *in vitro* e *in vivo*, y la prueba de exposición controlada, que es la prueba de referencia. (17; 22)

El diagnóstico, basado en la historia clínica, tiene limitaciones y, de hecho, en series largas de pacientes con sospecha de reacción inmediata a medicamentos, se produce respuesta en las pruebas de provocación en menos del 20%. (8; 23; 24)

Pruebas *in vivo*

En 1869 Charles H Blackely, enfermo de rinitis alérgica, se realizó una escarificación con polen, lo que le desencadenó una violenta reacción local en el brazo. Siendo esta la primera referencia respecto del diagnóstico causal más o menos sistematizado de las enfermedades alérgicas. (23)

Pruebas cutáneas alergológicas: estas constituyen un auxiliar importante en el estudio del paciente alérgico, pues ayudan a orientar sobre la posible etiología de su enfermedad. Estas pueden ser, intradérmicas, por punción o de parche. (16; 17)

Estas pruebas pueden llegar a ser peligrosas y la intensidad de la reacción cutánea es influida por numerosos factores, como la potencia de los extractos y la reactividad de la piel. El tamaño de la respuesta de la prueba cutánea, por lo tanto no será empleado como indicador de que tan alérgico es el paciente a dicho alérgeno en particular, aunque debe tomarse en cuenta en la evaluación de alguna reacción general en inmunoterapia (16; 17; 21).

Sistema de puntuación usado habitualmente para graduar la respuesta a las pruebas cutáneas de hipersensibilidad		
Grado	Habón	Eritema
0(-)	<3 mm	0-5 mm
1+	3-5 mm	0-10 mm
2+	5-10 mm	5-10 mm
3+	10-15 mm	>10 mm
4+	>15 mm o con pseudópodos	>20 mm

Figura 3.- Datos que muestran como se evalúa la respuesta alérgica en las pruebas cutáneas (22).

Intradermoabrazion: esta técnica se emplea para valorar diversas funciones cutáneas, para el diagnóstico de algunas enfermedades en las que la piel se encuentra afectada, para tratamiento de procesos alérgicos y para determinar la hipersensibilidad inmediata o retardada. (17; 25)

Para determinar la retardada por lo general la lectura se realiza a las 48 hrs. mediante una regla flexible que mide el diámetro transversal de la induración en milímetros. La aparición agregada de vesículas o necrosis debe interpretarse como una prueba positiva. (17; 24)

Prueba de *escarificación*: esta prueba es muy empleada en el servicio de otorrinolaringología, para el estudio de alergia de tipo respiratorio (rinitis alérgica). Tiene la ventaja de ser muy rápida (10 a 15 minutos), simple y poco costosa, además posee una alta especificidad y sensibilidad. (17)

Se introduce un extracto del alérgeno a estudiar en la dermis y se evalúa la respuesta mediada por IgE local, caracterizada por ser rápida y evidente a la inspección de la región (17; 24).

Prueba de parche: Se trata de una prueba epicutánea, usada básicamente para el estudio de los eczemas alérgicos de contacto. Pueden también utilizarse para el estudio de algunas reacciones a fármacos. (24; 17)

Consiste en la aplicación de una batería de sustancias (potencialmente responsables de la reacción alérgica) sobre la piel de la espalda en forma de parches durante 48 hrs. la primera lectura se realiza al retirar los parches y la segunda y definitiva a las 96 hrs. si existe una reacción a un alérgeno se evidencia la aparición de una zona roja (eritema), o incluso vesículas u ampollas. (17; 24)

Hay 2 tipos de baterías para pruebas de parche (*patch test*) estándar, formadas por las sustancias que dan lugar con mayor frecuencia a alergias de contacto y baterías específicas (metales, perfumes, tintes, entre otros) (17; 25).

Provocaciones: consiste en la administración de pequeñas cantidades del alérgeno por vía oral, dérmica, respiratoria u otras esperando la formación de lesiones como urticaria u otras. Su defecto es que suelen ser muy peligrosas para los pacientes. (24; 25)

Pruebas *in vitro*

Actualmente este tipo de técnicas que anteriormente fueron empleadas con el fin de aclarar los mecanismos de la inmunidad están siendo empleadas con fines de diagnóstico ya que le proporcionan tanto al médico como al paciente una opción menos agresiva y más segura que las pruebas *in vivo*. (25)

Cuantificación de IgE: la determinación de IgE es llevada a cabo por diversos métodos de inmunoanálisis y aunque en un principio se utilizaron solo las técnicas isotópicas de RIA, hoy en día la en la mayoría de los laboratorios se utiliza ELISA ya que cuenta con la ventaja de no requerir el uso de radioisótopos. (17)

RAST (radioalergosorbent test): actualmente es muy usado y que representa una alternativa a las pruebas cutáneas para determinar el alérgeno responsable de la alergia con una excelente reproducibilidad y una especificidad muy elevada, además es extremadamente sensible, comparada con las pruebas cutáneas. (17)

El RAST se recomienda cuando:

- ☛ No es posible suspender el uso de medicamentos como los antihistamínicos que pueden alterar los resultados de las pruebas cutáneas.
- ☛ La existencia de padecimientos en la piel como: eczema o dermatografismo.
- ☛ Se tiene una alta sensibilidad a los alérgenos sospechosos y cualquier estímulo puede provocar efectos peligrosos.

UniCAP: En esta técnica la fase sólida consiste en un polímero hidrofílico de superficie tridimensional, porosa y elástico de celulosa encapsulado en un soporte de plástico. Este soporte está activado con bromuro de cianógeno y tiene una capacidad de fijación tres veces mayor que la del RAST en celulosa a las mismas condiciones de reacción, incluyendo

un corto espacio de difusión, de tal manera que el punto de equilibrio puede alcanzarse en 20 minutos. El alérgeno siempre está en exceso, pegado a la celulosa. (17; 25)

Proliferación de linfocitos

Debido al importante papel que tienen los linfocitos T en la defensa del organismo, se han desarrollado pruebas inmunológicas que permiten evaluar su funcionalidad. La proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos es una de las pruebas más empleadas con este fin. Se basa en que ciertas lectinas, como la Concanavalina A, se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T, estimulando su proliferación policlonal. (3)

En la clínica, esta técnica constituye una herramienta para el diagnóstico de las inmunodeficiencias de tipo celular, tanto primarias como secundarias. En inmunología clínica experimental, resulta de gran utilidad para el estudio del efecto que los fármacos, productos biológicos (vacunas, inmunomoduladores) y agentes patógenos provocan sobre la respuesta inmune celular. (3)

En el caso del cultivo de linfocitos purificados por gradiente con revelado de proliferación por ensayo colorimétrico con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). La transformación del MTT (amarillo) a formazán (azul) será proporcional a la actividad celular. (3)

El índice de estimulación (IE) se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$IE. = \frac{\textit{Promedio de la Absorbancia de los cultivos estimulados}}{\textit{Promedio de la Absorbancia de los cultivos no estimulados}}$$

2.8.-Linfocito

Los linfocitos son un tipo de glóbulos blancos, una parte importante del sistema inmunológico. Son mucho más comunes en el sistema linfático que en la sangre y son el principal tipo de célula que se encuentra en la linfa representan aproximadamente el 30 % del total en la sangre periférica. Presentan un gran núcleo esférico que se tiñe de violeta-azul y de escaso citoplasma que contiene algunas mitocondrias, ribosomas libres y un pequeño aparato de Golgi. (26)

Los linfocitos son células circulantes del sistema inmunitario que reaccionan frente a materiales extraños y son las principales encargadas de la inmunidad específica o adquirida. (26)

Tienen receptores para antígenos específicos y, por tanto, pueden encargarse de la producción de anticuerpos y de la destrucción de células anormales.

Los tres tipos principales de linfocitos son los linfocitos T, los linfocitos B y las células asesinas naturales (NK). (26)

- Linfocitos T. Juegan un papel central en la inmunidad celular. Se las llama células T porque maduran en el timo, una glándula que se encuentra en el cuello. Hay varios subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta.
- Linfocitos B. Son principalmente responsables de la inmunidad humoral. Hacen que los anticuerpos que puedan unirse a los patógenos, bloquear la invasión de patógenos, activar el sistema del complemento, y aumentar la destrucción de patógenos. Se mantienen dentro de la médula ósea hasta que maduran. Una vez maduros, se extienden por todo el cuerpo y se concentran en el bazo y los ganglios linfáticos.
- Células asesinas naturales (NK). Las células NK son una parte del sistema inmune innato y juegan un papel importante en la defensa contra tumores y células infectadas de forma viral.

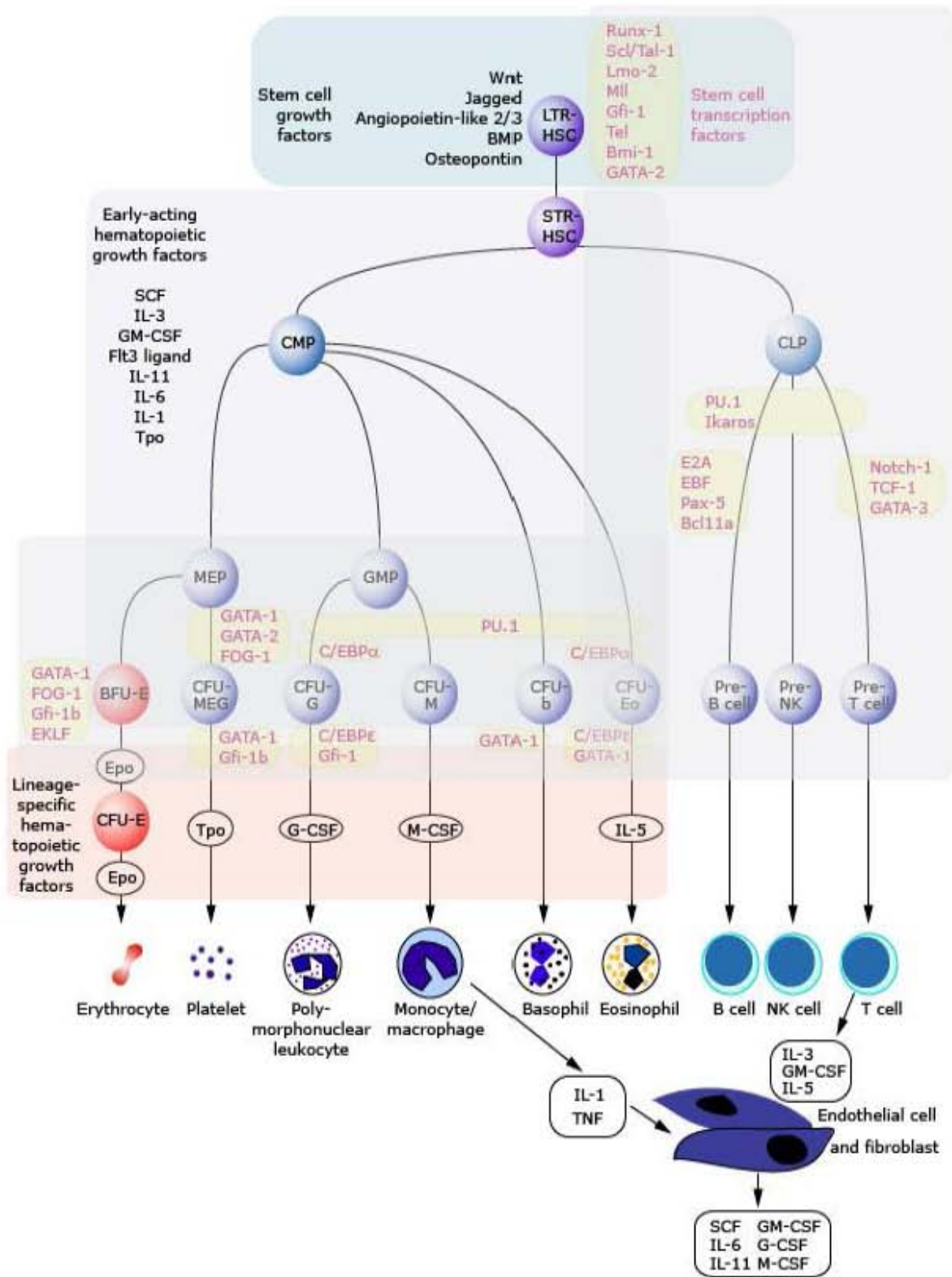


Figura 4.- Maduración de los linfocitos y las interleucinas que intervienen en este proceso. Imagen tomada de (26).

La activación de los linfocitos T se produce tras el reconocimiento por parte del TCR/CD3 de la molécula HLA y el péptido presentado por la misma este proceso de activación se hace más eficiente si los linfocitos reciben el estímulo de las citocinas mediante su unión a los receptores específicos presentes también en la membrana de estos linfocitos. (27)

Una vez activados los linfocitos T producirán citocinas o factores citotóxicos, según se trate de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. Los linfocitos T CD4⁺ colaborarán en la posterior activación de otras células, tales como NK, T CD8⁺, linfocitos B o macrófagos. A su vez los linfocitos T CD8⁺ tras su activación ejercerán su función citotóxica destruyendo células blanco. (27; 28)

En muchos casos la unión del antígeno con el TCR no es suficiente para dar lugar a una respuesta inmunológica eficaz. Para que esta respuesta se lleve a cabo se requiere la participación de una serie de moléculas conocidas globalmente como accesorias, y cuya función es precisamente la de contribuir al desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva facilitando la interacción entre las distintas células. Se forma así lo que se viene en denominar sinapsis entre linfocitos T y célula presentadora de antígeno. Las principales moléculas que están implicadas en este fenómeno de reconocimiento son el CD4, CD8, CD2, CD45 y CD28 y sus ligandos respectivos. (28; 29)

Las moléculas CD4 y CD8 son glicoproteínas cuyos ligandos naturales son las moléculas del MHC de clase II y de clase I respectivamente. La molécula CD4 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está formada por una sola cadena. La molécula CD8 pertenece también a la superfamilia de las Ig, pero su estructura difiere considerablemente de la anterior, al estar formada por dos cadenas homólogas, alfa y beta, que pueden formar heterodímeros o, en menor proporción, homodímeros (alfa/alfa). (29)

Estas moléculas juegan un papel esencial en la maduración de los linfocitos. El fenotipo CD4/CD8 de un linfocito T determina su función efectora. Así, mientras el CD4 se expresa en la mayoría de los linfocitos T cooperadores, la molécula CD8 se presenta, principalmente, en aquellos linfocitos T con función citotóxica. Es lógico que las células T con fenotipo CD8⁺ reconozcan antígenos en el contexto de moléculas MHC de clase I, ya

que éstas tienen una distribución tisular universal, pudiéndose realizar así la función citotóxica, reconocimiento y lisis, de cualquier célula del organismo que se encuentre infectada por virus o en un proceso tumoral. (27; 29)

Las moléculas CD2 junto con el CD11a/CD18 (LFA-1) son las moléculas de adhesión primaria que contribuyen a potenciar la afinidad de unión del linfocito T a la célula presentadora. Sus ligandos naturales que son el CD58 (LFA-3) y CD54 (ICAM-1) respectivamente, se expresan en la superficie de todas las células que realizan la función de APC. El CD2 es una glicoproteína presente en la superficie de timocitos y linfocitos T. Esta molécula es la primera molécula que se expresa en el linaje T durante su diferenciación. (27; 28)

El CD28 se expresa en todos los linfocitos CD4 y aproximadamente en el 50% de los linfocitos CD8, además de su papel en el proceso de adhesión, también participa en el mecanismo de transducción de señal y activación de la célula T ya que el CD28 induce la denominada segunda señal de activación celular. En ausencia de esta segunda señal, los linfocitos T pueden anergizarse. (28; 27)

3.-Planteamiento del Problema:

Los ácaros del polvo domestico tienen como fuente de alimentación principal a las escamas de piel humana y se ha sugerido en múltiples publicaciones la posibilidad de reacción autóloga contra escamas humanas. Esta investigación puede ayudar a entender la función de las escamas humanas en la patogenia de la alergia a los ácaros del polvo casero. La prueba de proliferación de linfocitos obtenidos de pacientes alérgicos al ácaro expondrá a escamas humanas a estas células, para conocer su reactividad a través de la proliferación y así determinar el papel de las escamas en la patogenia alérgica y evidencia de auto-reactividad.

4.-Justificación de la Investigación:

Las alergias afectan a un 20% de la población convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública, estando entre los 10 primeros lugares de morbilidad el asma y la rinitis alérgica. Se cuenta con 2 tipos de tratamiento para estos problemas, el farmacológico que sólo contrarresta o disminuye los síntomas y el inmunológico que disminuye la reactividad de los pacientes alérgicos ayudando a que los pacientes disminuyan su dependencia a los fármacos (1; 4; 17).

La hipersensibilidad hacia el ácaro del polvo casero es una de las más comunes y para ayudar a mejorar el tratamiento inmunológico y por lo tanto la calidad de vida de los pacientes, es importante determinar si las escamas humanas están jugando un papel como fuente de alérgenos. Debido a lo anterior se necesitan evidencias de la participación de las escamas humanas para inducir una reacción de hipersensibilidad.

En este estudio se realizará una prueba *in vitro* con el fin de determinar si las escamas humanas son capaces de inducir proliferación de sus propios linfocitos de individuos alérgicos a los ácaros, se realizará en un sistema *in vitro* para garantizar la seguridad de los pacientes.

5.-Hipótesis

La prueba *in vitro* de proliferación de linfocitos totales de sangre periférica de pacientes alérgicos al polvo casero al ser expuestos al antígeno de escamas humanas generará una respuesta de proliferación positiva (un IE mayor a 1.5).

6.-Objetivos de la Investigación

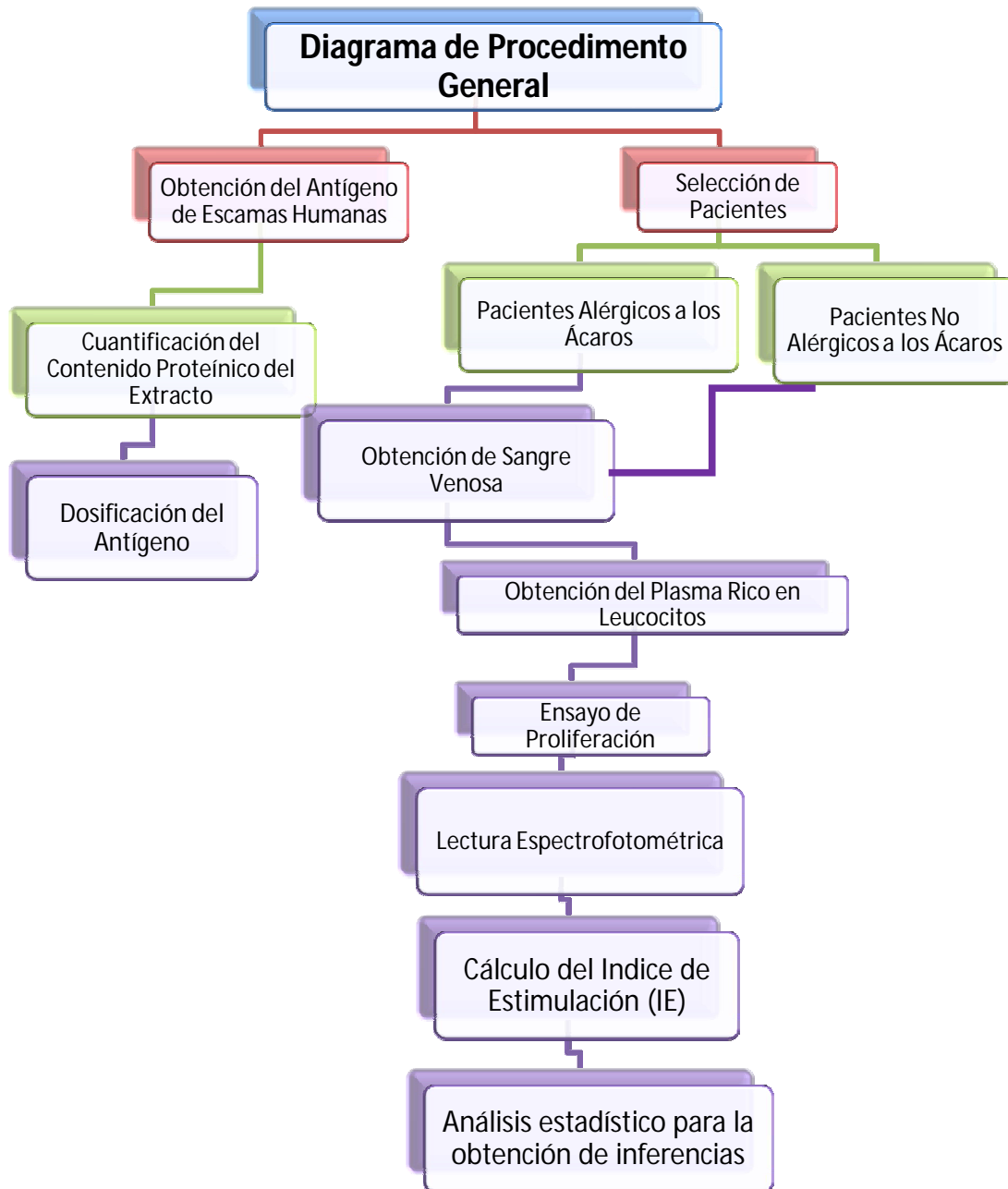
6.1 Objetivo general

Determinar mediante una prueba *in vitro* de proliferación de linfocitos totales de sangre periférica de pacientes alérgicos al ácaro de polvo casero si al ser expuestos al antígeno de escamas humanas se genera una respuesta de proliferación.

6.2.-Objetivos particulares

- Elaboración de un extracto acuoso de escamas humanas (18.76 µg/mL) en una solución amortiguadora de boratos y su conservación a -20°C hasta el momento de su uso.
- Seleccionar a los pacientes que presenten tres cruces o más en la prueba de escarificación a los ácaros *Dermatophagoides pteronysinus* y *Dermatophagoides fariane*.
- Obtención de una muestra de sangre venosa de los pacientes ya seleccionados, fraccionamiento de la sangre para la obtención de un plasma rico en leucocitos.
- Enfrentar las células obtenidas con el antígeno de escamas humanas.
- Determinar el índice de estimulación como medida del grado de reconocimiento hacia las escamas humanas.
- Calcular la frecuencia con la que se presenta la reactividad al ácaro del polvo casero en la población estudiada.
- Evaluar si esta reactividad es más común en hombres o en mujeres.

7.-Metodología



7.1.-Descripción de Procedimiento:

Obtención del antígeno de escamas humanas. Se colectaron escamas provenientes de diferentes individuos sanos (sin distinción de género o edad) por medio del raspado de talones y espalda. Estas escamas se adicionaron a una solución amortiguadora de boratos pH 8.4 y se dejó en agitación durante 24 horas a una temperatura de -4°C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 1918 g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en una membrana de diálisis para su concentración por la técnica de aireación en refrigeración por tres días. Una vez que el volumen fue concentrado a una cuarta parte del volumen original fue realizada una diálisis de una hora en agua destilada. De manera adicional se le realizó al extracto una cuantificación de proteínas medido por la técnica de Lowry modificado (17).

Selección de los pacientes. Se realizó una selección de los pacientes alérgicos al ácaro del polvo casero, con la ayuda de la técnica de escarificación y que hayan presentado una reactividad de tres o más cruces de acuerdo a los controles positivos aplicados. Dicho procedimiento se realizó por el área de Alergia e Inmunología del Hospital Juárez de México SS. A cargo de la Doctora María Isabel Rojo Gutiérrez.

Fraccionamiento de la sangre venosa. Mediante la punción de la vena basílica del brazo izquierdo se obtuvo un volumen de 10 mL de sangre venosa. La cual se dejó incubar a 37°C entre 45-60 minutos para obtener la sedimentación de la serie roja y se colectó el plasma rico en leucocitos mediante el aspirado con pipeta Pasteur. El plasma colectado fue transferido a otro tubo de ensaye y con el fin de eliminar a los glóbulos rojos contaminantes se agregaron 5 mL de agua des-ionizada durante 30 seg. y se reconstituyó con 5 mL de solución Alsever 2X. Después de esto se centrifugó a 352 g por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavo el paquete con solución salina balanceada de Hank y se centrifugó nuevamente a 352 g por 10 min y se resuspendió en una solución de Alsever 1X para una última centrifugación a 235 g durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante y re suspendiendo la pastilla en 1 mL de solución salina fisiológica. Se tomó una alícuota de dicha suspensión y se calculó el número de células por ml con ayuda de una cámara de

Neubauer y se realizó un ajuste de concentración por dilución para llegar a un número de 4×10^6 cel/mL.

Extracto de alérgenos de ácaros de polvo casero y Candidina: Donados por el laboratorio de Inmunoalergia y Micología Médica del Hospital Juárez de México a cargo del QFB Misael González Ibarra.

Ensayo de proliferación. Utilizando una placa de ELISA de 96 pozos fondo plano y de alta unión marca **COSTAR corporation, USA, placa para E.I.A/R.I.A.** se prepararon los siguientes sistemas por triplicado para cada paciente: (véase tabla 1).

	Pozo sin estimular (testigo negativo)	Pozo con Candidina (testigo positivo)	Pozo con Ag de Acaro (sistema homólogo)	Pozo con Ag de escamas de piel humana (sistema heterólogo)
Medio Mínimo Esencial (MEM) enriquecido con suero humano total	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
Suspensión celular (4×10^6 cel/mL)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Solución Salina Fisiológica (SSF)	20µL	-----	-----	-----
Candidina (0.001g/mL)	-----	20µL	-----	-----
Ag de ácaro (0.001g/mL)	-----	-----	20µL	-----
Ag de escamas humanas (18.76 µg/mL)	-----	-----	-----	20µL

Tabla 1.- la preparación de los sistemas testigo negativo, testigo positivo, sistema homólogo y sistema heterólogo.

Los sistemas anteriores de dejaron incubar durante 72 horas a 37°C en una estufa con CO₂ al 5%, 4 horas antes de terminar la incubación se agregaron 20 µL de una solución de 5mg/mL de cloruro de-2, 3,5 trifeniltetrazolio (TTC) a cada sistema y se dejó terminar el tiempo de incubación de 72 horas. Al término del periodo de incubación se retiraron 100µL de sobrenadante a cada sistema y se les adicionaron 150 µL de iso-propanol, ensayo 99% (JTBACKER), para disolver el precipitado. Posteriormente se transfirieron a tubos Eppendorf de 500 µL para su centrifugación a 479 g durante 5 minutos en una micro centrífuga **mini spin Eppendorf AG Hamburg**. Finalmente se tomaron 100 µL del sobrenadante y se colocaron en una placa de ELISA de 96 posos fondo plano y de alta unión marca **COSTARcorporation, USA, placa para E.I.A/R.I.A.** (no. de catálogo 3590) para hacer su lectura en el lector de placas de ELISA **EON BIOTEK Instruments USA** a una longitud de onda de 570 nm.

El cálculo del índice de estimulación se realizó tanto para el sistema homólogo como para el heterólogo mediante la siguiente fórmula:

$$I.E = \frac{\textit{Promedio de la Absorbancia de los cultivos estimulados}}{\textit{Promedio de la Absorbancia de los cultivos no estimulados}}$$

Se considera como positivo un IE igual o mayor a 1.5. (3)

Manejo estadístico de los datos: Los resultados obtenidos de estas técnicas se registraron en una hoja de datos (ver carpeta de anexos), que se mantendrá en 2 áreas; con un original y un respaldo.

Los resultados se analizaron por estadística descriptiva y posteriormente por pruebas de correlación para variables no paramétricas, con ayuda del programa estadístico **SPSS versión 12**.

8.-Resultados

Se obtuvo un extracto acuoso de escamas humanas por medio de la técnica anteriormente mencionada y se calculó la concentración de proteínas a una concentración de 18.76 µg/mL posteriormente con el antígeno ya cuantificado se procedió a dosificarlo en el ensayo de proliferación y se utilizaron varias volúmenes desde los 10 µL hasta los 100µL. Al final se seleccionó el volumen de 20 µL de la solución del antígeno, siendo la concentración final del mismo de 1.70 µg/mL. Se partió de una concentración de células de 4×10^6 células/mL y se agregaron 50 µL de la misma a cada pozo quedando una concentración celular de 909.0 células/pozo. Después de la incubación de 68 horas se agregó el TTC y se dejó incubando 4 horas más para dar un total de 72 horas y posteriormente se tomó el sobrenadante y se adiciono iso-propanol. Después se procedió a centrifugar para rescatar el sobrenadante con el cual se realizó la lectura a una longitud de onda de 570 nm en un lector de ELISA. Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica (Ver tabla 2 y figura 5).

Tabla 2.-Absorbancias de los pacientes alérgicos para los sistemas (negativos, positivo, homólogo y heterólogo).

No. de paciente	Negativo	Candidina abs. (positivo)	Ag de Ácaro abs.	Escamas de piel humana abs.
1	0.751	1.29	0.852	0.779
2	1.02	1.635	1.43	1.193
3	0.307	0.998	0.673	0.723
4	0.145	0.297	0.166	0.141
5	0.569	1.913	0.984	0.698
6	0.243	1.269	0.365	1.155
7	0.351	1.197	0.654	0.361
8	0.807	1.727	3.643	1.297
9	0.855	2.661	2.413	2.339
10	0.326	2.572	2.276	1.895
11	0.438	1.989	1.702	1.513
12	0.817	1.927	2.463	1.297
13	0.544	1.914	2.002	1.625

14	0.746	1.494	1.34	1.301
15	1.587	3.058	2.652	2.018
16	1.663	2.614	1.805	1.825
17	0.606	2.258	1.927	1.779
18	1.188	2.019	1.723	1.522
19	0.471	1.737	1.885	1.708
20	1.663	2.615	1.805	1.825
21	0.275	2.542	1.895	2.263
22	1.135	3.365	2.607	2.179
23	0.546	1.025	0.901	0.721
24	0.789	1.58	1.38	0.895
25	1.277	3.415	2.629	2.109
26	0.739	2.097	1.18	1.063
27	0.326	2.572	2.276	1.895
28	0.872	1.676	1.185	1.154
29	0.826	1.759	0.782	1.42
30	0.532	1.801	1.36	1.187
31	0.714	1.904	1.714	1.012
32	0.449	2.15	1.704	1.45
33	1.053	1.848	1.697	1.492
34	1.241	1.986	1.709	1.582
35	0.772	2.043	1.799	1.533
36	1.172	1.817	1.683	1.655
37	0.831	1.32	1.128	1.04
38	1.025	2.403	1.457	1.366
39	1.248	2.446	1.689	1.405
40	0.684	1.35	1.225	1.164
41	0.657	1.508	1.332	1.206
42	0.979	1.739	1.545	1.383
43	0.252	1.552	1.126	1.037
44	0.25	1.632	1.136	1.024
45	0.375	3.623	1.563	1.434
46	0.672	2.084	1.242	0.993
47	0.971	1.792	1.243	1.045
48	0.838	2.623	1.374	1.147
49	0.863	2.324	1.503	1.329
50	0.824	1.488	1.221	1.059
51	0.972	1.569	1.482	1.234
52	0.564	1.367	1.1	0.693
53	0.934	1.435	1.325	1.094

54	0.45	1.806	1.246	1.043
55	1.046	3.16	2.269	1.354
56	0.848	1.928	1.664	1.301
57	0.854	1.669	1.383	1.147
58	0.281	1.831	1.679	1.236
59	0.934	2.319	1.942	1.31
60	0.785	2.287	1.893	1.66
61	0.823	2.826	1.91	1.176
62	0.776	2.706	1.714	1.032
63	0.783	2.541	1.865	1.112
64	0.983	2.175	2.003	1.91
65	0.661	1.25	1.143	1.028
66	0.867	1.48	1.404	1.304
67	0.794	2.061	1.87	1.376
68	1.159	2.482	2.438	2.377
69	1.106	0.187	0.123	0.114
70	0.07	0.208	0.11	0.104
71	0.112	0.22	0.156	0.139
72	0.11	0.352	0.374	0.128
73	0.287	0.474	0.81	0.45
74	0.25	0.413	0.288	0.255
75	0.077	0.277	0.153	0.132
76	0.058	0.147	0.127	0.11
77	0.096	0.226	0.205	0.139
78	0.076	0.155	0.1	0.108
79	0.176	0.478	0.352	0.348
80	0.158	0.784	0.579	0.463
81	0.506	0.981	0.6	0.58

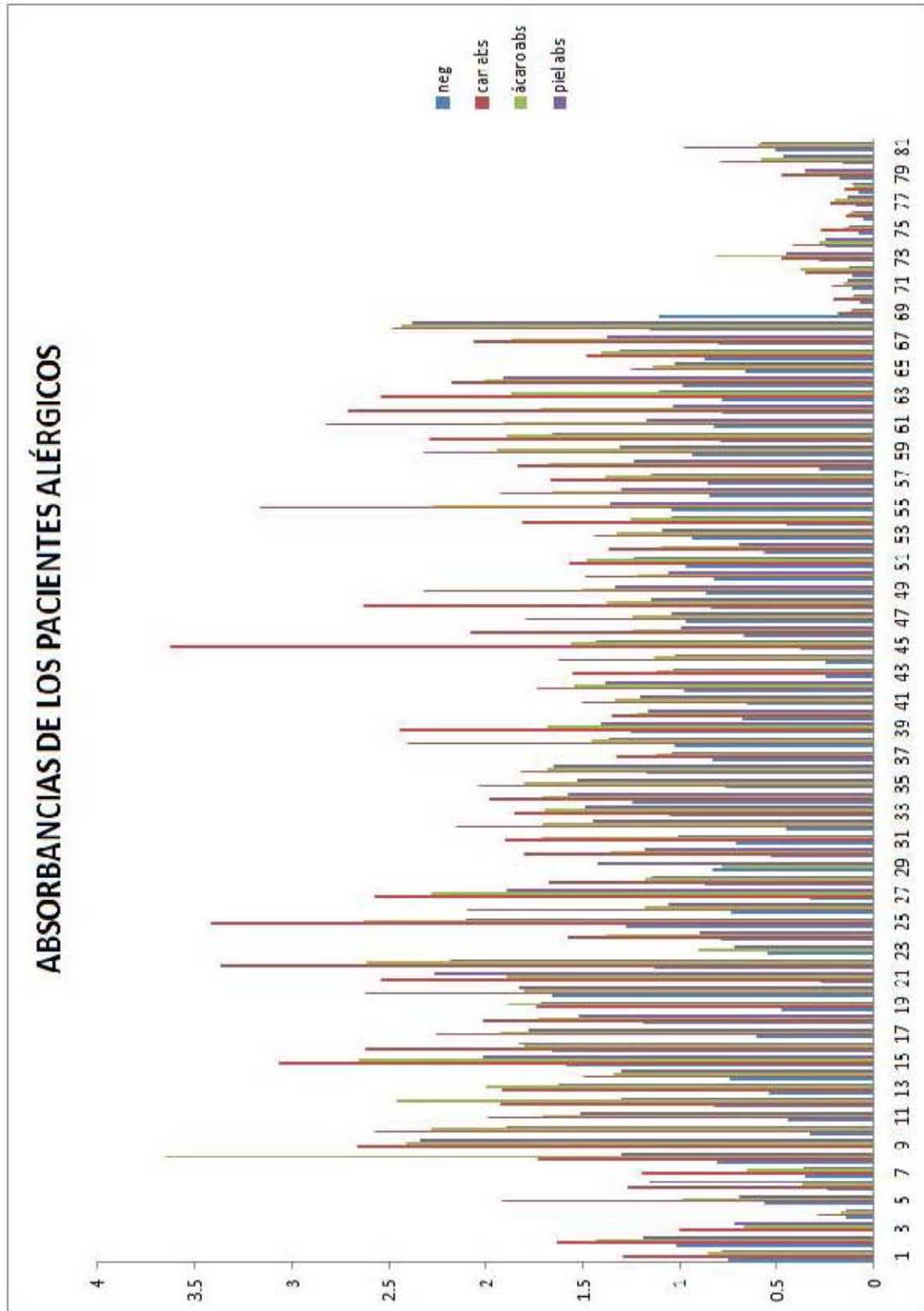


Figura 5.- Absorbancias medidas por espectrofotometría de suero de pacientes alérgicos al ácaro.

Con el propósito de interpretar los resultados se calculo el índice de estimulación el cual nos indicara cuanta veces más proliferación existe entre el sistema de prueba con respecto al sistema testigo en donde no se adiciona antígeno, el cual es un valor del aumento del número de células que se obtiene como producto de la interacción con el antígeno. También nos sirve para interpretar la prueba debido a que el valor de corte se sugiere que sea con un índice mayor a 1.5 y de esta manera se clasificaron los resultados para cada paciente en positivos y negativos según sea el caso. (Vea tabla 3 y figura 6).

Tabla 3,-Índice de estimulación de los pacientes alérgicos.			
No. de paciente	I.E Candidina	I.E Ag de ácaros	I.E Ag de escamas humanas
1	1.717	1.828	1.037
2	1.603	1.402	1.169
3	3.251	2.192	2.355
4	2.048	1.145	0.972
5	3.362	1.729	1.227
6	5.222	1.502	0.638
7	3.41	1.863	0.972
8	2.14	4.514	1.607
9	3.112	2.822	2.736
10	7.89	6.981	5.813
11	4.541	3.886	3.454
12	3.359	3.014	1.587
13	3.518	3.68	2.987
14	2.002	1.796	1.744
15	1.927	1.671	1.271
16	1.572	1.085	1.097
17	3.726	3.179	2.935
18	1.699	1.45	1.281
19	3.688	4.002	3.626
20	1.572	1.085	1.097
21	9.244	6.891	8.229
22	2.965	2.297	1.92
23	1.879	1.65	1.321
24	2.003	1.75	1.135
25	2.674	2.059	1.651
26	2.838	1.593	1.438
27	7.889	6.981	5.813
28	1.922	1.359	1.323
29	2.129	0.947	1.719
30	3.385	2.556	2.232
31	2.667	2.4	1.417
32	4.788	3.795	3.229
33	1.755	1.611	1.417
34	1.6	1.377	1.275
35	2.646	2.33	1.986

36	1.55	1.436	1.412
37	1.588	1.357	1.251
38	2.344	1.421	1.333
39	1.959	1.353	1.126
40	1.974	1.791	1.702
41	2.295	2.027	1.836
42	1.776	1.578	1.413
43	6.159	4.468	4.115
44	6.528	4.544	4.096
45	9.661	4.169	3.824
46	3.101	1.848	1.478
47	1.845	1.28	1.076
48	3.131	1.639	1.369
49	2.693	1.741	1.539
50	1.806	1.482	1.285
51	1.614	1.525	1.269
52	2.424	1.95	1.229
53	1.536	1.419	1.171
54	4.013	2.769	2.318
55	3.021	2.169	1.294
56	2.273	1.962	1.534
57	1.954	1.619	1.343
58	6.516	5.975	4.398
59	2.483	1.814	1.224
60	2.913	2.412	2.115
61	3.434	2.321	1.429
62	3.487	2.209	1.329
63	3.245	2.382	1.43
64	2.213	2.037	1.943
65	1.891	1.729	1.555
66	1.707	1.619	1.504
67	2.596	2.355	1.733
68	2.141	2.103	2.051
69	1.764	1.16	1.075
70	2.971	1.571	1.486
71	1.964	1.393	1.241
72	3.2	3.4	1.164
73	1.651	2.822	1.568
74	1.724	1.152	1.02
75	3.597	1.987	1.714
76	2.534	2.189	1.896
77	2.354	2.135	1.448
78	2.039	1.316	1.421
79	2.716	2	1.977
80	4.968	3.664	2.93
81	1.939	1.186	1.146
Promedio	3.000	2.332	1.920
S	1.719	1.326	1.238

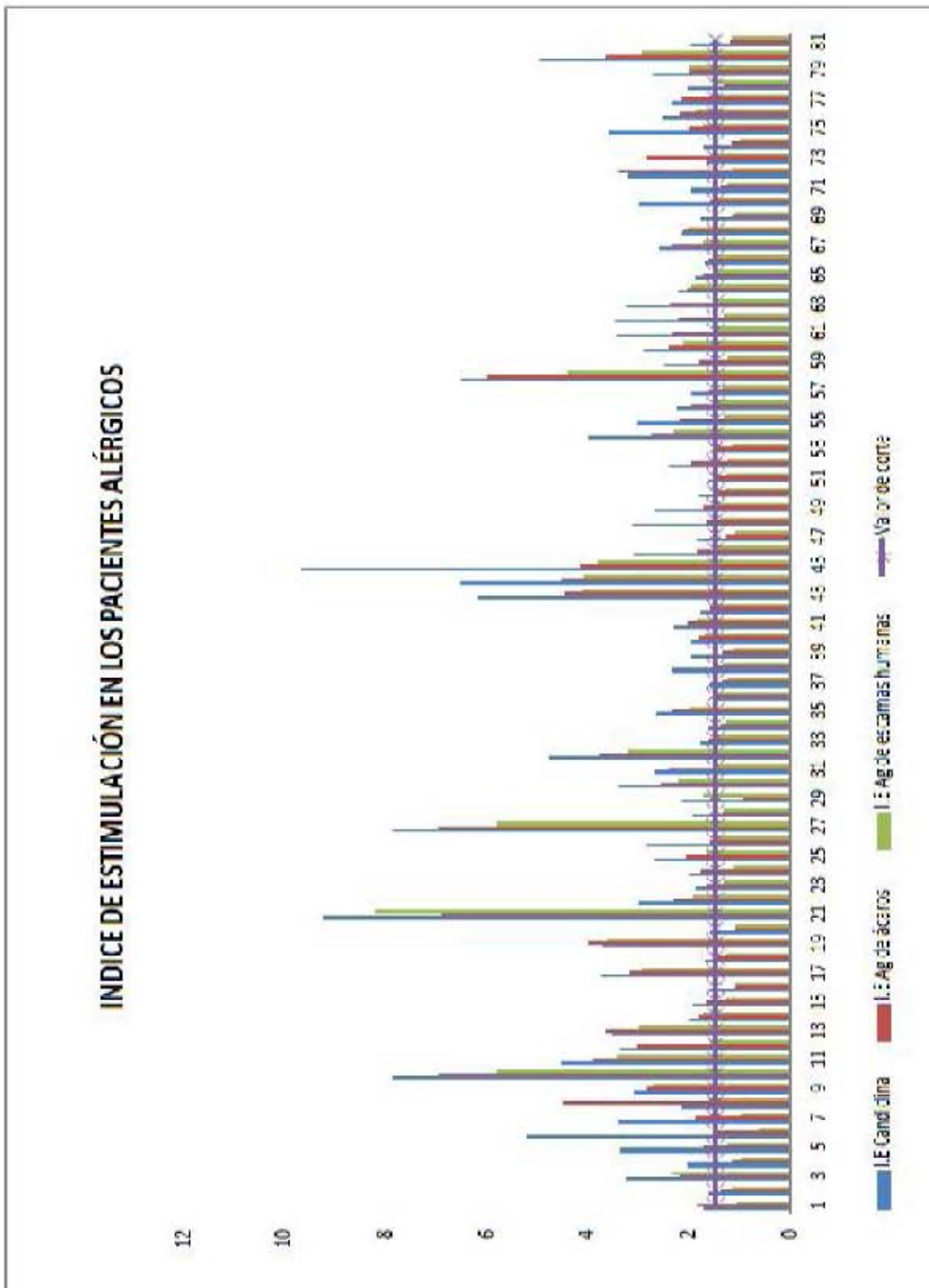


Figura 6.- índices de estimulación calculados a través de datos de absorbancia obtenidos de suero de pacientes alérgicos al ácaro.

Posteriormente con los datos obtenidos se procedió a realizar el cálculo del coeficiente de correlación del índice de estimulación del Ag de ácaros y el Ag de escamas humanas con el fin de apreciar el comportamiento de uno con respecto al otro el cual es altamente significativo con una $p \leq 0.0001$ (*Pearson, Kendall y Spearman test*) (Véase figura 7 y Tabla 4).

Correlaciones			IE(piel)	IE(acaro)
IE(piel)	Correlación de Pearson		1	.911**
	Sig. (bilateral)			.000
	N		81	81
IE(acaro)	Correlación de Pearson		.911**	1
	Sig. (bilateral)		.000	
	N		81	81

Correlaciones			IE(piel)	IE(acaro)
Tau_b de Kendall	Coeficiente de correlación		1.000	.639**
	IE(piel) Sig. (bilateral)		.	.000
	N		81	81
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación		.639**	1.000
	IE(acaro) Sig. (bilateral)		.000	.
	N		81	81
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación		1.000	.793**
	IE(piel) Sig. (bilateral)		.	.000
	N		81	81
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación		.793**	1.000
	IE(acaro) Sig. (bilateral)		.000	.
	N		81	81

Tabla 4.-Coeficientes de correlación de Pearson, Kendall y Spearman entre los índices de estimulación (IE) de los sistemas heterólogo y homólogo, en suero de pacientes reactivos al acaro.

****.** La correlación es altamente significativa con $p \leq 0.0001$

Coeficiente de correlación entre el IE de los sistemas heterólogo y homólogo

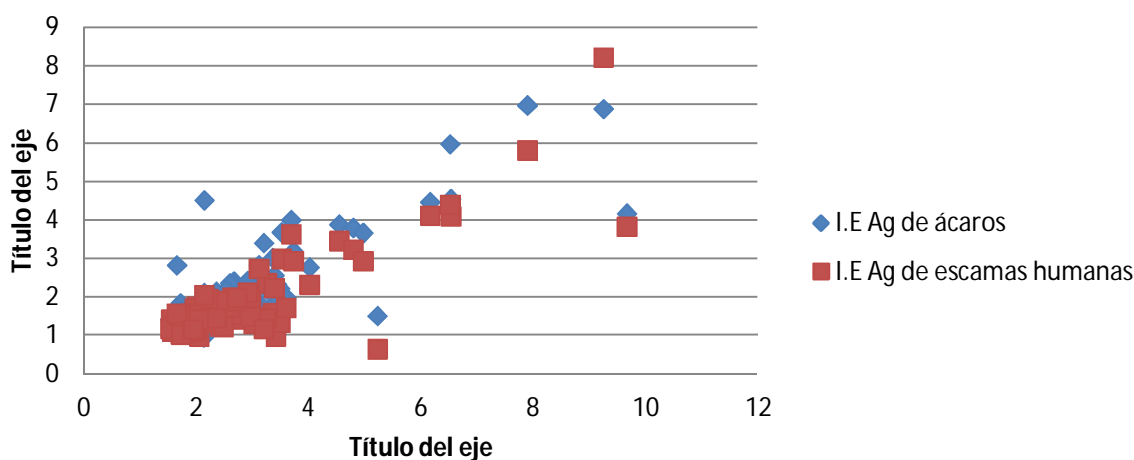


Figura 7.- Coeficientes de correlación entre los índices de estimulación (IE) de los sistemas heterólogo y homólogo

Para los 20 controles negativos (pacientes sanos) se calculó de igual manera el índice de estimulación, con el fin de determinar cuántas veces más proliferación existe entre el sistema de prueba con respecto al sistema testigo en estos pacientes sin la patología. (Vea tabla 5 y figura 8)

Tabla 5.- Índice de Estimulación (IE) de los pacientes no

No. de paciente	I.E cándida	I.E ácaro	I.E piel
1	4.262	1.404	1.222
2	2.212	1.322	1.197
3	1.944	0.814	0.74
4	2.589	1.127	1.274
5	2.95	1.471	1.239
6	2.619	1.099	1.041
7	1.559	1.125	1.027
8	4.726	1.111	1.059
9	1.569	1.098	1.078
10	1.533	1.078	1.333
11	2.396	1.291	1.304
12	3.158	1.158	1.475
13	2.212	1.225	1.234
14	4.885	1.385	1.307
15	2.683	1.133	1.016

16	4.783	1.358	1.045
17	2.302	1.146	1.031
18	3.082	1.109	1.06
19	2.864	1.017	1.051
20	2.619	1.31	1.021
Promedio	2.847	1.189	1.1377

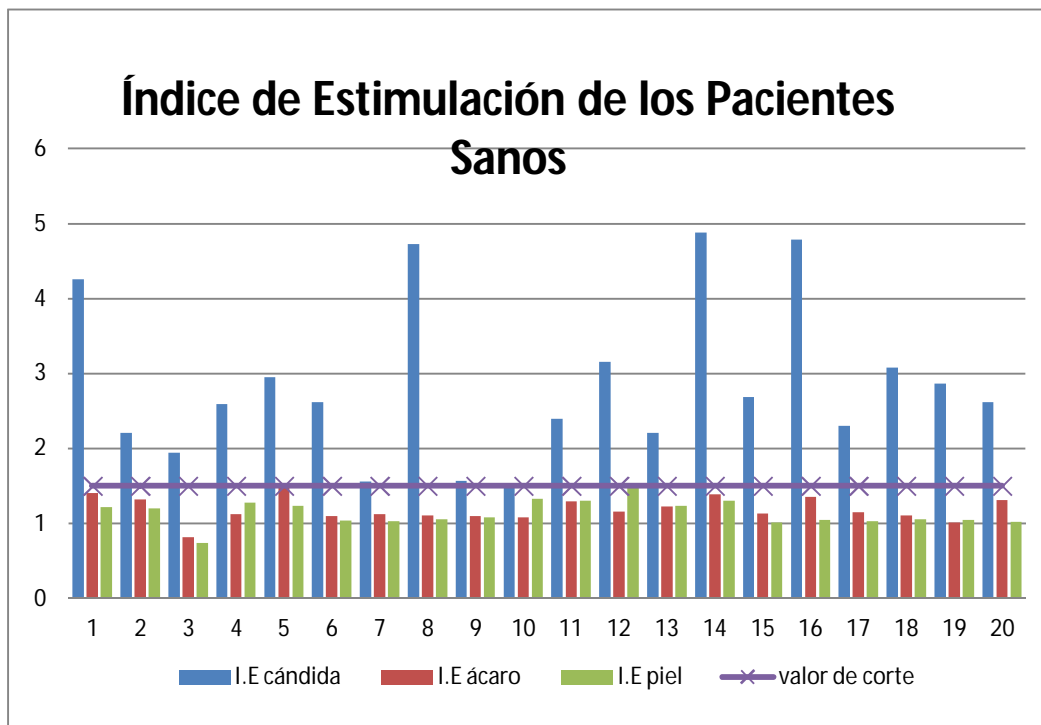


Figura 8.-Índice de estimulación obtenido a través de las absorbancias del suero de pacientes no alérgicos. Donde IE cándida es índice de estimulación usado como control positivo. IE ácaro es el sistema estimulado con antígenos de acaro, IE piel es el sistema estimulado con escamas de piel

Al igual que en el caso de los pacientes alérgicos se procedió a realizar el cálculo del coeficiente de correlación del índice de estimulación del Ag de ácaros y el Ag de escamas humanas en pacientes no alérgicos, con el fin de apreciar el comportamiento de uno con respecto al otro. En este caso encontramos prueba de Pearson con una leve significancia y las pruebas de Kendall y Spearman no existe esta correlación (Tablas 6 y 7).

Correlaciones

		IE(piel)	IE acaro
IE(piel)	Correlación de Pearson	1	.557*
	Sig. (bilateral)		.013
	N	20	20
IE acaro	Correlación de Pearson	.557*	1
	Sig. (bilateral)	.013	
	N	20	20

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 6.-Coeficientes de correlación de Pearson entre los índices de estimulación (IE) de los sistemas heterólogos y homólogo, en suero de pacientes no reactivos al ácaro

Correlaciones

		IE(piel)	IE acaro
Tau_b de Kendall	Coeficiente de correlación	1.000	.251
	IE(piel) Sig. (bilateral)	.	.132
	N	20	20
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	.251	1.000
	IE acaro Sig. (bilateral)	.132	.
	N	20	20
IE(piel)	Coeficiente de correlación	1.000	.386
	Sig. (bilateral)	.	.103
	N	20	20
IE acaro	Coeficiente de correlación	.386	1.000
	Sig. (bilateral)	.103	.
	N	20	20

Tabla 7.-Coeficientes de correlación de Kendall y Spearman entre los índices de estimulación (IE) de los sistemas herpetólogos y homólogo de pacientes no reactivos al acaro.

****.** La correlación es altamente significativa con $p \leq 0.0001$

Con el fin de determinar si la alergia al ácaro del polvo es más común en hombres o mujeres se realizó un análisis descriptivo de frecuencias obteniendo la prevalencia por sexo (Figura 9).

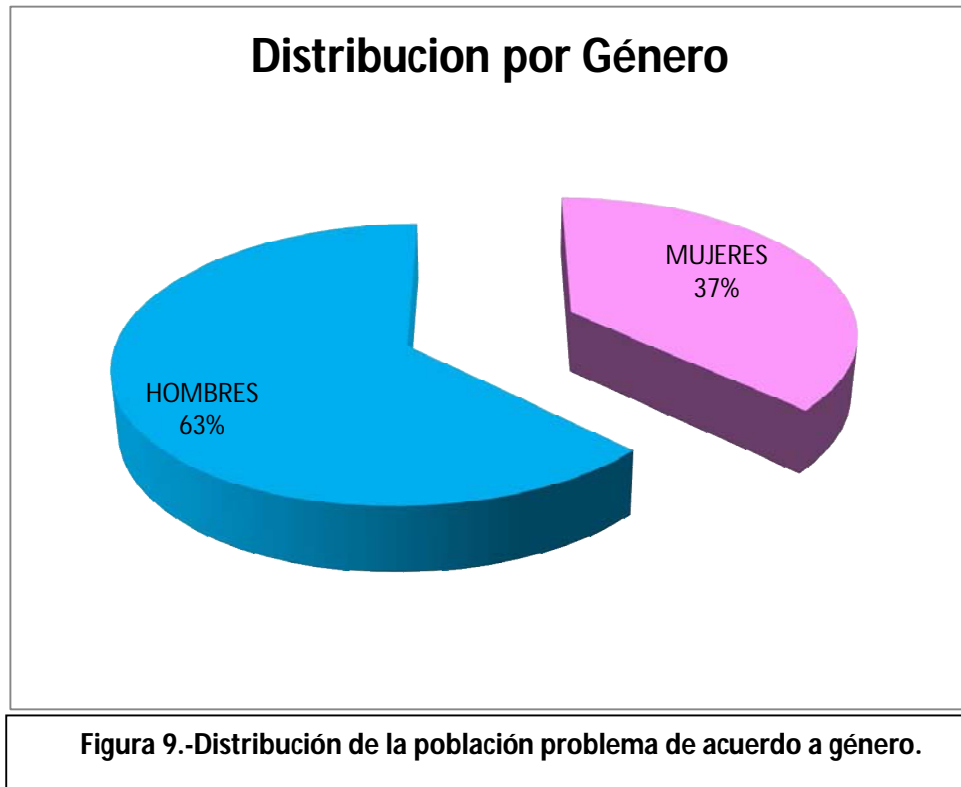


Figura 9.-Distribución de la población problema de acuerdo a género.

Tras calcular el índice de estimulación con el fin de saber cuántos de los pacientes en el estudio presentaron una respuesta positiva al ser estimulados con el antígeno de ácaros, comparándolos con los positivos a escamas humanas y los positivos (todos) al acaro del polvo doméstico por prueba cutánea considerada como la prueba de oro o referencia se procedió a realizar el siguiente grafico. (figura 10)

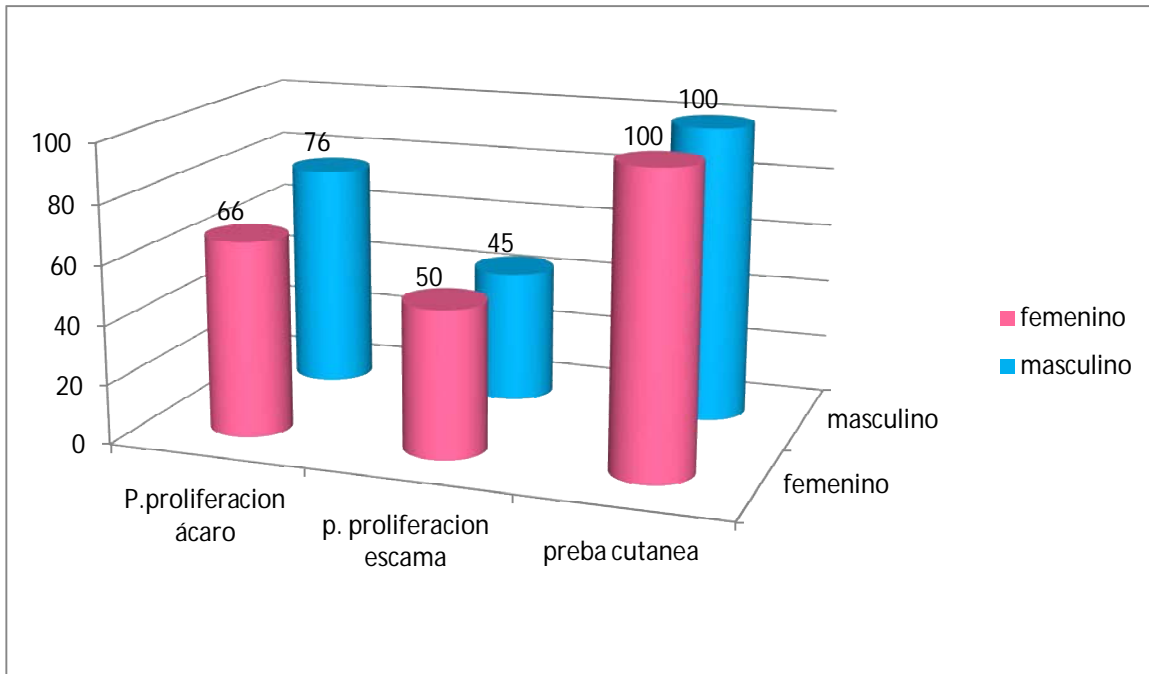


Figura 10.-Gráfico comparativo entre la distribución de positividad en porcentaje (%) de acuerdo al género. Comparando prueba cutánea (todos positivos), prueba de proliferación a escamas humanas y prueba de proliferación al acaro.

Adicionalmente se realizó el cálculo del grado de Sensibilidad y Especificidad de la prueba de proliferación de linfocitos para el sistema homólogo de Ag de ácaros.

Tabla 8.-Datos para el cálculo de Sensibilidad y Especificidad de la prueba de proliferación de linfocitos para el sistema homólogo de Ag de ácaros.

Sistema	Prueba positiva	Prueba negativa
Verdaderos positivos (n=81)	59	22
Verdaderos negativos (n=20)	0	20

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{59}{59 + 22} \times 100 = 72.839$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{20}{20 + 0} \times 100 = 100$$

Análisis demográfico

Durante la entrevista de reclutamiento para el estudio se preguntó la edad de los pacientes la finalidad de conocer el rango de edades en las que se presenta un aumento en la incidencia de alergias (Figura 11).

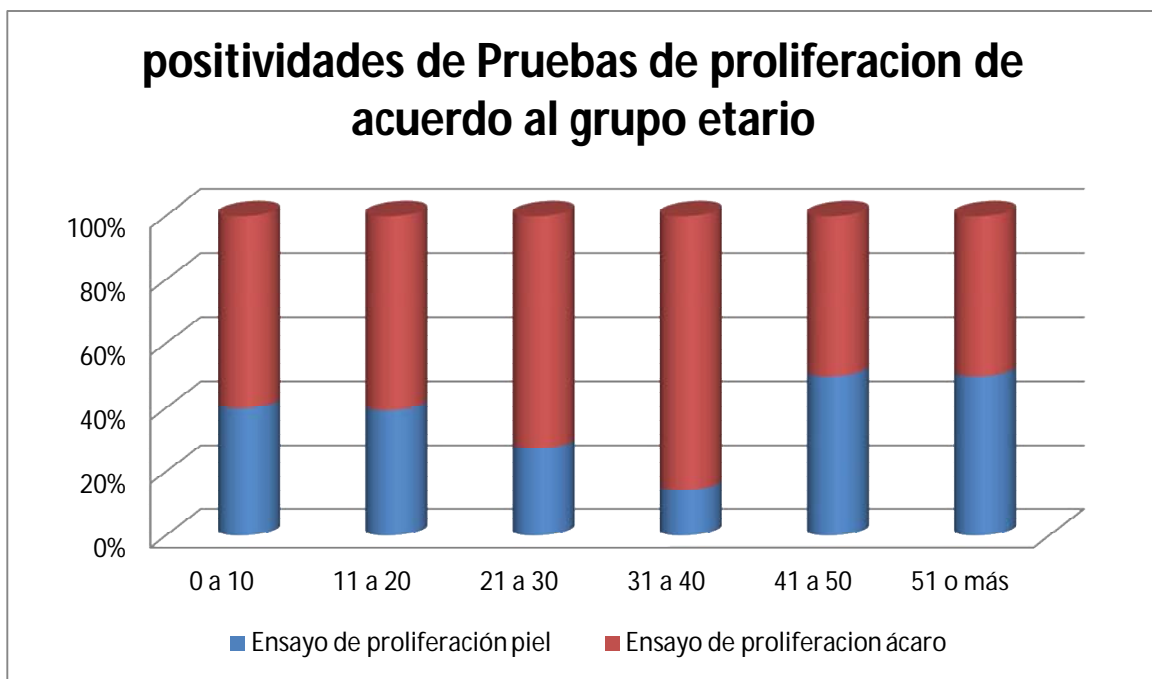


Figura 11.- Comparativo de positividades de Pruebas de proliferación de acuerdo al grupo etario.

Adicionalmente con los datos colectados durante la entrevista con los pacientes participantes fue posible realizar un gráfico donde se muestra otros alérgenos a los cuales los pacientes participantes demostraron una respuesta positiva en la prueba de escarificación, los alérgenos empleados durante este ensayo fueron : *Acacia longifolia*, *Agrosti alba*, *Alternaria tenuis*, *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia elatior*, *Ambrosia confertiflora*, *Candida albicans*, *Chenopodium álbum*, *Cladosporium clados*, *Cosmos bipinnatus*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Periplaneta americana*, *Canis familiaris*, *Rhizopus nigricans*, *Rumex crispus*, *Salsola kali*, *Shinus molle*, *Sorghum halapense*, *Zea mays*, *Artemisa ludoviciana*, *Aspergillus fumigatus*, *Atriplex bracteosa*, *Avena sativa*, *Betula occidentalis*, *Blatella germanica*, *Fraxinus uhdei*, *Felis domest gato*, *Helianthus annuus*, *Helminthosporium sp*, *Ligustrum lucidum*, *Liquidambar styr*, *Phleum pratense*, *Taraxacum officinale*, *Polvo casero*, *Polpulus alba*, *Prosopis juniflora*, *Quercus vellutina*, *Casuarina*, *Olea europea*, *Juniperus ashei* y *Poa pratense* (tabla 9).

Tabla 9.- Frecuencias de respuesta a otros alérgenos de los pacientes participantes en el estudio.

Alérgeno	Frecuencia (pacientes)	% de pacientes reactivos
Ácaro de polvo casero	81	100
<i>Acacia longifolia</i>	1	1.23
<i>Agrosti alba</i>	3	3.7
<i>Alternaria tenuis</i>	3	3.7
<i>Amaranthus palmeri</i>	2	2.46
<i>Ambrosia elatior</i>	1	1.23
<i>Ambrosia confertiflora</i>	3	3.7
<i>Candida albicans</i>	2	2.46
<i>Chenopodium album</i>	0	0
<i>Cladosporium clados</i>	3	3.7
<i>Cosmos bipinnatus</i>	3	3.7
<i>Cynodon dactylon</i>	11	13.58
<i>Lolium perenne</i>	6	7.4
<i>Mucor mucedo</i>	3	3.7

<i>Penicillium notatum</i>	5	6.17
<i>Periplaneta americana</i>	12	14.81
<i>Canis familiaris</i>	0	0
<i>Rhizopus nigricans</i>	1	1.23
<i>Rumex crispus</i>	5	6.17
<i>Salsola kali</i>	0	0
<i>Shinus molle</i>	5	6.17
<i>Sorghum halapense</i>	1	1.23
<i>Zea mays</i>	0	0
<i>Artemisa ludoviciana</i>	2	2.46
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2.46
<i>Atriplex bracteosa</i>	1	1.23
<i>Avena sativa</i>	4	4.93
<i>Betula occidentalis</i>	6	7.4
<i>Blatella germanica</i>	8	11.11
<i>Fraxinus uhdei</i>	8	9.87
<i>Felis domest gato</i>	5	6.17
<i>Helianthus annus</i>	6	7.4
<i>Helminthosporium s.</i>	1	1.23
<i>Ligustrum lucidum</i>	6	7.4
<i>Liquidambar styr</i>	11	13.58
<i>Phleum pratense</i>	5	6.17
<i>Taraxacum officinale</i>	0	0
<i>Polvo casero</i>	19	23.45
<i>Populus alba</i>	2	2.46
<i>Prosopis juniflora</i>	2	2.46
<i>Quercus vellutina</i>	5	6.17
<i>Casuarina</i>	0	0
<i>Olea europea</i>	3	3.7
<i>Juniperus ashei</i>	7	8.64
<i>Poa pratense</i>	4	4.93

9.-Discusión

En cuanto a la descripción de la población se puede mencionar que el tamaño de la muestra fue de **n=81**. Mostrándose un predominio del género masculino con un **63%** contra un **37%** del género femenino. (Vea figura 9) Este dato no tiene concordancia con el predominio del género femenino en la prevalencia de las alergias, sino más bien que en esta muestra hubo una mayor captación del género masculino y esto repercutió en un mayor porcentaje de este género. Pero al determinar el porcentaje de positividad para ambos antígenos (Ag ácaros y Ag escamas humanas) se pudo observar que no hubo una diferencia significativa entre géneros, en el caso de los ácaros fue de un 67% de mujeres y 76% de hombre. Para el caso de las escamas fue de un 50% de mujeres y 45% hombres (Ver figura 10).

La respuesta de proliferación de los linfocitos en los pacientes frente a los diferentes antígenos: 1) candidina, 2) Ag. Ácaros y 3) Ag. Escamas de piel humana, fue medida mediante un método espectrofotométrico que evaluó la actividad metabólica de los linfocitos mediante la reducción del colorante TTC a formazán. Es decir, que a mayor grado de estimulación del antígeno sobre los linfocitos habrá una mayor intensidad de coloración en el sistema y viceversa.

Al comparar los resultados obtenidos con respecto al testigo positivo, la candidina obtuvo el mayor grado de estimulación como es de esperarse para el testigo positivo. En segundo lugar fue para el sistema homólogo (alérgeno de ácaros). Y el tercer lugar con valores de IE muy cercanos a los ácaros se encontró el sistema heterólogo (alérgeno de escamas humanas). Al final quedó el grado de proliferación obtenido de las células sin estimular, el cual mostro como se esperaba una baja actividad por parte de los linfocitos, sirviendo de esta manera como un verdadero grupo testigo negativo (Ver figura 6).

En los pacientes sanos se observó el mismo comportamiento pero tanto el índice de estimulación del sistema homólogo como el del heterólogo permaneció como negativo en todos los casos (I.E <1.5) (Ver figura 8).

En cuanto a el grado de correlación entre la respuesta proliferativa de los linfocitos hacia los Ag de ácaros y el Ag de escamas humanas se pudo apreciar un comportamiento altamente significativo con una $p \leq 0.0001$ realizando las tablas de *Pearson*, *Spearman's* y *Kendall test*, lo cual indica que entre más aumente la respuesta a los ácaros también aumentara la respuesta hacia las escamas de la piel y se interpreta como una sensibilización simultánea por parte del individuo que respira las heces de los ácaros junto a las escamas (Véase figura 7 y tabla 4).

Con estos resultados se puede concluir que existe una respuesta de proliferación hacia las escamas humanas en casi uno de cada dos pacientes alérgicos al ácaro del polvo haciendo evidente la existencia de una reactividad hacia las escamas de piel y confirmando la posibilidad de que estas jueguen un papel como fuente de alérgenos, lo cual es sustentado por la evidencia de que existen anticuerpos IgG1, IgG4 e IgE que reconocen los extractos de escamas humanas. Lo cual fue demostrado tanto por ELISA como por WESTERN BLOT. Así como por el ensayo de degranulación de basófilos que indicó que el **58%** de los pacientes alérgicos a los ácaros presentaron anticuerpos IgE contra las escamas humanas y son capaces de inducir la degranulación de basófilos de sangre periférica (2).

Estos hallazgos pueden ser comparados con estudios anteriores en los que se hizo evidente la presencia de anticuerpos contra escamas humanas en los pacientes alérgicos a los ácaros del polvo, señalando una sensibilización de estos pacientes hacia proteínas de su propia piel. Algunas razones por las cuales puede ocurrir lo anterior pueden ser 1) Que se presente una sensibilización simultánea hacia las escamas y los alérgenos de los ácaros al estar presentes ambos en las heces y ser aerolizados 2) Como una consecuencia de la respuesta inflamatoria *in situ* se puede generar una reactividad hacia las proteínas de la piel inflamada; dando inicio a un auto reconocimiento por pérdida de tolerancia.

Con los IE obtenidos de los pacientes no reactivos a los ácaros también se realizó un cálculo de correlación de la respuesta proliferativa hacia los Ag de ácaros y de escamas de piel humana de igual manera que con los de los pacientes alérgicos se realizaron tablas de

Spearman's y *Kendall test* dando como resultado un comportamiento no significativo pero para la prueba de *Pearson* se mostró un comportamiento con un pequeño grado de significancia esto muy probablemente debido a que esta prueba no es la mejor para el tipo de ensayo realizado ya que esta prueba es no paramétrica.

Gracias a los datos colectados durante la entrevista de inclusión al estudio fue posible determinar en qué grupo etario se registra la mayor incidencia de alergia a los ácaros del polvo y respuesta positiva contra las escamas humanas (ver Figura 11), la cual fue en los primeros 10 años con un **31%** donde se registraron la mayor cantidad de casos en el estudio, después de esta primera década de vida se puede apreciar un descenso en la incidencia seguida de un pico entre la cuarta y quinta década de vida. Dato que concuerda con la bibliografía estudiada en cuanto a la prevalencia de las alergias. (5; 10; 19)

El grado de similitud en la respuesta obtenida hacia el antígeno de los ácaros presentó una sensibilidad de un **72.839%** en comparación con la prueba de escarificación la cual fue empleada como criterio de inclusión de los pacientes y además es considerada el estándar de oro para la hipersensibilidad tipo I. Mientras que para el caso del sistema heterólogo, es decir hacia el antígeno de escamas humanas se presentó un **53%** de casos positivos por la prueba de proliferación de linfocitos.

También se pudo conocer a que antígenos además del ácaro del polvo se presentó una respuesta positiva por parte de los pacientes con este padecimiento (ver Tabla 9). Los primeros lugares en frecuencia fueron: el antígeno del Polvo casero con una del **23.45%** seguido del de *Periplaneta americana* (*cucaracha americana*) con un **14.81%** de los casos y en tercer lugar con igual de **13.58%** fueron los antígenos de *Liquidambar styr* (árbol liquidámbar) y el de *Cynodon dactylon* (césped).

En mi opinión es necesario realizar más estudios con el fin de determinar tanto el mecanismo como el origen de estas reacciones, debido a las implicaciones que derivan de este estudio y que son: que una enfermedad por hipersensibilidad tipo I puede desencadenar otra por autoinmunidad o viceversa. Determinar el orden de estos

acontecimientos es importante en la descripción del mecanismo de patogenicidad en las enfermedades alérgicas.

10.- Conclusiones

- ❖ En el ensayo de proliferación de linfocitos de los pacientes alérgicos hacia el ácaro del polvo se encontró que uno de cada dos pacientes presentaron reactividad hacia las escamas de piel humana.
- ❖ En cuanto a la prevalencia de este padecimiento entre géneros se determinó que no existe una diferencia significativa, ni para el caso de los ácaros, ni tampoco para las escamas.
- ❖ Al momento de organizar a los pacientes por grupos etarios se pudo ver que ésta autoreactividad es más común durante la primera, segunda, disminuye en la tercera y aumenta nuevamente a partir de la cuarta década de vida.
- ❖ Se presentó un gran parecido en la reactividad tanto para los ácaros del polvo casero como para las escamas de piel humana con un valor de coeficiente de correlación de $p=0.0001$.
- ❖ La sensibilidad mostrada por la prueba de proliferación de linfocitos fue de un 73% junto con una especificidad del 100% lo cual la convierte en una alternativa de diagnóstico *in vitro* para los pacientes que no son candidatos para realizar una prueba *in vivo* por razones de seguridad.

11.-Anexos:

11.1.-HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

“Proliferación de Linfocitos Totales en Presencia de Escamas Humanas en Pacientes Alérgicos al Acaro del Polvo”

No. de paciente	No de expediente	Edad	Sexo (F1 M2)	Diagnóstico	Prueba a <u>Dermatophagoides pteronyssinus</u> (neg. 0, pos. 1)	Prueba a <u>Dermatophagoides fariane</u> (neg. 0, pos. 1)	IE a ácaros del polvo	IE a escamas de piel humana

11.2 REACTIVOS

📌 Solución Salina de Hanks

Componentes g/litro

NaCl.....8.0	KCl.....0.4	MgSO ₄ 7H ₂ O.....0.2
CaCl ₂ H ₂ O.....0.185	Na ₂ HPO ₄0.046	KH ₂ PO ₄0.06
Glucosa.....1.0	NaHCO ₃0.35	Agua destilada

📌 Solución Alsever 1X

Glucosa.....2.05 %	Cloruro sódico..... 0.42 %	Citrato sódico..... 0.8 %
ácido cítrico..... 0.055 %	Agua destilada	

📌 Medio Mínimo Esencial (MEM)


Concentraciones en mg/L)

Ca(NO ₃) ₂300	KNO ₃80	MgSO ₄720
KCl.....65	Na ₂ SO ₄200	NaH ₂ PO ₄19
MnSO ₄7.0	ZnSO ₄3.0	H ₃ BO ₃1.5
KI.....0.75	Fe ₂ (SO ₄) ₃2.5	Glicina.....3.0
Ac. Nicotínico.....0.5	Piridoxina HCl.....0.1	Tiamina.....0.1

📌 Solución Salina Fisiológica

ClNa 0.9 %	Agua inyectable
------------	-----------------

12.-Referencias:

1. *Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México.* **López PG, Morfín MBM, Huerta.** 3, México : nieto editores, Mayo-Junio de 2009, Revista Alergia, Vol. 56, págs. 72-79.
2. **Manuel, Zendejas Buitrón Victor.** Reconocimiento de antígenos de un ácaro del polvo casero (Dermatophagoides pteronyssinus) por parte de sueros de pacientes alérgicos y sus convivientes. *Tesis de Doctorado.* México DF : s.n., 1987.
3. *Evaluation of cellular immunity in dogs: in vitro lymphocyte proliferation test.* **RAMAYO, L. G, SOBA, M.G y MUNDO, S.L.** 1, Buenos Aires : InVet, 2004, Vol. 7, págs. 63-70.
4. **Méndez, Huerta, Bellanti, Ovia, y Escobar.** *Alergia, Enfermedad Multisistémica: Fundamentos básicos y clínicos.* s.l. : Panamericana, 2008. págs. 1,2,7.
5. **M., Roitt Ivan.** *Inmunología, Fundamentos.* 10a. Buenos Aires : Médica Panamericana S.A., 2003. págs. 367-373.
6. **E., Middleton.** *Alergia, principios y práctica.* s.l. : Ed. Salvat, 1996. págs. 100-120.
7. **William Rojas M., Juan Manuel Anaya C., Beatriz Aristizabal B., Luz Elena Cano R., Luis Miguel Gomez O., Damaris Lopera H.** *Inmunología de Rojas.* 16. Colombia : Corporación para Investigaciones Biológicas, 2012. pág. 410. 
8. **Ricardo Cardona Villa, Carlos Serrano Reyes.** *Alergia: Abordaje Clínico, Diagnóstico y Tratamiento.* s.l. : Médica Internacional, 2010.
9. **Jonathan Brostoff, David K. Male.** *Clinical Immunology an Illustrated Outline.* Barcelona : Mosby, 1994. págs. 82-84.
10. *Reacciones de Hipersensibilidad.* **Jorge Gustavo Romero Valdéz, Quirino Pereira, Rodolfo Atilio Zini.** 167, 2007, Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina .
11. **Abraham, M. R., Cambas, D. B y Simes, A.** Reacciones Inmunitarias que Involucran a la IgE. [En línea] 3 de Octubre de 2012. <http://med.unne.edu.ar/catedras/fisiologica/IgE,.pdf..>
12. **Brasó Aznar, J.V. Y Jorro Martinez, G.** *Manual de Alergia Clínica.* Barcelona : MASSON, 2003. págs. 23-39.
13. *Teoría Th2 en Alergia Actualidades y Futuras Direcciones.* **Rojas Ramos, E., Martínez Jiménez, N. E. y Reyes Salinas, A.** 50, 2003, Alergia México , Vol. 2, págs. 60-70.
14. *Hipersensibilidad a Medicamentos.* **Lopez Tiro, J.J. y Orea Solano, M.** 48, 2011, Rev. Alergia Méx. , Vol. 1, págs. 4-8.

15. **Gandolfo, M. Pelta F.** *Guía de Alergias para Residentes y Atención Primaria*. Madrid : Ediciones Díaz de Santos, 2001.
16. **Fireman, Andrej Petrov y Philip.** *Atlas de Alergia e Inmunología Clínica*. 3° edición. Madrid : Elsevier, 2007. págs. 51-52.
17. **Valeria, Vilchis García.** Tesis *Reactividad cruzada entre anticuerpos IgE e IgG de pacientes alérgicos al ácaro del polvo domestico (Dermatophagoides pteronysinus y farine) y proteínas de escamas humanas o alérgenos de perro y gato*. Edo. México : FES Cuautitlan Campo1, 2012.
18. **Villa, Sergio Zambrano.** *Inmunología Básica y Clínica*. s.l. : Mc. Graw- Hill, 2007.
19. **Colloff, Matthew J.** *Dust Mites*. New Zealand : CSIRO PUBLISHING, 2009.
20. **Salud, Diario de.** Alergias la Epidemia no Infecciosa del Siglo XXI. [En línea] 3 de Diciembre de 2010. <http://www.salud.com/alergias-epidemia-no-infecciosa-del-siglo-xxi.asp>.
21. **Chivato Perez Tomás, Coláz Sanz Carlos.** *Guía Rápida para Residentes de Alergología*. Madrid : Luzán, 2009. págs. 37-40.
22. *Hipersensibilidad a Medicamentos*. **Muñoz, M.T. Giner.** 9, Barcelona : s.n., 2009, Pediatric Integral, Vol. XIII, págs. 819-834.
23. *Progresos en el Diagnóstico de la Alergia*. **Nieto A, Nieto M, Mazón A.** 61, Valencia : Nieto Editores , 2014, Revista Alergia México, págs. 336-356.
24. **Negro Alvarez, J. M.** Las pruebas de alergia. [En línea] 2004. http://alergomurcia.com//pdf/Las_pruebas_de_alergia.pdf.
25. *Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica* . **Arruda Chavez, E.** 2, s.l. : Rev. Med. Hered, 2004, Vol. 15.
26. **Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H. y Pillai, Shiv.** *Inmunología Celular y Molecular*. sexta. Barcelona : Elsevier, 2008.
27. *Protein Kinase C (theta) in T Cell Activation*. **N, Isakov y A., Altman.** 20, 2002, Annu. Rev. Immunol, págs. 761-794.
28. *T-cell-receptor and B-cell-receptor mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes*. **R, Meil y A., Israel.** 2004, 2004, Curr Opin Immunol, págs. 81-374.
29. *Lymphocyte Activation and Effector Functions*. **M, Nemec.** 13, 2001, Vol. 265, pág. 265.
30. **Irigoyen Coria, Maria de Lourdes.** *Guías Prácticas para el Laboratorio de Inmunología*. s.l. : Editorial Medicina Familiar Mexicana, 2005.

31. **Pareja, Enrique Iáñez.** Curso de Inmunología General. *Maduración, activación y diferenciación de los linfocitos T.* [En línea] Departamento de Microbiología Universidad de Granada España, 1999. [Citado el: 15 de Enero de 2015.] <http://www.ugr.es/~eianez/in>.
32. *Frecuencia de Sensibilización a Ácaros, Cucaracha y Camarón en Adultos con Alergia Respiratoria.* **Eunice López-Rocha, Karen Rodríguez-Mireles, Arturo Gaspar-López, Leonel Del Rivero-Hernández y Nora Segura-Ménde. F.** México DF : s.n., 2014.
33. *Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria.* **FAGIOLU U., K. F.** 72, 2000, Journal of Allergy Clinical Immunology, pág. 567.
34. **J.H.** [En línea] Servicio de alergología, Mayo de 2006. www.alergomurcia.com.