



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA**

**Estudio epidemiológico de la incidencia
del hongo *Alternaria alternata* en la isla
de Gran Canaria y rentabilidad clínica del
diagnóstico de su alérgeno mayor Alt a 1**

**Juan Antonio García Marrero
2010**

El **Dr. Zoilo González Lama**, Catedrático de Microbiología, Profesor del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación titulado “**Estudio epidemiológico de la incidencia del hongo *Alternaria alternata* en la isla de Gran Canaria y rentabilidad clínica del diagnóstico de su alérgeno mayor Alt a 1**”, constituye la memoria que presenta **D. Juan Antonio García Marrero** para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a veinte de octubre del año dos mil diez

VºBº

Fdo: Dr. Zoilo González Lama

El **Dr. Ricardo Palacios Peláez** Adjunct Clinical Professor del Departamento de Oftalmología de la School of Medicine de Louisiana State University (LSUHSC) New Orleans U.S y C.E.O de Diater Laboratorios.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación titulado “**Estudio epidemiológico de la incidencia del hongo *Alternaria alternata* en la isla de Gran Canaria y rentabilidad clínica del diagnóstico de su alérgeno mayor Alt a 1.**”, constituye la memoria que presenta **D. Juan Antonio García Marrero** para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía y ha sido realizado en los laboratorios de ambas insituciones bajo la dirección del **Dr. Ricardo Palacios Peláez**

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid a veinte de octubre del año dos mil diez

VºBº

Fdo: Dr. Ricardo Palacios Peláez



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA**

**Estudio epidemiológico de la incidencia
del hongo *Alternaria alternata* en la isla
de Gran Canaria y rentabilidad clínica del
diagnóstico de su alérgeno mayor Alt a 1**

Directores:

Dr. Zoilo González Lama
Dr. Ricardo Palacios Peláez

Doctorando:

D. Juan Antonio García Marrero
Las Palmas de Gran Canaria, 2010

A mi abuelo paterno, Dr. Rafael García Pérez, primer radiólogo de Las Palmas de Gran Canaria. A mi padre que siguió la tradición y que fueron un claro ejemplo para mi vocación médica.

A mi madre, Concepción Marrero.

A mi mujer María Elena y mis hijos Sergio y Eduardo, por su paciencia y comprensión por el tiempo que no les he podido dedicar.

Agradecimientos

A los Directores de mi Tesis Doctoral. El Dr. Zoilo González Lama por hacer fácil lo difícil y al Dr Ricardo Palacios Peláez, por su amistad personal y profesional, sin los cuales no habría podido completar esta tesis.

A Diater Laboratorios por su ayuda para la realización del trabajo experimental de ésta Tesis y de una manera especial a la Dra Dulce Aldana, al Dr Fernando Pineda de la Losa, así como a D. David Rodríguez por las técnicas moleculares y el tratamiento estadístico.

A los Servicios de Alergología y Bioquímica del Hospital Universitario Insular de Las Palmas de Gran Canaria, a todo su personal.

En especial, a mis compañeros el Dr. Anselmo Sánchez Palacios y la Dra. Ana Lamas-Rúa Figueroa, así como a todos aquellos que de un modo u otro han colaborado en la realización de éste trabajo.

Finalmente a mi amigo Santos Pineda.

ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos	1
I. REVISIÓN de CONOCIMIENTOS	4
1. Alergia	5
1.1 Definición y mecanismos	5
1.2 Hipersensibilidad inmediata	6
1.2.1: Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata	7
1.2.2: La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata	9
1.2.3: Complejo mayor de histocompatibilidad MHC	11
1.2.3.1: Moléculas de clase I	11
1.2.3.2: Moléculas de clase II	12
1.2.3.3: Moléculas de clase III	13
1.2.4: El receptor de la Inmunoglobulina E	13
1.2.5: Las células involucradas en la hipersensibilidad inmediata	15
1.2.5.1: Mastocitos	15
1.2.5.2: Basófilos	16
1.2.5.3: Bioquímica de la activación de mastocitos y basófilos	17
a) Mediadores de mastocitos y basófilos	18
a.1) Mediadores preformados	18
a.2) Mediadores de nueva síntesis	20
a.3) Citoquinas	21
1.2.5.4: Eosinófilos	21
1.3 Alérgenos. Origen y obtención	23
1.4 Diagnostico en alergia	23
2. Los hongos	25
2.1 Biología de los hongos	25
2.2 Clasificación y características principales	25
3. Los hongos como alérgenos	26
3.1 Aerobiología de los hongos:	26
3.2 Diagnostico e inmunoterapia de alergia a hongos:	28
4. Alérgenos de hongos	30
4.1 <i>Alternaria alternata</i>	30
5. Reactividad cruzada	32
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIALES y MÉTODOS	37
1. Obtención y procesado de la fuente alérgénica	38
1.1 Obtención del extracto	38
1.2 Homogeneización	38
1.3 Extracción	38
1.4 Filtración y diálisis	38
1.5 Estabilización	38
1.5.1 Determinación de parámetros analíticos	39
1.5.1.1 Humedad relativa	39

1.5.1.2 Contenido proteico	40
1.5.1.3 Contenido en azúcares	40
2. Identificación de alérgenos	41
2.1 Determinación de pesos moleculares. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico: SDS PAGE	41
2.1.1 Fundamento teórico	41
2.1.2 Descripción de la SDS PAGE	41
2.1.2.1 Tampones y soluciones	42
2.1.2.2 Montaje de placas	43
2.1.2.3 Preparación de los geles: sistema discontinuo	43
2.1.2.4 Preparación de las muestras	44
2.1.2.5 Condiciones electroforéticas	44
2.1.2.6 Tinción	44
2.1.2.7 Determinación de pesos moleculares	44
2.2 Transferencia de bandas proteicas separadas por electroforesis a membranas inmovilizantes. Western blot/Immunoblotting	45
2.2.1 Fundamento teórico	45
2.2.2 Descripción. Inmunotransferencia: Western blot/immunoblotting	46
2.2.3 Método de transferencia semiseco	47
2.2.3.1 Tinción de membranas de PVDF transferidas: directa	48
2.2.3.2 Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible	48
2.2.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF	48
2.3 Procedimiento de evaluación de bandas en SDS PAGE e inmunodetección	51
3. Antígenos y antisueros experimentales	51
3.1 Purificación del alérgeno Alt a 1	51
3.1.1 Cromatografía de intercambio aniónico	53
3.1.2 Cromatografía de intercambio catiónico	53
3.1.3 Cromatografía de gel filtración	54
3.2 Estabilización del alérgeno Alt a 1	54
3.3 Inmunización	54
3.3.1 Fundamento teórico	54
3.3.2 Protocolo de inmunización	55
4. Caracterización y comportamiento del alérgeno mayor nativo Alt a 1	55
4.1 Cuantificación de alérgenos mayores	56
4.1.1 ELISA	57
4.1.1.1 Fundamento teórico	57
4.1.1.2 Cuantificación de Alt a 1. ELISA doble sandwich	57
4.1.1.3 ELISA directo: Alt a 1	59
4.1.1.4 ELISA inhibición	60
4.1.1.5 Cuantificación de niveles de Ig E específica	62
5. Estandarización biológica	62
5.1 Eficacia diagnóstica	62

5.2 Pruebas cutáneas	63
6. Pacientes	63
7. Toxicidad	64
7.1 Toxicidad anormal en ratones por vía intraperitoneal	64
7.2 Capacidad irritante no específica en ratas	64
IV. RESULTADOS	65
1. Procedimiento de purificación de Alt a 1	66
1.1 Cultivo de <i>Alternaria alternata</i>	67
1.2 Antigenograma del extracto de <i>Alternaria alternata</i>	68
1.3 Alergograma del extracto de <i>Alternaria alternata</i>	68
1.4 Cromatografía de intercambio aniónico	69
1.5 Cromatografía de intercambio catiónico	70
1.6 Cromatografía de gel filtración	71
1.7 Antigenograma y alergograma del alérgeno Alt a 1	71
1.8 Cuantificación del peso molecular por espectrometría de masas del alérgeno Alt a 1	73
1.9 Caracterización del alérgeno Alt a 1	73
2. Toxicidad del alérgeno Alt a 1	73
3. Inmunización de conejos con el alérgeno Alt a 1	74
4. Estudios con antisueros policlonales monoespecíficos	74
5. Estudios con sueros humanos	76
5.1 Especificidad y sensibilidad del alérgeno mayor Alt a 1	76
5.2 Estudios de ELISA inhibición con sueros humanos	76
6. Pruebas cutáneas	77
6.1 Estandarización biológica del alérgeno Alt a 1 y del extracto alergénico de <i>Alternaria alternata</i>	77
7. Estudio epidemiológico de incidencia	78
8. Rentabilidad clínica diagnóstica con el alérgeno Alt a 1	81
V. DISCUSION	83
VI. CONCLUSIONES	88
VII. BIBLIOGRAFIA	90

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ACF:	adyuvante completo de Freund
µg:	microgramo.
µL:	microlitro.
1.... n p	1.... n: número del cromosoma en referencia al brazo largo p.
1.... n q	1....n: número del cromosoma en referencia al brazo corto q.
Abs:	absorbancia.
ABTS:	ácido 2,2-azino-di-(3 etilbenzotiazolin) sulfónico.
AIF:	adyuvante incompleto de Freund.
AMPc:	adenosin monofosfato cíclico.
ARN:	ácido ribonucleico.
B:	población linfocitaria.
BSA:	seroalbúmina bovina.
BU:	unidad biológica.
Ca:	calcio.
CD ₂₃ :	receptor de baja afinidad para la Ig E (Fc ε RII).
CD ₄ :	receptor de célula T para reconocimiento moléculas HLA clase II.
cDNA	ácido desoxido ribonucleico complementario.
cm:	centímetro.
cm ² :	centímetro cuadrado.
CPMP:	comité de la EMEA para evaluación de productos medicinales.
Da:	daltons.
DAG:	diacil glicerol.
DMAB:	ácido 3 dimetilaminobenzóico.
DNA:	ácido desoxido ribonucleico.
DSS:	disuccinimidil suberato.
ECP:	proteína catiónica del eosinófilo.
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetraacético.
ELISA:	enzimoinmunoensayo en placa de poliestireno (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).
EMEA:	agencia europea para evaluación de medicamentos.
Fig.	figura.
Fc ε RI:	receptor de alta afinidad para la Ig E.
Fc ε RII:	receptor de baja afinidad para la Ig E.
g:	gramo.
GM-GSF:	factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos.
GTP:	guanosina trifosfato.
h:	hora.
H _{1.....4} :	tipo de receptor para la histamina.
H ₂ O:	agua.
H ₂ O ₂ :	agua oxigenada.
HCl:	ácido clorhídrico.
HEP:	unidad histamino equivalente por prick.
HR:	humedad relativa.
HRP:	peroxidasa de rabano.
HLA:	antígenos de leucocitos humanos.
ICH:	conferencia internacional de armonización.

IFN γ :	interferón gamma.
Ig:	inmunoglobulina.
Ig:	Inmunoglobulina
IgE:	inmunoglobulina E.
IgG:	inmunoglobulina G.
IL -:	interleuquina.....
ITAM:	inmunoreceptor activación de tirosina.
IUIS:	International Union immunology Societies.
KCl:	cloruro potásico.
KDa:	kilodaltons.
Kg:	kilogramo.
KH ₂ PO ₄ :	fosfato potásico.
KU:	kilo unidades.
L:	litro.
LT..C..., D..., E...:	leucotrienos de clases C..., D...,E..
LTP.	proteínas de transferencia de lípidos.
Lyn:	tirosina quinasa.
m ³ :	metro cúbico.
M:	molaridad.
mAb:	anticuerpo(s) monoclonal(es).
mA:	miliamperio.
mcg:	microgramos.
mg:	miligramo.
mm ² :	milímetros cuadrados.
mS:	mili Siemens.
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad.
min.:	minuto.
mL:	mililitro.
mM:	mili molar.
mm:	milímetro.
MOI:	multiplicidad de infección
N:	normalidad.
Na ₂ CO ₃ :	carbonato sódico.
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O:	fosfato disódico dihidratado.
NaCl:	cloruro sódico.
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O:	fosfato sódico monohidratado.
NaHCO ₃ :	bicarbonato sódico.
ng:	nanogramo.
nm:	nanometro.
° C:	grados centígrados.
p/v:	peso / volumen.
PAF:	factor activador de plaquetas.
PBS:	tampón fosfato salino.
PBS-T:	Solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v).
PBS-T-BSA:	Solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v) y seroalbúmina bovina al 1% (p/v).
PG.....:	prostaglandina.
PI:	fosfatidil Inositol.
pI:	punto isoelectrico
PLA,C:	fosfolipasa A, C.
PM:	peso molecular.
PMSF:	phenylmethilsulfonyl fluoride.

PVDF:	difluoruro de polivinilideno.
r.p.m.:	revoluciones por minuto.
RAST:	enzimoinmunoensayo con fase sólida en discos de celulosa (<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>).
RNA:	ácido ribonucleico.
SDS:	dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.
SPT:	prueba cutánea (<i>Skin Prick Test</i>).
T:	población linfocitaria.
TA:	temperatura ambiente.
TBS:	tampón tris salino.
TEMED:	N, N, N',N'-tetrametil-etilendiamina.
TGF β	factor de crecimiento tumoral β .
T _H 1:	subpoblación de linfocito colaborador.
T _H 2:	subpoblación de linfocito colaborador.
TNF α :	factor de necrosis tumoral alfa.
Treg:	subpoblación celular T. Célula T reguladora.
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano.
Tween-20:	polioxietileno-sorbitan monolaurato.
UI:	unidad internacional.
v/v:	volumen/volumen.
V:	voltios.
W:	watios.
X g:	fuerza centrífuga relative; número de veces la aceleración de la gravedad.

REVISION DE CONOCIMIENTOS

1. ALERGIA

1.1 Definición y mecanismos:

Las enfermedades alérgicas representan en la actualidad una de las principales patologías que afectan a la salud en todas las edades y se considera que al menos 100 millones de personas en el mundo presentan problemas alérgicos (Grant, 1992). En 1997 Romagnani considero que se había producido un considerable incremento en su incidencia en las sociedades industrializadas durante los últimos 30 años, estimando que al menos un 20% de la población mundial era susceptible de padecer dicha enfermedad (Romagnani, 1997). El coste anual para el tratamiento del asma en los Estados Unidos se estimó alrededor de los 6.000 millones de \$USA (Smith, 1997), y la morbilidad asociada a la atopia requiere elevados costes de medicación. Estos hechos incentivan, la investigación de los mecanismos de la enfermedad, así como el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que contribuyen a fomentar la investigación básica y clínica en centros de investigación, hospitales e industria farmacéuticas (von Hertzen, 2000).

La identificación de agrupamientos de la regulación de citoquinas en el cromosoma 5 y del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6 son ejemplos de estudios que ponen de manifiesto el componente genético que acompaña a la enfermedad, aunque muchas veces, estos factores genéticos no explican la creciente incidencia de la enfermedad, por ello, se han desarrollado estudios epidemiológicos en diferentes grupos poblacionales para intentar relacionar causa y efecto. Estos estudios parten de la premisa de que los responsables de dicho crecimiento podrían ser debidos a cambios medioambientales (Cookson, 2000) alteraciones feto-maternas, estilo de vida, dieta, y desembocan en la denominada teoría higienista (Folkerts, 2000).

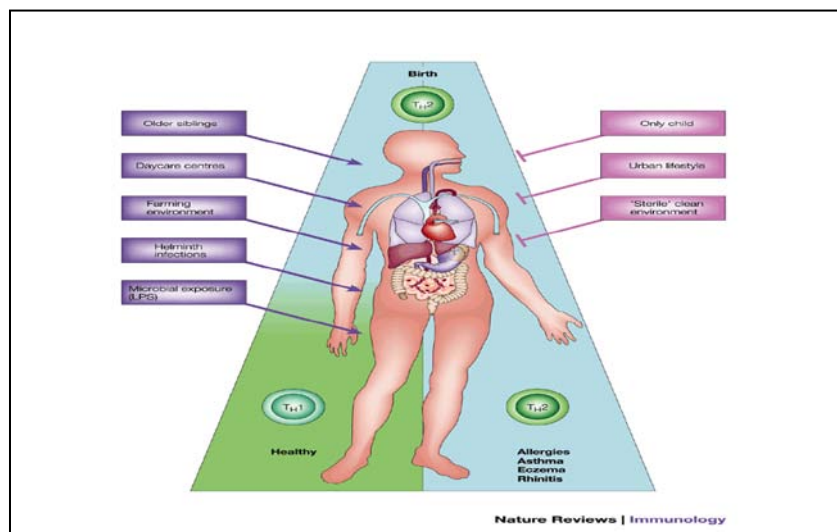


Figura 1: teoría higienista (Busse, 2002)

El sistema inmune esta constituido por en una serie de elementos celulares y humorales que pueden interactuar específicamente con muchos tipos de estructuras moleculares (antígenos) con la finalidad de distinguir lo propio de lo ajeno al organismo. La función de este sistema es proteger al organismo del daño que eventualmente pudieran producir microorganismos y toxinas externas, así como eliminar alteraciones internas como tumores. El sistema inmune también puede responder inapropiadamente ante sustancias, que aunque extrañas y aparentemente inofensivas, conducen a desarrollar fenómenos de hipersensibilidad de tipo I, conocidos también como de hipersensibilidad inmediata o alergia.

1.2 Hipersensibilidad inmediata

Uno de los mecanismos de reacción más poderosos del sistema inmunitario es la estimulación mediada por la IgE de los mastocitos tisulares y de sus homólogos circulantes, los basófilos sanguíneos (Wills-Karp y cols., 2001). Cuando se produce un entrecruzamiento entre un antígeno y éste tipo de anticuerpos asociados a las células, se produce una inmediata activación de las mismas, que conduce a la liberación de los mediadores almacenados en sus gránulos. Estos mediadores, en conjunto, producen:

- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Vasodilatación.
- Contracción del músculo liso bronquial y visceral.
- Inflamación local

Esta reacción es conocida como “hipersensibilidad inmediata” (Noon, 1911) y por sus importantes repercusiones patológicas, que en su forma más extrema, sistémica se conoce como “anafilaxia”, conllevan a contraer la vía respiratoria, hasta el punto de producir la parada cardio-respiratoria. Es característico también de la reacción de hipersensibilidad inmediata, que entre las 2 y 4 horas posteriores a la degranulación de mastocitos y basófilos, se produzca una reacción de “fase tardía” (Mudde y cols., 1990), caracterizada por un infiltrado inflamatorio de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos; que conducen, tras reiteradas repeticiones a una lesión tisular.

Los individuos que tienden a producir anticuerpos de la clase IgE, en respuesta a diferentes antígenos ambientales y que presentan respuestas de hipersensibilidad inmediata, se denominan “atópicos”.

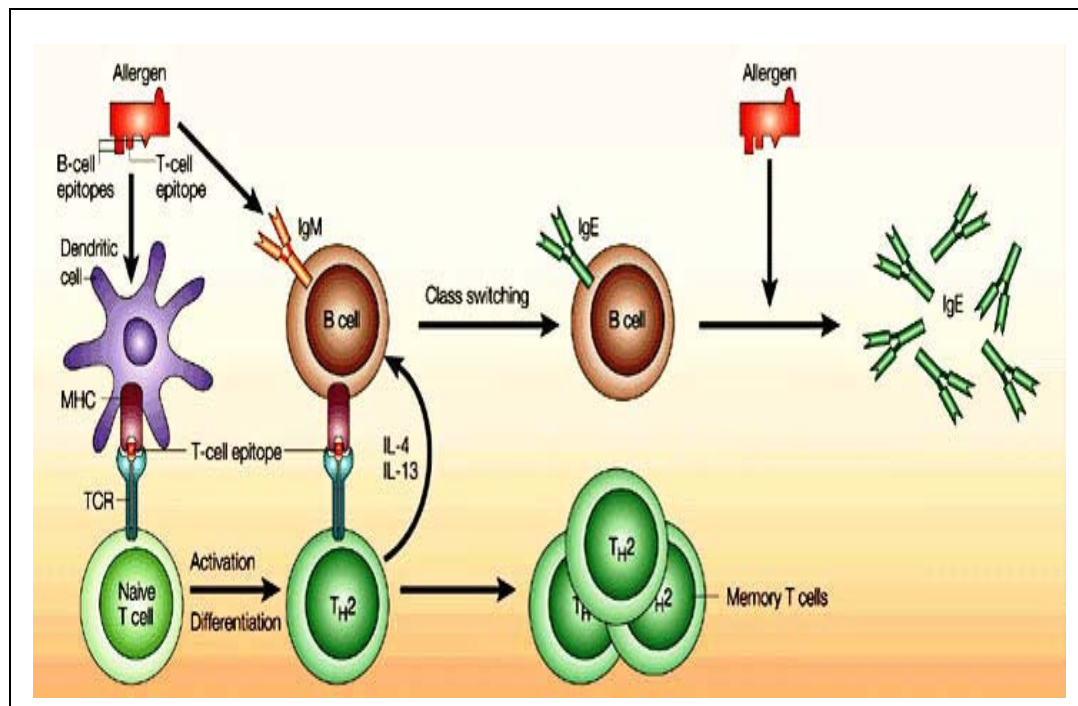


Figura 2: Sensibilización y memoria (Valenta, 2002)

1.2.1: Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata

La respuesta alérgica mediada por Ig E requiere de una serie de interacciones moleculares y celulares entre células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y monocitos), linfocitos T (subtipos T supresores y T helper:Th1 y Th2) y linfocitos B. Las células presentadoras de antígenos absorben y fragmentan los antígenos para poder presentarlos, en forma de pequeños péptidos (denominados epítopos T) asociados a moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T.

En individuos alérgicos el contacto con un antígeno, generalmente de naturaleza proteica, que habitualmente recibe el nombre de “alérgeno” (Wahn y cols., 1997), induce la estimulación de las células T CD4⁺, que representan el 60% de las células T circulantes y que presentan receptores para los complejos epítopos T-MHC de clase II, que inducen su proliferación y la liberación de citoquinas y su ulterior transformación en células T efectoras o “helper”, denominadas TH2 (Constant y cols., 2000). Estas células TH2 producen y liberan citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 y mínima o ausencia de IFNγ (Grunewald y cols., 1998), así como señales mediadas por contacto, que inducen la diferenciación de células B específicas del antígeno, en células productoras de IgE específica del antígeno. En individuos sanos la respuesta de las células T CD4⁺ conduce a una elevada síntesis de IFN γ (potente antagonista de la IL-4).

Sin embargo se han descrito linfocitos T CD4⁺ heterogéneos como los denominados Th0 caracterizados por la síntesis de elevadas cantidades de IL-4 e IFN γ y otra familia conocida como Treg con capacidad de suprimir la respuesta inmune y que presenta dos fenotipos diferentes: células Treg de tipo

Th3 productoras de TGF β , asociadas a la inducción de tolerancia mucosa/oral (Weiner 2001) y células Treg de tipo 1 (Tr1) productoras de elevados niveles de TGF β e IL-10 (Levings et al 2005). Otros fenotipos de células Treg han sido descritos en función de su producción de citoquinas como las Treg productoras exclusivamente de IL-10 y no de TGF β (Bellinghausen et al 2001) y las Treg productoras exclusivamente de IL-10 e IFN γ (Stock et al 2004). La comparación entre las células CD4⁺CD25⁺ Treg de individuos sanos y de individuos atópicos muestran que las células Treg de los individuos atópicos son menos efectivas en la supresión de las células CD4⁺CD25⁺ (Ling et al 2004 y Bellinghausen et al 2005) y la proporción de células Treg periféricas productoras de IL-10 alérgeno específica de los individuos alérgicos es más elevada que la de células Th2, cuando se comparan con individuos no alérgicos (Akdis et al 2004).

Del concurso de estas interacciones, la IgE producida por los plasmocitos circula por el organismo, disponiendo de una vida media de 2 – 3 días y una concentración normal < 80 UI/mL* y se fija a receptores específicos de alta afinidad para el Fc ϵ de la cadena pesada de la IgE, denominados Fc ϵ RI (Turner y Kinet, 1999) y presentes en la superficie de los basófilos sanguíneos circulantes y de los mastocitos de diversos tejidos, en los que se puede mantener hasta 15 días.

La reintroducción o un ulterior contacto con el mismo antígeno, induce su fijación por puenteo o entrecruzamiento con dos ó más moléculas de IgE específica, a través de sus Fab, en la superficie de mastocitos y basófilos (Saini y cols., 2000). El entrecruzamiento de los receptores Fc inicia una señal de transducción en las células, que conduce a su degranulación y liberación de mediadores preformados al exterior de las mismas, así como a la síntesis y liberación de otros mediadores, que son los responsables de las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas de la hipersensibilidad.

Algunos de los mediadores, inducen una acción inmediata sobre la musculatura lisa y vascular, mientras que otros mediadores estimulan la atracción y acumulo de leucocitos y linfocitos, que originan una acción retardada.

La hipersensibilidad inmediata o alergia, puede considerarse de éste modo y en forma simplificada, como una enfermedad dependiente de células Th₂; ya que estas células producen IL-4; una citocina necesaria para la síntesis de IgE, así como de la IL-5 que estimula activación del eosinófilo propio de los procesos inflamatorios y que es característico de muchas patologías alérgicas (Ying, 1997). Este tipo de reacción es diferente de la hipersensibilidad retardada, una reacción inmunitaria mediada por células T CD8⁺ y CD4⁺ Th₁, así como macrófagos, en las que los anticuerpos no presentan un papel protagonista.

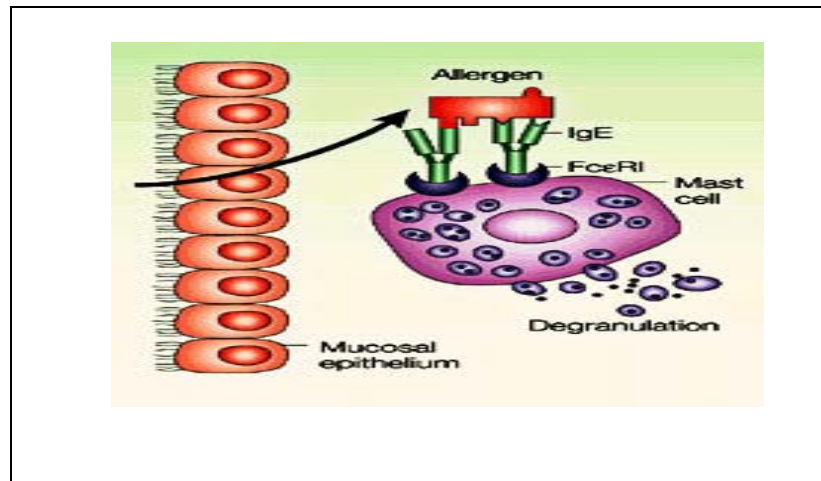


Figura 3: Reacción inmediata (Valenta, 2002)

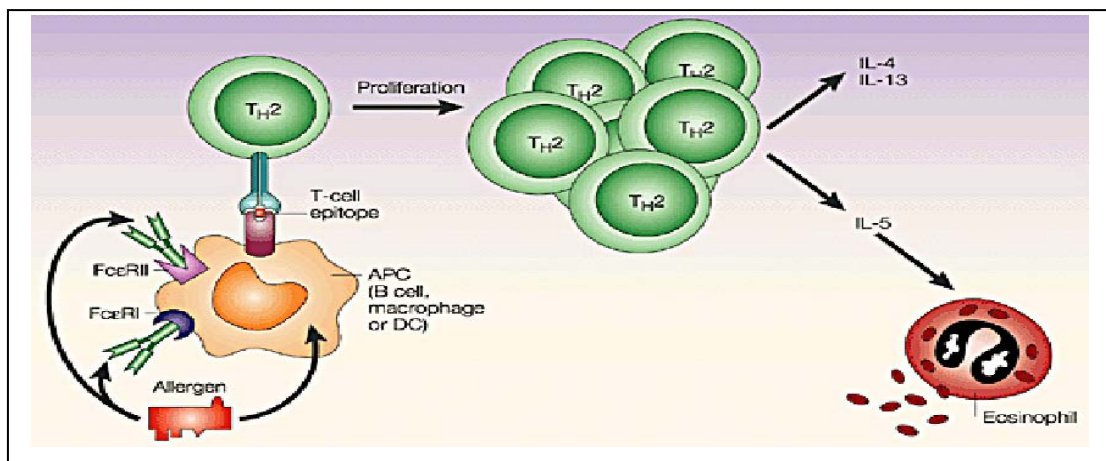


Figura 4: Reacción tardía (Valenta, 2002)

1.2.2: La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata

La IgE es el isotipo de anticuerpos que contiene la cadena pesada ϵ . Circula libremente, como anticuerpo bivalente en concentraciones inferiores a 1 pg/mL. En condiciones patológicas, como las infecciones por helmintos y la atopia, ésta concentración puede incrementarse hasta por encima de los 1.000 pg/mL. Su síntesis depende exclusivamente de la activación de las células T helper CD4⁺ y concretamente de la subpoblación de células TH2 y de su secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 (Abbas y cols., 1991).

Los individuos atópicos, contienen en circulación además de una mayor cantidad de células T secretoras de IL - 4, un incremento en su capacidad de síntesis, que en las personas no atópicas.

Revisión de conocimientos

La base genética de la predisposición a sintetizar IgE, se encuentra influenciada por varios genes (Feijen, 2000), mediante un probable patrón multigénico, de transmisión claramente autosómica, que involucra entre otros los siguientes cromosomas:

CROMOSOMAS	POSIBLES GENES INVOLUCRADOS
2q33	CD28
5q 23 q33	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-4R, GM-CSF, CD 14
5q32	Receptor β_2 adrenérgico
6p	Alelos MHC clase II (ϵ gen Ir?)
6p21.3	TNF- α
7p15.2	IL-6
9q31.1	Tropomyosin-binding protein
11q13	Cadena β del Fc ϵ RI
12q	IFN- γ
14q	TCR α
14q24	Asma – atopia*
16p12.1	IL-4R
19q13	CD 22
Xq28/Yq28	IL-9R
20p13	Asma – atopia

Adaptado de K. C. Barnes: I. Overview, epidemiology and basic science of systemic allergic inflammation. Evidence for common genetic elements in allergic diseases. J Allergy Clin. Immunol Volme 106. Number 5. November 2000
 * H. Hakornason. Am J Hum Genet 2002; 71:483-491

Tabla 1: Cromosomas y principales genes involucrados en la atopia

Las manifestaciones patológicas de la atopia, pueden presentarse en distinto grado en los miembros de una misma familia, pero siempre con el patrón común de disponer de elevadas concentraciones plasmáticas de IgE, en relación con la media normal (Feijen, 2000).

De esta forma el asma, una de las manifestaciones clínicas mas importantes del proceso alérgico, se caracteriza por una hiperreactividad de las vías respiratorias provocada por una obstrucción de las mismas que se encuentra asociada a la región cromosomica ADAM 33 (Van Eerdewegh y cols., 2002) y al cromosoma 20p13 (Jongepier y cols., 2004)

Es un patrón común, asociado con la heredabilidad del incremento de la concentración de IgE, específico de ciertos antígenos o alérgenos, lo cual conlleva a presuponer la implicación de determinados alelos del MHC de clase II.

1.2.3: Complejo mayor de histocompatibilidad MHC

El complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex: MHC*), se denomina “sistema HLA” (*Human Leukocyte Antigens*), se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.3 (Durham I, 1987). La expresión de estos genes, conduce a la agrupación en categorías de las moléculas HLA:

1.2.3.1: Moléculas de clase I:

Glicoproteínas de la superficie celular, que pueden agruparse en la super familia de las inmunoglobulinas y que tienen como característica una elevada conservación homológica estructural.

Constan de dos cadenas:

- α : glicoproteína polimórfica de 44 kDa, conteniendo 338 residuos de aminoácidos y en la que pueden diferenciarse 3 regiones:
 - 1-281 : región hidrofílica extracelular
 - 282-306: región hidrofóbica transmembranal
 - 306-338: región hidrofílica intracelular.

Se encuentra codificada por genes del complejo HLA del cromosoma 6 y se une en forma no covalente a una proteína no polimórfica de 12 kDa, que se corresponde a la β_2 microglobulina, codificada en el 15q21 (So, 1994)

La estructura genómica de los genes HLA de clase I (Kelly y cols., 1991), contiene al menos 17 genes, de los que 6 se encuentran asociados a productos de transcripción, que codifican para las moléculas clásicas y presentan un elevado polimorfismo, dependiente de las áreas étnicas y ubicación geográfica. Los 11 restantes son pseudogenes.

Genes que codifican para moléculas clásicas:

- HLA-A (41 alelos diferentes)
- HLA-B (61 alelos diferentes)
- HLA-C (18 alelos diferentes)

Genes que codifican para moléculas no clásicas:

- HLA-E.
- HLA-F.
- HLA-G.

Las moléculas clásicas HLA de clase I, se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleadas y su expresión se encuentra influenciada por citoquinas. Su función básica es la de presentación de fragmentos de antígenos procesados a la población linfocitaria CD8, fenómeno que se

reconoce como “restricción” y que permite que el antígeno sea reconocido, sólo en combinación con una determinada molécula de clase I. Una vez que se ha producido el proceso, se produce la citólisis de la célula presentadora.

1.2.3.2: Moléculas de clase II:

Se trata de glicoproteínas de superficie celular, encuadradas en la súper familia de las inmunoglobulinas, en forma de heterodímeros formados por dos cadenas glicoproteicas:

- cadena α : PM 35 kDa.; que presenta 2 dominios (α_1 y α_2), residuos 1-84 y 85-178 respectivamente y que se corresponden a la región hidrofílica extracelular.
- Cadena β : PM 28 kDa.; que presenta 2 dominios (β_1 y β_2), residuos 1-91 y 92-192 respectivamente y que se corresponden a la región hidrofílica extracelular.

Las regiones transmembranal hidrofóbica e intracelular hidrofílica, complementan la estructura de la glicoproteína. Ambas cadenas en asociación no covalente, están compuestas por 229 y 337 aminoácidos respectivamente.

Estructuralmente las moléculas de clase II, son similares a las de clase I; pero presentan sin embargo una conformación más abierta en el lugar de unión al antígeno, lo cual conlleva a que pueda interactuar con péptidos de elevado peso molecular (Brown y cols., 1993).

Su organización génica, presenta una región reguladora o promotor, que corresponde a una región reguladora HLA-D centromérica y tres subregiones teloméricas:

- HLA-DP
- HLA-DR
- HLA-DQ

que corresponden en los humanos a los genes:

- DP α y DP β .
- DR α y DR β
- DQ α y DQ β

Las tres secuencias de estos genes del promotor, persisten evolutivamente y son denominadas “boxes” (Y, X y W); encontrándose separadas por unos 20 pares de bases, con lo que los factores de transcripción podrían interactuar entre sí, siendo necesarias para la correcta expresión de los genes del HLA de clase II.

En general los genes del HLA de clase II de las diferentes subregiones presentan las siguientes estructuras:

Subregión HLA-DR: Contiene un único gen DRA de muy bajo polimorfismo y 9 genes DRB.

Subregión HLA-DQ: Contiene dos grupos de genes DQA y DQB, habiéndose establecido hasta la actualidad 14 alelos DQA y 19 alelos DQB. Los grupos de genes DQA2 y DQB2 son pseudogenes.

Subregión HLA-DP: Contiene dos grupos de genes DPA1 y DPB1, DPA2 y DPB2; siendo los últimos pseudogenes.

Las moléculas de clase II se encuentran distribuidas en las células inmunocompetentes como son las células B, las células presentadoras de antígenos (APC) macrófagos y células dendríticas, así como las células T activadas. Su función es la de presentación de fragmentos de péptidos antigénicos procesados a los linfocitos CD4 en el inicio de la respuesta inmune.

Aún cuando el número de moléculas de clase II del sistema MHC es limitado, sin embargo su funcionalidad principal es la de educación de los linfocitos T, dado que durante su proceso de proliferación y maduración en el timo, se desarrolla el receptor de la célula T. La ausencia de moléculas de clase II, conduce al síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, dado que la ausencia en el timo de éste tipo de moléculas, los linfocitos T y B no pueden interactuar con el sistema HLA y por tanto se eliminan, siendo afectados los pacientes de una linfopenia T.

1.2.3.3: Moléculas de clase III:

La región de la clase III, contiene los genes que codifican para las proteínas del complemento:

- C2.
- C4.
- Factor B.

Así como el gen para la citocromo P450 oxidasa (CYP), TNF α y β y las HSP70. Su estructura génica, la conforman dos grupos de genes A y B.

1.2.4: El receptor de la Inmunoglobulina E:

Los efectos biológicos de la IgE en la hipersensibilidad inmediata están mediados por la expresión de un receptor para el Fc de elevada afinidad de la cadena pesada ϵ ; que se denomina Fc ϵ RI que encontramos en forma constitutiva en los mastocitos y en los basófilos (Bieber, 1992); aún cuando también han sido descritos receptores Fc ϵ RI en células de Langerhans epidérmicas, macrófagos dérmicos, monocitos y eosinófilos activados; desconociéndose su funcionalidad (Bieber, 1992).

La constante de disociación (K_d) que presenta el $Fc\epsilon RI$ para la IgE es de aproximadamente 1×10^{-10} M. Es por ello, que aún cuando la concentración de IgE es muy baja ($1 \mu g/mL$ ó 5×10^{-10} M); es sin embargo lo suficientemente elevada para permitir la ocupación de los receptores $Fc\epsilon RI$.

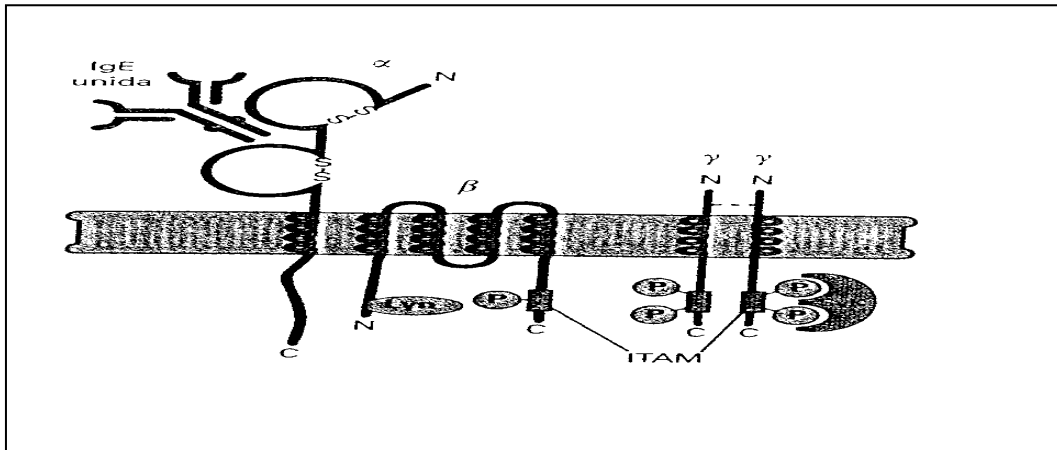


Figura 5: Estructura del receptor de alta afinidad de la IgE: $Fc\epsilon RI$

Immunología Celular y Molecular. Abbas A, Lichtman A H, Pober J. Mc Graw – Hill Interamericana 2002.

Cada molécula $Fc\epsilon RI$ está compuesta por 3 subunidades transmembranosas diferentes (Garman, 1998):

- Cadena α : que permite la expresión del receptor en la superficie de la célula.
- Cadena β : que atraviesa 4 veces la membrana.
- Cadena γ : 2 cadenas homólogas a la cadena ξ del complejo receptor para el antígeno de las células T.

La porción extracelular amino terminal de la cadena α contiene 2 dominios tipo Ig, que conforman el lugar de unión para la IgE y que es homólogo a los lugares de unión a la IgG de los receptores $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$. En los humanos la expresión habitual del receptor es $\alpha\gamma_2$, sin la cadena β (Blank, 1989).

La cadena β , contiene un único lugar de activación del inmunoreceptor vía tirosina, en el extremo carboxi terminal citoplasmático, denominado ITAM. Las dos cadenas polipeptídicas γ , se encuentran unidas por puentes disulfuro y la porción citoplasmática de cada cadena γ contiene un ITAM. Esta cadena γ , sirve como subunidad común para los $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RIII$ (Kinet, 1988).

La expresión de receptores $Fc\epsilon RI$, está regulada en mastocitos y basófilos por la IgE y la IL-4 en forma positiva (Paul y cols., 1993), lo que representa un mecanismo de amplificación de la respuesta inmunitaria en las infecciones parasitarias y en la hipersensibilidad inmediata.

Otro receptor de la IgE es el FcεRII; una proteína formada por una única cadena transmembranaria, relacionada con las lectinas de mamíferos de tipo C, cuya afinidad por la Ig E es 1.000 veces menor que el FcεRI. En la actualidad se han descrito 2 isoformas diferentes:

- FcεRIIA: específica de las células B.
- FcεRIIB ó CD23: cuya expresión es inducida en las células B, algunas células T, macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, plaquetas, monocitos y eosinófilos, por la IL-4.

En la actualidad las funciones del FcεRII están relacionadas con la disminución de la respuesta a IgE (Yu y cols, 1994; Mudde y cols, 1995)

1.2.5: Las células involucradas en la hipersensibilidad inmediata

1.2.5.1: Mastocitos

Los mastocitos derivan de progenitores presentes en la médula ósea (Costa y cols., 1997), que a través de la circulación, migran a los tejidos periféricos, como células inmaduras y se diferencian “in situ”. Los mastocitos maduros se encuentran preferentemente cerca de los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, por debajo del epitelio y también se encuentran presentes en los órganos linfoides. Microscópicamente tienen una variedad de formas, siendo común el núcleo redondeado y la presencia de gránulos citoplasmáticos, que contienen proteoglicanos ácidos, que se fijan a colorantes básicos, estando los mismos limitados por una membrana y cuerpos lipídicos.

Están en la actualidad descritas dos subpoblaciones de mastocitos (Irani y cols, 1986; Weidner y Austen, 1990) , que se diferencian por la localización anatómica y contenido de los gránulos y las acciones de sus mediadores.

	Población 1	Población 2
Características	Tejido conjuntivo	Mucosos
Localización	Piel Submucosa intestinal	Espacios alveolos Mucosa intestinal
Dependencia en desarrollo del fenotipo de células T	No	Si
Contenido de los gránulos	Proteasas neutras: Tryptasa Quimasa Carboxipeptidasa Cathepsina G	Proteasa mayor: Tryptasa

Tabla 2: Subpoblaciones de mastocitos humanos

Aunque no se conoce completamente el significado fisiopatológico de estas subpoblaciones (Galli y cols., 1999), es probable que los mastocitos mucosos estén implicados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata dependiente de las células T y la IgE, con afectación de vías respiratorias, como el asma y que los mastocitos del tejido conjuntivo es probable que medien reacciones cutáneas papulo-eritematosas y procesos vasculares agudos, inducidos por estímulos no inmunológicos.

Los mastocitos también pueden activarse directamente por varias sustancias, como las anafilotoxinas derivadas del complemento y especialmente el C5a, que se unen a receptores específicos de los mastocitos y estimulan la degranulación de la subpoblación del tejido conectivo, pero no de la subpoblación pulmonar.

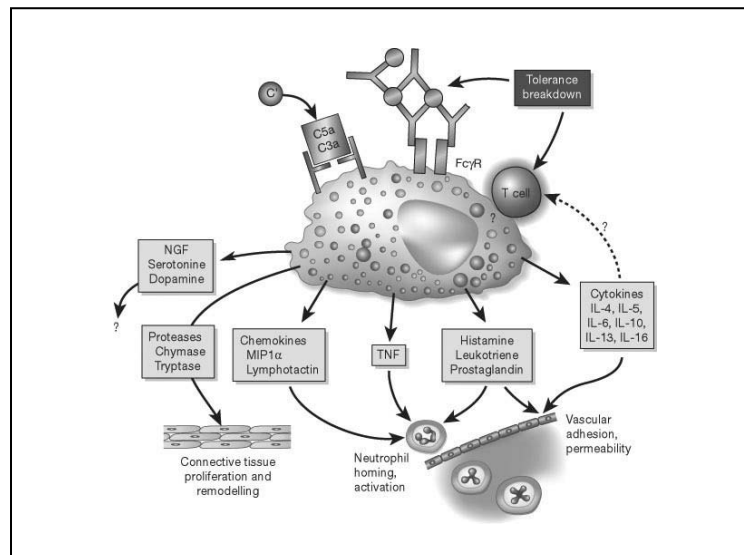


Figura 6: liberación mediadores del mastocito

1.2.5.2: Basófilos

Como otros granulocitos, los basófilos derivan de progenitores y maduran en la médula ósea, circulando en su forma diferenciada y representando menos del 1% del total de leucocitos sanguíneos circulantes y normalmente no se encuentran en tejidos. Al igual que los mastocitos, su citoplasma contiene gránulos, que fijan colorantes básicos y presentan la capacidad de síntesis de mediadores similares a los presentes en mastocitos.

Su rasgo más importante es el de expresar el receptor FcεRI y su ulterior reclutamiento a los tejidos en los que esté presente el antígeno, puede contribuir al desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La activación de ambos tipos celulares, mastocitos y basófilos, se realiza mediante el entrecruzamiento de moléculas de los FcεRI (Baird, 1999); proceso que se induce mediante la unión de antígenos multivalentes a las moléculas

de IgE fijadas a sus receptores. Efectivamente en los individuos no atópicos, la IgE asociada al mastocito o basófilo es específica para muchos antígenos diferentes y por lo tanto, es difícil que un antígeno aislado entrecruce suficientes moléculas de IgE para inducir la activación de la célula; mientras que en los atópicos ocurre una mayor probabilidad de entrecruzamiento entre moléculas de IgE.

Experimentalmente, la unión al antígeno puede reproducirse empleando anticuerpos anti FcεRI ó anti IgE polivalentes. Los anticuerpos anti IgE, pueden entrecruzar moléculas de IgE, con independencia de la especificidad del antígeno y dar lugar a una activación comparable de los mastocitos o basófilos en individuos atópicos y no atópicos.

1.2.5.3: Bioquímica de la activación de mastocitos y basófilos

La activación de mastocitos y basófilos, conduce a tres tipos de respuesta biológica:

- Secreción del contenido de los gránulos citoplasmáticos, mediante un mecanismo de exocitosis.
- Síntesis y secreción de mediadores lipídicos.
- Síntesis y secreción de citoquinas.

El mecanismo de señalamiento en mastocitos (Metcalf y cols., 1997), es similar al que se desarrolla entre el antígeno y los linfocitos y se inicia, a partir del resto carboxi-terminal de la cadena β del receptor FcεRI, que se encuentra constitutivamente asociado a la tirosina quinasa Lyn. Una vez producido el entrecruzamiento de las moléculas de FcεRI por el antígeno, la tirosina quinasa Lyn fosforila los ITAM de los dominios citoplasmáticos de las cadenas β y γ del FcεRI, para a continuación reclutar y activar la tirosina quinasa Syk, en los ITAM de la cadena γ, del FcεRI. Uno de los sustratos de la tirosina quinasa Syk es la isoforma γ de la fosfolipasa C (PLC_γ), específica del fosfatidilinositol, que cataliza la degradación del bifosfato de fosfatidilinositol en trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El trifosfato de inositol eleva las concentraciones del calcio citoplasmático, que en combinación con el diacilglicerol activa la proteína quinasa C. La fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina por la proteína quinasa C activada, separa los complejos actina-miosina situados debajo de la membrana citoplasmática, permitiendo de éste modo que los gránulos entren en contacto con la membrana plasmática.

El entrecruzamiento de las moléculas de FcεRI por el antígeno, activa también la enzima adenilato ciclasa, por medio de una proteína heterotrimérica de unión al trifosfato de guanosina. La adenilato ciclasa activada, eleva los niveles del adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que activa la proteína quinasa A, la cual en forma activada es capaz de inhibir la degranulación y conforma un ciclo de retroalimentación.

La síntesis de los mediadores lipídicos está controlada por la activación del enzima citosólico fosfolipasa A₂ (cPLA₂), que se produce bien por:

- Incremento del calcio citoplasmático.
- Fosforilación catalizada por proteína quinasa activada por mitógeno (MAP), como la quinasa activada por el receptor extracelular ERK.

Una vez activada la fosfolipasa A₂ (cPLA₂), se hidrolizan los fosfolípidos de la membrana para liberar sustancias, que son convertidas por acción de cascadas enzimáticas en los mediadores definitivos. La producción de citoquinas por los mastocitos activados, es una consecuencia de la transcripción de genes de citoquinas, que han sido inducidos. Efectivamente, la activación de varias moléculas adaptadoras por la tirosina quinasa Syk induce la translocación nuclear de NFAT (factor nuclear de las células T activadas) y del NF-κB (factor de necrosis κ), así como la activación de AP-1, mediante proteína quinasas activadas por “stress”, como la quinasa N-terminal c-Jun. En conjunto ésta respuesta conduce a la transcripción de varias citoquinas como la IL-4, IL-6 y TNF, entre otras, pero no de la IL-2, al contrario que en las células T.

Otras sustancias, como las que se especifican en la tabla 3; pueden activar los mastocitos y basófilos, independientemente del descrito y derivado del entrecruzamiento de IgE, mediada por alérgenos. Esta forma directa de activación del mastocito, induce una respuesta de hipersensibilidad no mediada por IgE, que incluso puede amplificar la propia respuesta mediada por IgE.

DESCRIPCION	EJEMPLOS	MECANISMO
Compuestos polibásicos	48/80 y mastoparén	Activación proteínas G
Péptidos	mellitina	Homología C _{H4} de la Ig E
Hormonas	corticotropina	Homología C _{H4} de la Ig E
Neuropéptidos	sustancia P, somatostatina	Excitación inervación
Complemento y fragmentos	C5a (mastocitos piel)	Anafilotóxico

Tabla 3: Activadores de mastocitos y basófilos directos

a) Mediadores de mastocitos y basófilos

Los mediadores involucrados y denominados de la hipersensibilidad inmediata, pueden clasificarse en:

a.1) Mediadores preformados:

Se trata de aminas biógenas, enzimas y macromoléculas, que se encuentran almacenadas en sus gránulos citoplasmáticos. Las aminas biógenas son compuestos de bajo peso molecular y naturaleza no lipídica, que comparten la característica estructural de poseer un grupo amino.

En los mastocitos humanos (Abraham y Arock, 1998), el único mediador de ésta clase, presente en cantidades significativas es la histamina y en algunos roedores la serotonina puede llegar a tener la misma importancia que la histamina en los humanos. La histamina realiza su acción biológica mediante su unión a receptores específicos, presentes en las células diana y de los que se conocen en la actualidad 4 tipos, denominados como H₁, H₂, H₃ y H₄. Tras su unión al receptor celular, se induce un señalamiento intracelular que conduce a la escisión del fosfatidilinositol en trifostato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG), induciendo distintos tipos de efectos en los diferentes tipos celulares diana. Su acción de corta duración, debido a su rápido metabolismo de arrastre del medio extracelular y sus principales efectos se especifican en la tabla 4.

CELULA DIANA	EFEECTO INDUCIDO
Endotelio	Contracción célula endotelial y extravasación vascular Síntesis relajantes de musculatura lisa vascular (PGI ₂) y óxido nítrico, que inducen vasodilatación
Músculo liso	Bronquios: broncoconstricción Intestino: hipermotilidad

Tabla 4: Principales efectos biológicos de la histamina

Otro grupo de mediadores preformados de naturaleza proteica, lo integran las peptidasas pertenecientes a la clase de las serin proteasas neutras, entre los más abundantes, se encuentran la triptasa y la quimasa. La presencia de triptasa en fluidos biológicos, se asocia como un marcador de activación mastocitaria, dado que sólo ha podido demostrarse su presencia en éste tipo celular en los humanos. Su función biológica, demostrada exclusivamente “in vitro”, se encuentra en relación con la escisión del fibrinógeno y la activación de la colagenasa; lo que podría explicar su contribución a la lesión tisular. La quimasa, del mismo modo, es un marcador clásico de discriminación entre subpoblaciones mastocitarias humanas. Análogamente su función biológica, sólo demostrada “in vitro”, se encuentra en relación con la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, lo que podría relacionarse con la degradación de la membrana basal epidérmica y la estimulación de la secreción de moco. Otras enzimas presentes, como la carboxipeptidasa A y catepsina G.

El tercer grupo de mediadores preformados lo integran los proteoglicanos, moléculas que poseen un núcleo polipeptídico y múltiples cadenas laterales no ramificadas de glucosaminoglicanos, que confieren una fuerte electronegatividad a la molécula. Heparina y condroitin sulfato, son los más abundantes y su actividad está relacionada como matriz de almacenamiento de aminas biogénicas, enzimas y otras moléculas con carga positiva y su función se encuentra asociada a la regulación de la actividad de las serin proteasas almacenadas en los gránulos y por tanto de su accesibilidad al resto de la estructura celular.

a.2) Mediadores de nueva síntesis:

Se trata de mediadores lipídicos, sintetizados *de novo*, tras la activación de mastocitos y basófilos, de los cuales los de mayor importancia son los derivados del metabolismo del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

El principal mediador derivado del ácido araquidónico, inducido por la acción de la ciclooxigenasa de los mastocitos es la prostaglandina D_2 (PGD_2); la cual actúa mediante su unión a receptores específicos presentes en las células musculares lisas, ejerciendo una acción broncoconstrictora y vasodilatadora, así como quimiotractante para los neutrófilos, que se acumulan en el foco de la inflamación. Su síntesis puede ser bloqueada mediante inhibidores de la ciclooxigenasa, como el ácido acetilsalicílico y los antiinflamatorios no esteroideos.

Los mediadores derivados del ácido araquidónico, inducidos por la vía de la lipooxigenasa en mastocitos y basófilos son los leucotrienos y especialmente el LTC_4 y sus productos de degradación LTD_4 y LTE_4 . El LTC_4 , es sintetizado por mastocitos mucosos y basófilos, pero no por los mastocitos del tejido conjuntivo. Este tipo de leucotrienos presentan receptores específicos en las células de la musculatura lisa, induciendo una broncoconstricción prolongada (McFadden y Gilbert, 1992). Cuando éste tipo de leucotrienos se inyecta en piel, inducen una reacción pápulo-eritematosa de larga duración muy característica; que corresponde al efecto biológico de la que antiguamente se denominaba como SRS – A (slow reacting substance of anaphylaxis) y que en la actualidad se ha demostrado que corresponde al conjunto LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 ; principal mediador de la broncoconstricción asmática. La posible razón de la exacerbación de la broncoconstricción inducida por el ácido acetilsalicílico, pudiera deberse a la desviación del metabolismo del ácido araquidónico hacia la vía de 5-lipooxigenasa, al resultar inhibida la vía de la ciclooxigenasa; lo cual incrementaría la producción de leucotrienos.

Un último apartado de los principales mediadores lipídicos, producidos por los mastocitos, es el denominado factor activador de las plaquetas (PAF); que debe su nombre a su característica inicialmente descrita, de inducir la agregación plaquetaria en el conejo. El PAF en los mastocitos y basófilos, se sintetiza a partir de la acilación del lisogliceril éter de fosforilcolina; un derivado de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, mediado por la actuación del enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2). Sus principales efectos biológicos son la broncoconstricción directa y la retracción de las células del endotelio, que conduce a la relajación de la musculatura lisa vascular, así como también la acumulación de leucocitos inflamatorios. Su mecanismo de acción está relacionado con la activación de la vía de ciclooxigenasa II (inducible) y su consiguiente mecanismo de retroalimentación. La elevada característica hidrofóbica del PAF, le confiere una elevada metabolización a partir del enzima plasmático PAF acetil hidrolasa. La principal fuente de producción de PAF parece asignarse a los basófilos, así como también a las células del endotelio vascular, que lo liberan una vez que se haya producido su estimulación, por la histamina o los leucotrienos.

a.3) Citoquinas:

La producción de citoquinas por mastocitos y basófilos contribuye al fenómeno inflamatorio, característico de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Entre las citoquinas preformadas, la más importante es el denominado factor de necrosis tumoral (TNF - α); que es liberado inmediatamente de los gránulos tras el entrecruzamiento de los Fc ϵ RI y cuyos efectos biológicos más importantes son la activación de la expresión endotelial de las moléculas de adhesión, responsables de los infiltrados secuenciales de células polimorfonucleares y mononucleares; así como el reclutamiento de subpoblaciones Th2 que conducen a la generación de la denominada fase tardía de las reacciones de hipersensibilidad, a la que se suman las citoquinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP - 1 α y MIP - 1 β , GM - CSF; que son sintetizadas “de novo”, tras la activación de mastocitos y basófilos (Yazdanbakhsh y cols., 2002).

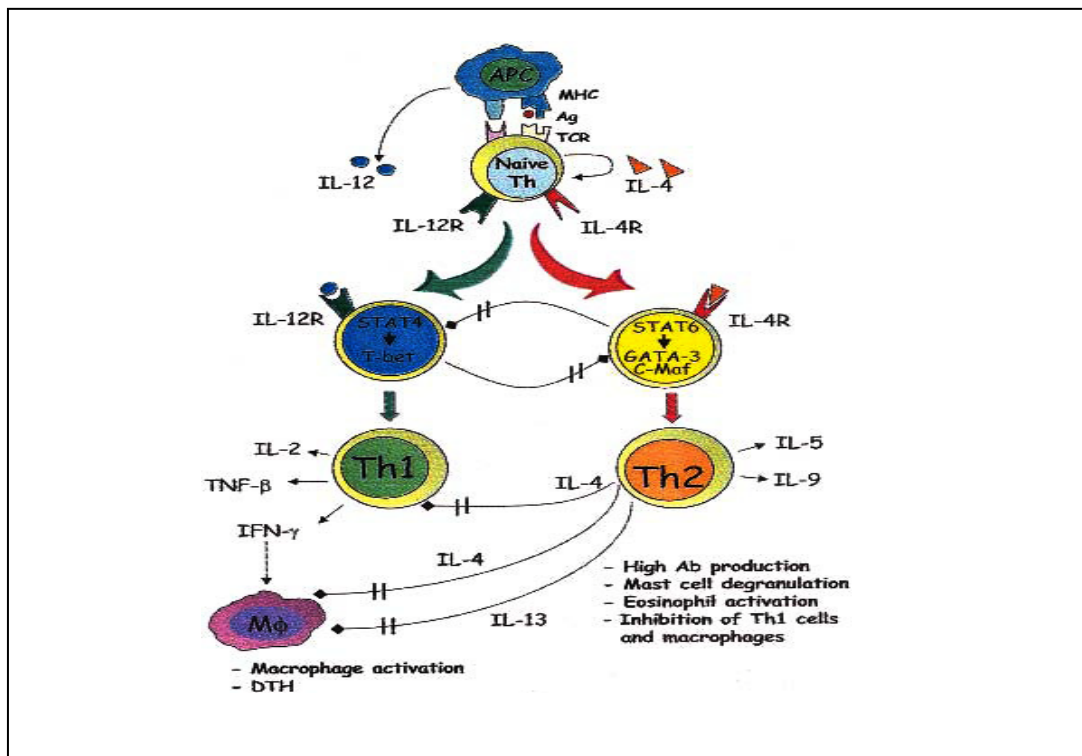


Figura 7: Liberación interleuquinas.Regulación (Romagnani, 2004)

1.2.5.4: Eosinófilos

Este tipo celular, abundante en los infiltrados inflamatorios de fase tardía; tiene su origen en la médula ósea y tras su maduración a partir de sus precursores mieloides, circulan en sangre diferenciándose por la acción del GM - CSF y las IL-3 e IL-5 (Ying, 1997). Su presencia es normal en los tejidos periféricos y en especial en los revestimientos mucosos de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Su activación y reclutamiento hacia las zonas de inflamación en las reacciones de fase tardía, es mediada por las citoquinas producidas por las subpoblaciones Th2 (Constant y cols., 2000); lo

cual contrasta con las reacciones de hipersensibilidad retardada o celular, que está mediada por la subpoblación T_H1 y en las que intervienen la activación de los macrófagos. Es precisamente, la presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios y los tipos celulares T_H1 y T_H2 ; los principales factores discriminatorios de ambas reacciones.

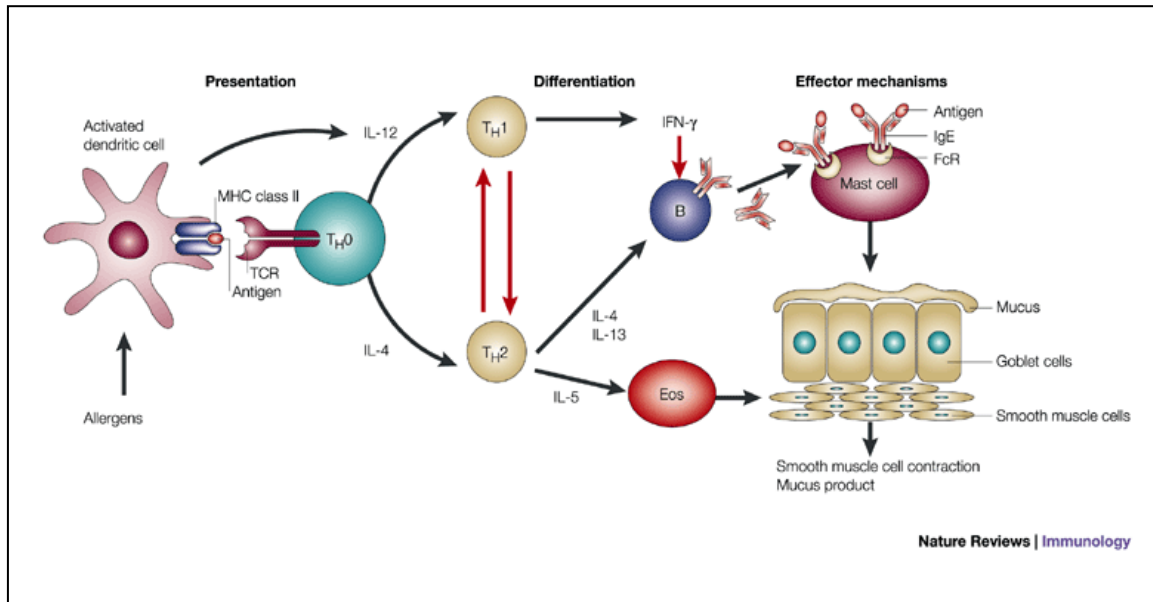


Figura 8: Fase tardía. Liberación mediadores (Marsha Wills-Karp, 2001)

La activación de los eosinófilos, depende fundamentalmente de las mismas citoquinas que intervienen en su maduración y fundamentalmente de la IL-5; que los transforma a una forma hipodensa y de un tamaño incrementado, con respecto a su forma habitual. Su reclutamiento e infiltración en las células endoteliales, viene definido por la expresión en las mismas de la selectina - E, a la cual se unen, al igual que los neutrófilos; siendo el factor diferenciativo entre ambos tipos celulares, la expresión por parte de los eosinófilos del ligando VLA - 4 (CD49dCD29) que se adhiere a las células vasculares que expresan la molécula de adhesión VCAM - 1. La IL-4, es capaz de inducir la expresión de la molécula de adhesión VCAM - 1 en las células del endotelio, sin inducir la expresión de la selectina - E.

Otros factores de activación, que intervienen en el reclutamiento y la infiltración, son las quimoquinas, como la eotaxina, la proteína quimiotáctica de los monocitos 5, el C5a y los mediadores lipídicos PAF y LTB₄; así mismo ha sido demostrada la existencia de factores potenciadores, como es el caso de la IL-5, que incrementa la respuesta de los eosinófilos a la eotaxina.

Los eosinófilos expresan receptores de Fc para la Ig G, Ig A e Ig E; aún cuando no parecen ser sensibles a la activación por entrecruzamiento entre receptores, mediada por el antígeno, a diferencia de lo que hemos significado en los mastocitos y basófilos (Kinet, 1999). Sus gránulos contienen hidrolasas lisosómicas, como la peroxidasa que cataliza la producción de ácido

hipocloroso y proteínas específicas, como la catiónica (ECP) y la proteína principal básica (BPP); ambas especialmente tóxicas para los helmintos y bacterias, así como para los tejidos circundantes. En su forma activada, los eosinófilos, producen y liberan mediadores lipídicos con propiedades antiinflamatorias, muchos de los cuales poseen propiedades vasoactivas que incrementan los efectos biológicos de los mediadores producidos por los mastocitos y basófilos. En particular la producción de éste tipo de mediadores es por vía de la 5 y 15 lipooxigenasa, que conduce a la producción del LTC₄ y sus derivados LTD₄ y LTE₄, potentes estimuladores de la actividad vasomotora, bronconstricción y secreción de moco. PAF y citoquinas, como la IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM - CSF, MIP - 1 α , TNF - α , RANTES y eotaxina han sido descritas., aún cuando no se conoce su significación biológica (Wardlaw y cols., 1995).

1.3 Alérgenos. Origen y obtención

La mayoría de los alérgenos son proteínas o glicoproteínas con una masa molecular de 5 a 100 kDa, y con puntos isoelectricos ácidos que no se distinguen especialmente de otras moléculas proteicas. Sin embargo, existen una serie de características que pueden favorecer que una proteína o sustancia en general actúe como alérgeno: capacidad para alcanzar el sistema inmune, complejidad molecular, concentración, solubilidad, extrañeza del organismo, estabilidad y características bioquímicas, entre otras. También pueden actuar como alérgenos, hidratos de carbono y componentes de bajo peso molecular que por su fuerte reactividad se conjugan con proteínas del huésped y actúan como haptenos. Los alérgenos también pueden aparecer como resultado de la interacción de un fármaco. (Holgate, 1993).

La sensibilización a un alérgeno no solo depende de características intrínsecas a el, sino también de su presencia conjunta con factores ambientales como humo, polución o factores ligados a la inmunidad del individuo como predisposición genética, infecciones, inmunodepresiones debidas a patologías o tratamientos médicos, situaciones de estrés, etc. Las fuentes mas complejas de alérgenos son el polen, los hongos y los ácaros, de los que de un 20% a un 60% de sus proteínas son alergénicas. Otros alérgenos menos complejos son epitelios de animales, orinas, etc. (Holgate, 1993)

1.4 Diagnostico en alergia

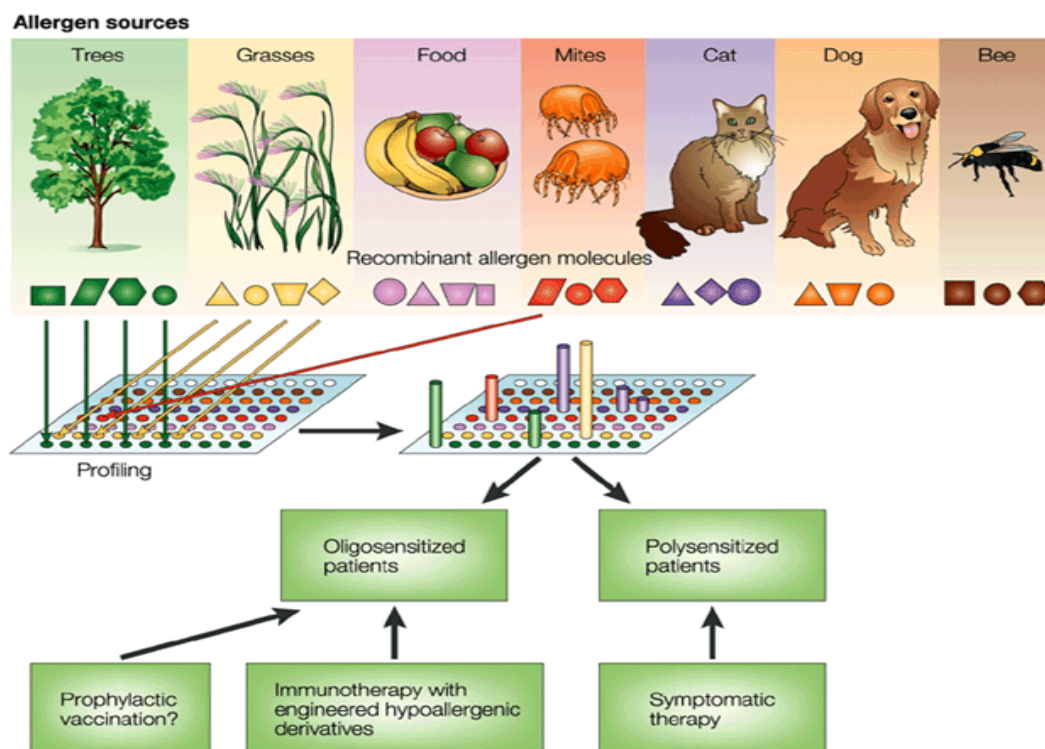
Los alérgenos se definen como antígenos capaces de inducir una respuesta inmune mediada por Ig E y el método estándar de oro capaz de determinar una sensibilidad alérgica es la prueba cutánea y la determinación de inmunoglobulina E alérgeno específica en suero. Los alérgenos presentes en una fuente alergénica presentan dos características funcionales en base a su capacidad fijadora de inmunoglobulina E, que les permite su clasificación de relevantes, cuando su prevalencia es superior al 5% y mayores, cuando su capacidad fijadora de inmunoglobulina E es superior al 50% o bien cuando inducen una prueba cutánea inmediata positiva en más del 90% de los pacientes sensibilizados a la fuente alergénica.

Los extractos alergenicos son obtenidos a partir de fuentes naturales o fuentes de sensibilización (van Ree, 1996) y están formados por componentes de

naturaleza proteica principalmente hidrosolubles y que dependiendo de sus estructura podrían presentar una reactividad cruzada con otras fuentes alérgicas, tal es el caso de las profilinas (Valenta, 1991) y por tanto éste apartado debe ser cuidadosamente valorado en vía a conseguir diagnosticar la fuente de sensibilización primaria e idealmente el alérgeno causal.

En la década pasada se han producido multiples líneas de investigación, que han permitido disponer de las actuales bases de datos en las que se encuentran las principales características físico-químicas y funcionales de los alérgenos y al mismo tiempo, tras la elucidación de sus estructuras y las técnicas recombinantes, se ha conseguido describir los alérgenos con mayor relevancia clínica (Hiller, 2002), pero que en cualquier caso los estudios deben de referir al alérgeno nativo las características que se muestren por parte de los alérgenos recombinantes.

La disponibilidad de alérgenos recombinantes ha permitido avances excepcionales en la investigación de los alérgenos presentes en las fuentes alérgicas y de éste modo se ha podido acelerar y describir en muchos casos cuales de los alérgenos presentes en un extracto alergenico son los implicados en las manifestaciones clínicas. La aplicación de los llamados “microarrays”, capaces de detectar un elevado numero de posibles agentes causantes de alergia con cantidades muy pequeñas de material biológico es un claro ejemplo del futuro en la investigación clínica actual (figura 8).



Nature Reviews | Immunology

Figura 9: Paneles con alérgenos para ensayos microarrays (Hiller, 2002)

2. LOS HONGOS

2.1 Biología de los hongos:

Los hongos son eucariotas desprovistos de clorofila, heterótrofos (saprofitos o parásitos), unicelulares o más típicamente filamentosos, con paredes celulares quitinosas o de otros glúcidos complejos y que realizan su nutrición por adsorción y presentan tipos de reproducción tanto sexual como asexual. Los hongos, dentro de la taxonomía, son considerados un reino aparte, evolutivamente diferentes del vegetal y del animal, siendo el carácter diferenciativo la capacidad de sintetizar quitina (Burge, 1992).

El principal papel que juegan los hongos en el ecosistema es la degradación de la materia orgánica muerta y su reincorporación al suelo. Algunos hongos, sin embargo son parásitos y patógenos.

La patogenia de los hongos es muy variada. Existen patógenos primarios (*Histoplasma*, *Coccidioides*) y patógenos oportunistas (*Candida*), o aquellos cuyos antígenos producen enfermedades, como aquellos que producen alergias. Muchos hongos producen metabolitos que causan serios daños a la salud. Sin embargo, muchas especies son utilizadas en la industria para producir medicamentos como antibióticos, o metabolitos de interés comercial como ácidos orgánicos o etanol, así como la elaboración de alimentos (vino, cerveza, queso, etc.) o para consumirlos directamente.

Los hongos presentan una distribución amplia y ubicua, pueden vivir prácticamente en cualquier lugar donde exista humedad y materia orgánica, incluso en forma de líquenes hasta en las rocas antárticas y en un amplísimo intervalo de temperaturas (-5 a 50°C). Uno de los principales parámetros que afectan al desarrollo de los hongos es la humedad que debe ser mayor de 70%, aunque existen especies xerofílicas, y las especies que crecen en interiores suelen ser capaces de crecer en ambientes menos húmedos.

Los hongos son conocidos y utilizados desde antiguo. Una de las más importantes civilizaciones antiguas, la civilización micénica, debe su nombre a un hongo. En 1729 Pier. A Micheli publicó su obra "*Nova Plantarum*" donde incluyó amplias investigaciones sobre hongos. Asimismo, desde antiguo se han utilizado setas como alucinógenos en ritos religiosos y levaduras en las fermentaciones, así como se han conocido efectos devastadores en la agricultura (royas, mildius, carbones y otros fitopatógenos). En 1800, A. Bassi hizo los primeros descubrimientos sobre micopatología y a finales del XIX (Torres Rodríguez JM, 1984) R. Saboraud sistematizó los estudios en micopatología en su obra "*Les Teignes*" de 1910 (Martínez, 1986).

2.2 Clasificación y características principales:

Existen 80.000 especies conocidas de hongos que se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios y que a pesar de su diversidad, solo se conocen dos unidades básicas. Las levaduras tienen una estructura típicamente unicelular y, en general, se reproducen por división central o por gemación. Sin embargo los hongos más comunes están formados por hebras ramificadas de 3 a 10 mm de anchura denominadas hifas y el agregado de las hifas se le denomina micelio. Los hongos que forman micelio suelen clasificarse en dos grupos

artificiales: setas y mohos u hongos filamentosos. El termino moho designa aquellos tipos que carecen de estructuras reproductivas macroscópicas, pero que pueden producir colonias visibles u otros tipos de crecimiento vegetativo (Burge, 1992).

Los hongos presentan reproducción sexual y asexual por medio de esporas de ambos tipos. También los fragmentos de hifas juegan un importante papel en la diseminación. Las esporas asexuales pueden ser esporangiosporas, si se desarrollan en estructuras cerradas (esporangios) o conidioesporas, si se forman en estructuras abiertas (conidios), siendo en general, las esporas de los hongos comunes más alergénicos las que son producidas asexualmente.

En el transcurso de su ciclo vital los mismos microorganismos producen de forma habitual esporas asexuales y sexuales a partir de estructuras morfológicas diferentes denominadas, respectivamente, fase imperfecta (anamórfica) y perfecta (teleomórfica). A menudo ambas fases no se dan a la vez y dependiendo de las condiciones de crecimiento, una u otra pueden resultar suprimidas o designadas como microorganismos distintos. Dado que la actual clasificación de ciertos hongos esta basada en aspectos morfológicos, por no conocerse su fase perfecta, no refleja necesariamente relaciones naturales. Los tipos específicos se agrupan como géneros de tipo, familias de tipo, ordenes de tipo y así sucesivamente dentro de la clase de tipo *Fungi imperfecti* o Deuteromicetos. Esta clasificación supone un orden artificial ya que muchos de estos hongos no tienen fases sexuales identificadas. Estas clasificaciones proporcionan una base poco firme para analizar relaciones alergénicas entre especies.

Como grupo, los Deuteromicetos son de un interés considerable en referencia a su relación como fuentes alergénicas sensibilizantes en los procesos de alergia. El grupo incluye géneros de suma importancia alergénica como *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Stemphylium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Epicoccum*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Los hongos patógenos *Candida albicans* y *Coccidioides immitis* son también hongos Deuteromicetos. La taxonomía de los deuteromicetos esta basada principalmente en las características de sus conidios (perfil, color y reptación). (Hawksworth DL, 1995);(Ainsworth GC, 1973)

3. LOS HONGOS COMO ALERGENOS

3.1 Aerobiología de los hongos:

Los hongos como causantes de reacciones alérgicas se conocen desde antiguo. En 1726 Sir John Floyer observó síntomas de asma en pacientes que acababan de visitar una bodega. En 1873, Blackley sugirió que *Chaetomium* y *Penicillium* eran especies asociadas con ataques de asma. En 1924, van Leguen observó la relación del clima con el asma y encontró una correlación entre la aparición de esporas de mohos en la atmósfera y los ataques de asma de la población. En la década de los años 30, Prince y cols (Prince 1934) y Feinberg (Feinberg, 1935) observaron que el aire de exteriores era una fuente importante de alergia a hongos y demostraron que muchos de sus pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas frente a extractos de hongos. A lo

largo de la historia se han encontrado mas de 80 géneros de hongos asociados a procesos alérgicos (Koivikko, 1983). En Estados Unidos son causa de sensibilización en mas del 80% de la población asmática (López, 1985) y la especie *Alternaria alternata* es una de las formadoras de esporas atmosféricas mas comunes en la zona del medio-oeste (O'Hollaren MT, 1991) y en España es aproximadamente el 20% de los pacientes con alergia (D'Amato, 1997)

En el medio ambiente, el ser humano esta expuesto a más de 100 especies de hongos, bien suspendidos en el aire o asociados a otros sustratos. Los contajes de esporas en el aire suelen exceder en 1.000 veces a los de granos de polen. Se pueden alcanzar niveles de mas de 125.000 esporas por metro cúbico de aire (Gregory, 1973). Además el contaje de esporas sigue un ciclo estacional alcanzando las máximas concentraciones en verano y otoño. Estudios realizados en Estados Unidos muestran como muchas ascosporas y esporas de hongos imperfectos aparecen durante los periodos calidos del inicio de la primavera. Después de este pico inicial persiste su aparición durante los meses de verano, dándose un segundo pico en los meses de otoño. Estos datos han sido confirmados en Europa. Las variaciones estacionales de la flora fúngica en interiores refleja la composición en exteriores pero con menores variaciones (Nilsson, 1978).

Por otra parte, existen otras partículas fúngicas como restos de hifas y partículas procedentes del metabolismo de estos organismos que pueden pasar a estar en suspensión aérea y por lo tanto entrar en contacto con pacientes sensibilizados o susceptibles de serlo. El tamaño de los conidios (2-100 μ m) hace posible su inhalación y su profunda penetración por las vías respiratorias. En concreto el tamaño de las esporas de algunas especies es (longitud x anchura).

Las esporas fúngicas se pueden encontrar tanto en interiores como en exteriores. En los Estados Unidos, varios estudios han demostrado que *Alternaria* y *Cladosporium* son los géneros atmosféricos mas comunes (Nilsson, 1983; Cole, 1984), asociándose al asma una posible sensibilización con *Alternaria*. (Robert K. Bush, 2004). El patrón de esporas exteriores refleja la composición en el exterior, además existe una flora fúngica independiente dominada por Deuteromicetos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y levaduras.

Sin embargo, en países tropicales pueden no existir algunas especies, por ejemplo, en Nigeria *Cladosporium* es prácticamente inexistente (Olonitola, 1994). En muestreos domésticos en Inglaterra y Escocia, especialmente en aquellos hogares con aire acondicionado, las densidades de los conidios excede incluso la del exterior (450.000 propágulos por metro cúbico) (Nilsson, 1983). En estudios pormenorizados de presencia de especies en el aire a nivel de España (Torres Rodriguez JM., 1982) y fuera de España, se confirma la tendencia antes descrita (Gravesen, 1983; Beaumont, 1985)

Sin embargo no existe una correlación exacta entre la frecuencia de aeroalérgenos fúngicos de diferentes especies y reactividad de las mismas. Así Einarsson (Einarsson, 1992) indica que *Alternaria* es el género mayormente involucrado en procesos de alergia inmediata mientras que *Penicillium* se considera un alérgeno fúngico de importancia menor aunque en ocasiones

ostente una mayor presencia tanto como alérgeno de interiores como de exteriores (Tarlo, 1988) Lopez y Salvaggio (Lopez, 1985), indican como principales hongos alergenicos *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Rhizopus* y *Mucor* seguidos de algunos Ascomicetos y algunos Basidiomicetos por este orden. Asimismo, Karlsson-Borga y cols (Karlsson-Borga, 1989) en dos grupos de pacientes procedentes de Escandinavia y Estados Unidos demostraron diferentes sensibilizaciones.

En cuanto a los Basidiomicetos existe evidencia de su papel como productores de alergia (Horner, 1995). Como especies importantes citaremos por este orden, *Schleroderma*, *Coprinus*, *Psilocybe*, *Inonotus*, *Ganoderma*, *Boletínellus*, *Agrocybe*, *Boetius*, *Armillaria*, *Pleurotus*, *Amanita*, *Chlorophyllum* y *Cantharellus*.

Una variedad de técnicas han sido desarrolladas para abordar la cuantificación de esporas en la atmósfera. Inmunoensayos alérgeno específicos que utilizan anticuerpos monoclonales frente a los mencionados alérgenos no siempre revelan la cantidad de alérgeno resuspendido en la atmosfera, ya que la actividad alergenica puede estar distribuida a traves de otros componentes fungicos incluyendo los fragmentos miceliares. Incluso tales componentes podrian estar asociados a particulas en suspensión. Aunque estos ensayos todavía no han conseguido la fiabilidad que ya tienen ensayos similares para otros alérgenos (Barnes C, 2000)

3.2 Diagnostico e inmunoterapia de alergia a hongos:

Aas et al (Aas, 1980), utilizando la tecnica del prick en pruebas cutaneas (SPT) y la determinación de IgE especifica mediante tecnica RAST en 80 niños asmáticos con historia clínica de alergia a hongos, observaron que, dependiendo de la calidad del extracto usado, la frecuencia de reacciones positivas fueron: *Alternaria* 10-35%, *Aspergillus* 10-43%, *Cladosporium* 13-65%, *Mucor* 1-28% y *Penicillium* 3-33%. La correspondencia con el RAST positivo fue de 59, 63, 86, 40, y 56%, respectivamente.

La primera vez que se estableció una clara relación causa-efecto entre los hongos y la alergia fue en los años 80 del presente siglo en los trabajos de Malling y cols. (Malling, 1985; Malling, 1986; Malling, 1987; Malling, 1988) quien observo que la severidad de la enfermedad alérgica estaba en relación con la aparición de esporas (Malling, 1992).

Existen múltiples dificultades en el diagnostico y, aun mas, en el tratamiento especifico mediante inmunoterapia. Así, frecuentemente se puede observar ausencia de reactividades cutáneas a los extractos fúngicos habituales en pacientes con una clínica evidente de alergia a mohos o paciente claramente reactivos a extractos fúngicos que no responden satisfactoriamente a la inmunoterapia, por lo que no esta establecida la exacta prevalencia de este tipo de alergia. Existen variedad de resultados dependiendo de la población estudiada, los extractos utilizados y las especies utilizadas (Horner, 1995). Se puede ver como la frecuencia de reactividades depende de la fuente del alérgeno, así como de los criterios de selección de pacientes. Por ejemplo, las reacciones a extractos comerciales de *Cladosporium herbarum* varían de 0 a

12% en la misma población (Aas, 1980). Asimismo, en extracto miceliar de *Epicoccum nigrum*, detecto sensibilización en un 70% de individuos del cual solo un 6% reaccionaron a un extracto comercial.

Mishra et al (Mishra, 1992) indican dos factores fundamentales que podrían explicar estos hechos. En primer lugar, los patrones de exposición a las especies de hongos son, hasta la fecha virtualmente desconocidos y, en segundo lugar, los alérgenos fúngicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas han sido producidos en base a conocimientos parciales, tanto en relación a la exposición de especies alérgicas como de la naturaleza de los componentes provocadores de la enfermedad.

De hecho, la verdadera incidencia de la alergia a hongos no se conoció hasta que no se dispuso de extractos estandarizados para estudiar poblaciones bien definidas. Estos extractos siguen métodos de estandarización que están basados en la comparación de un extracto patrón o de referencia (IHR) por medio de la aplicación de una serie de pruebas cutáneas de prick o intradérmicas sobre voluntarios alérgicos a la fuente alérgica. La producción de los extractos posteriores se realiza tomando como referencia el IHR y usando métodos inmunoquímicos que, como principal herramienta, empleando la IgE del suero de los pacientes seleccionados (van Ree y Aalberse, 1999)

La exposición en interiores, exteriores y en lugares de trabajo puede inducir sensibilidad a hongos. Por lo tanto, la variedad de hongos posibles productores de alergia es mucho mayor que la que pueda incluirse de manera práctica en un panel de pruebas cutáneas. Esto resalta la importancia del muestreo ambiental. Sobre la base de estudios aerobiológicos llevados a cabo en diferentes partes del mundo, pruebas cutáneas y estudios de alérgenos, existe un consenso sobre las especies que se deben utilizar. Estas son como mínimo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium solana* y *Penicillium chrysogenicum*.

Las pruebas de provocación a hongos pueden ser un buen método de diagnóstico pero pueden dar lugar a falsos positivos (Spector, 1979). Estas pruebas pueden ser nasales, bronquiales y conjuntivales con extractos alérgicos. También se han empleado pruebas de inhalación desarrollada por Harris (Harris, 1940) con *Alternaria*., al esparcir por la habitación un cierto número de esporas y mantenerlas circulando por medio de ventiladores. Nilsson y Aas (Nilsson, 1978) proponen que la prueba de provocación bronquial es frecuentemente necesaria para alcanzar un diagnóstico decisivo en pacientes en los cuales otras pruebas son equivocadas.

A pesar del desarrollo de las técnicas de diagnóstico “*in vitro*” e “*in vivo*”, el diagnóstico de alergia a hongos aun es difícil ya que la mayoría de los pacientes están constantemente expuestos a una amplia variedad de propágulos y muchos sujetos reaccionan frente a alérgenos inhalantes de origen no fúngico. Adicionalmente pueden aparecer síntomas debidos a hongos cuya aparición no es estacional. Estos factores eclipsan cualquier correlación entre la aparición de esporas de hongos y los síntomas.

La mayor evidencia de la eficacia de la inmunoterapia en la alergia a mohos la presentaron Malling y cols. en Escandinavia (Malling, 1985; Mallin, 1986; Mallin, 1987; Mallin, 1988), estudiando 22 pacientes asmáticos con evidencia clínica de alergia a *Cladosporium*, pruebas cutaneas en prick positivos y positivos asimismo a pruebas de provocación bronquial. Estos autores realizaron un control a doble ciego y placebo. La inmunoterapia fue iniciada con dosis de 10 UB hasta 100.000 UB. Se observó mejora clínica en el 81% del grupo tratado frente al 27% del grupo placebo.

También se han realizado estudios que confirman la utilidad de la inmunoterapia en el tratamiento de la alergia a *Alternaria* (Cantani, 1988; Horst, 1990). De todas formas, la inmunoterapia, especialmente con extractos fúngicos, ha sido asociada con una alta frecuencia de efectos colaterales. Otros estudios (Kaad, 1982; Ostergaard, 1986) también registraron reacciones de este tipo. Muchas de estas reacciones pueden ser debidas no a los alérgenos sino a sustancias irritantes presentes en el extracto.

4. Alérgenos de hongos

A pesar de la gran cantidad de hongos productores de alergia existen relativamente pocos alérgenos caracterizados y purificados, realmente solo algunos de los pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *Calvatia cyathiformis*, *Psilocibe cubensis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Horner, 1995). Se han hecho estudios particulares en otras especies aunque no se ha llegado a la purificación y caracterización de alérgenos.

4.1 *Alternaria alternata*

Alternaria es uno de los hongos más importantes desde el punto de vista de la alergia. Es extremadamente común y cosmopolita. Crece como saprofito en plantas, alimentos, suelos y textiles. Su intervalo de temperaturas de crecimiento es de 2-32°C, siendo su óptimo de 25°C (Gravesen, 1994).



Figura 10: crecimiento medio selectivo

Las dictiosporas de *Alternaria* son abundantes y conocidas productoras de asma (Licorish, 1985). Alcanzan su mayor abundancia en zonas de cultivo de cereales llegándose a detectar de 500 a 1.000 esporas por metro cúbico de aire en días secos de finales de verano y otoño (Nilsson, 1983). Si bien se conocen muchas especies de *Alternaria*, *Alternaria alternata* (*tenuis*) es la mas estudiada desde el punto de vista de la alergia. Este hongo puede provocar fenómenos de hipersensibilidad tipo I y III e infecciones muy extrañas, pudiendo actuar también como fitopatógeno (Gravesen, 1994).



Figura 11: micelio de *Alternaria alternata* (microscopia electrónica)

La selección de la cepa, la composición del medio de cultivo y las condiciones del mismo, presentan una importancia crucial en la expresión de los alérgenos que presenta *Alternaria alternata*, dada su variabilidad antigénica y pleomorfismo (Palacios et al. 1986).

El alérgeno mayor de *Alternaria alternata* (Alt a 1) reacciona con la Ig E sérica en el 82% de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata* (De Vouge, 1996) y fué aislado por primera vez por Yunginger y cols (Yunginger y cols, 1980). Se trata de una glicoproteína heterogenea de 30 kDa con al menos 5 isoformas, de pI 4-4,5. Alérgenos con propiedades similares han sido descritos en *Alternaria alternata* (Curran, 1993; Nyholm, 1983; Steringer, 1987) y la purificación de Alt a 1 se realizó partiendo de extractos miceliares.

Paris y cols (Paris, 1991; Paris, 1990a; Paris, 1990b) designaron el alérgeno Alt a 1₁₅₉₆ (31 kDa, pI 4-4,5), comprobando que se trata de una proteína termorresistente que contenía un 20% de restos glucídicos y que se localiza en el citoplasma del micelio y esporas. Deards y Montague (Deards, 1991) designaron este alérgeno como Alt a Bd29K (29 kDa, pI 4,2) y determinaron que estaba compuesto de subunidades de 15 y 12 kDa. Martinez y cols (Martinez, 1994b) mostraron que el alérgeno Alt a 1 se aísla en mayor cantidad en extractos procedentes de filtrado de cultivo.

Zhang y cols (Zhang y cols, 1995) demostraron la presencia de un epitopo en la fracción N-terminal del alérgeno Alt a 1. De Vouge y cols (1996) han clonado y expresado en *Pichia* una subunidad del alérgeno Alt a 1. Recientemente se han descrito nuevos avances en la purificación de Alt a 1

natural (nAlt a 1) y recombinante (rAlt a 1) (O. Duffort, 2002; Asturias y cols., 2003) como principal objetivo para el desarrollo de ensayos Alt a 1 específicos que a posteriori permitan la cuantificación del mencionado alérgeno en extractos de *Alternaria alternata*, así como la estandarización para su uso en el diagnóstico y la inmunoterapia específica.

5. REACTIVIDAD CRUZADA

Es un hecho conocido el que los pacientes alérgicos a hongos lo son, generalmente, a varias especies a la vez. El término reactividad cruzada indica la presencia de epítomos similares en diferentes especies. Esto puede ser una de las causas de la reactividad múltiple que presentan estos pacientes. Sin embargo, la reactividad cruzada debe ser diferenciada de la polisensibilización paralela, es decir, del caso en el que el paciente presenta reactividad debido a su exposición a cada una de las especies a las que es alérgico independientemente. Esto último no es extraño ya que, por una parte, un paciente que se haya expuesto a un ambiente favorable para el crecimiento y dispersión de un hongo, se verá expuesto a otras muchas especies de hongos que comparten ese nicho ecológico debido a la gran ubicuidad y abundancia de estos seres vivos. Por otra parte además de la multiexposición, hay que tener en cuenta el hecho de que un paciente atópico se trata de un individuo especialmente susceptible a la sensibilización por antígenos, por lo que es de esperar que no solo presente sensibilización a varias especies de hongos sino incluso también a otros alérgenos no fúngicos a los que se haya expuesto.

No obstante, tanto la reactividad cruzada como la polisensibilización son indiferenciables desde el punto de vista clínico. En ambos casos todas las pruebas *in vivo* dan resultados igualmente positivos, por lo que aun existe la controversia de conocer si este hecho se debe principalmente a uno de los fenómenos anteriormente descritos.

La reactividad cruzada es posible estudiarla o detectarla *in vitro* por estudios inmunoquímicos que impliquen una inhibición competitiva de la unión de los anticuerpos por el antígeno (Inhibición del RAST, inhibición del ELISA, Inhibición del blotting (Einarsson, 1992).

El grado de reactividad cruzada dependerá del número e importancia relativa de los epítomos comunes de ambos extractos. Teóricamente es esperable que existan más epítomos comunes cuanto mayor sea la proximidad filogenética de las especies a estudiar, es decir, se espera que la reactividad cruzada sea mayor entre diferentes cepas que entre diferentes especies, y a su vez, mayor que entre diferentes géneros (Aukrust, 1984). Sin embargo, no se puede descartar la reactividad cruzada entre hongos y alérgenos no fúngicos debido a componentes presentes en una gran cantidad de seres vivos.

La presencia de epítomos comunes entre alérgenos es favorable para el diagnóstico, ya que reduce el número de antígenos necesarios en el panel de extractos. Por lo tanto, un número razonablemente pequeño de alérgenos que compartan epítomos comunes, serían capaces de detectar la reactividad a un elevado panel de hongos.

Se han llevado a cabo varios estudios de reactividad cruzada entre diferentes grupos, tanto relativos a antígenos como a alérgenos. En 1969, Biguet y cols (Biguet, 1964) realizaron uno de los primeros estudios de similitud antigénica sobre especies del género *Aspergillus*. Kim y Chaparas (1979), trabajando con especies de este mismo género (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fumigatus* var. *ellipsoideus*, *Aspergillus phialiseptus* y *Aspergillus flavus*) se encontraron que el 89% de los antígenos de *Aspergillus fumigatus* eran comunes a todas las cepas y variedades de esta especie, mientras que la similitud entre especies es mucho menor (19-35%). La reactividad cruzada estuvo asociada principalmente con las fracciones glicoproteicas y carbohidratos.

En algunos casos no se ha encontrado reactividad cruzada entre diferentes especies, tal es el caso entre *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, y *Penicillium* (Martinez, 1994a), utilizando Inhibición del RAST e inhibición del ELISA con sueros experimentales.

Por el contrario, existen otros estudios que indican la presencia de reactividad cruzada entre especies diferentes. Por ejemplo, se han encontrado muchas similitudes entre géneros relacionados morfológicamente como *Alternaria* y *Ulocladium*, demostrándose la presencia de Alt a 1 en ambas especies (Gravesen, 1983). Por inhibición del RAST, Agarwal y cols (1982) vieron que *Alternaria* y *Stemphylium* contenían muchos antígenos comunes, entre ellos Alt a 1. Otros estudios no han encontrado reactividad cruzada medida por inhibición del RAST o en inmunoblotting con inhibición entre *Aspergillus* y *Cladosporium* ni entre *Aspergillus* y *Alternaria* y si encuentran entre *Alternaria* y *Cladosporium* (Tee, 1987). Posteriormente se ha estudiado la relación entre *Fusarium solani* y otros hongos y se han encontrado varios determinantes antigénicos comunes entre *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus fumigatus* (O'Neil, 1987). Un estudio demostró reactividad cruzada entre *Fusarium solani* y *Epicoccum.nigrum*, ambos inhibieron a *Wallemia sebi* en RAST pero *Wallemia* solo inhibió parcialmente a *Aspergillus fumigatus* (Karlsson-Borga, 1989) así como entre *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Quindos, 1993). También se ha descrito este fenómeno entre extractos de medio de cultivo de *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium moniliforme* (Verma, 1994). Shen y cols (1996) encontraron reactividad cruzada entre los alérgenos mayores de tres especies de *Penicillium*, y Brower (Brower, 1996) también encontró reactividad cruzada entre *Aspergillus* y *Penicillium*.

Con la llegada de herramientas como los anticuerpos monoclonales y policlonales monoespecíficos, se ha utilizado esta herramienta para el estudio de la reactividad cruzada y la similitud antigénica entre hongos. En concreto, Kumar y cols (1993) obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a antígenos glicoproteicos de *Aspergillus fumigatus* que reaccionaron con *Penicillium*, *Candida* y otras especies de *Aspergillus fumigatus*.

Recientemente, mediante la aplicación de técnicas de secuenciación génica y proteica de alérgenos, se han podido demostrar similitudes entre diferentes componentes de diferentes especies. Esta similitud génica puede estar en la base de la reactividad cruzada de éste modo se han encontrado alérgenos comunes entre *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum* (Breitenbach, 1995).

OBJETIVOS

Revisados los antecedentes sobre las enfermedades alérgicas y los alérgenos y más concretamente de hongos y específicamente de *Alternaria alternata*, se deduce y concluye la importancia de disponer de los alérgenos de relevancia clínica más importantes presentes en la fuente alérgica, adecuadamente caracterizados y purificados para su uso prioritario en el diagnóstico mediante pruebas cutáneas, principal herramienta que establece un diagnóstico etiológico de la enfermedad alérgica.

En base a ello el estudio del alérgeno mayor de *Alternaria alternata*, Alt a 1, objeto de ésta Memoria, se plantea cumplir los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- 1.- Desarrollar un procedimiento de purificación del alérgeno mayor Alt a 1 del hongo *Alternaria alternata*, conformando las características de rendimiento y caracterización, así como de seguridad de la fuente alérgica que lo contiene, que permita su uso diagnóstico mediante pruebas cutáneas.
- 2.- Establecer las principales características del alérgeno mayor Alt a 1, que permitan conocer su comportamiento cinético, tanto “in vivo” mediante pruebas cutáneas por prick test, como “in vitro” mediante técnicas de electroforesis y enzimoinmunoensayo, comparativamente con los extractos alérgicos obtenidos a partir de la fuente alérgica *Alternaria alternata*.
- 3.- Demostrar la presencia o ausencia del fenómeno de reactividad cutánea del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata* con otras especies de hongos representativas aerobiológicamente como neumalérgenos.
- 4.- Definir los parámetros de eficacia y seguridad de uso del alérgeno mayor Alt a 1 con carácter diagnóstico mediante pruebas cutáneas.
- 5.- Comprobar la especificidad y sensibilidad del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, mediante ensayos con antisueros experimentales y sueros humanos, así como mediante el empleo de pruebas cutáneas con el alérgeno mayor Alt a 1 y los extractos obtenidos a partir de *Alternaria alternata*.
- 6.- Estudiar la prevalencia de la sensibilización al hongo *Alternaria alternata* en una población de la isla de Gran Canaria, así como otras variables en relación con la prevalencia, como la monosensibilización, polisensibilización, concordancia entre prueba cutánea y nivel de Ig E sérica específica de *Alternaria alternata*, distribución por edades y sexo y estacionalidad.
- 7.- Evaluar la rentabilidad clínica, estableciendo los valores predictivos positivos y negativos, del diagnóstico de la sensibilidad a *Alternaria alternata* mediante pruebas cutáneas con el alérgeno mayor Alt a 1.

8.- Diseñar un algoritmo diagnóstico de estudio en sensibilidad a hongos y específicamente a *Alternaria alternata* en la población canaria.

9.- Ampliar el conocimiento de las sensibilizaciones y polisensibilizaciones asociadas a la alergia a hongos atmosféricos, tomando como referencia el estudio de prevalencia propuesto de incidencia del hongo *Alternaria alternata* en la isla de Gran Canaria.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION Y PROCESADO DE LA FUENTE ALERGÉNICA

1.1: Obtención del extracto

La fuente natural de materia prima conteniendo esporas y micelio de *Alternaria alternata* (CBS no. 103.33) se adquirió de Allergon (art. 1001, Allergon, Engelholm, Suecia)

1.2: Homogeneización

Previo a su homogeneización, la materia prima se disolvió en tampón de Coca (10 g Cloruro sódico, 4 g de Bicarbonato sódico, 4 mL de Tween 20 y 1 litro de agua desionizada) y ulteriormente se procedió a su homogeneización mediante un proceso de rotura con aspas en un aparato Politron PT 2100 (Kinematica AG) en dos ciclos de 1 minuto a 4°C.

1.3: Extracción

El homogeneizado fue posteriormente sometido a extracción hidrosoluble con tampón de Coca al que se le añadieron 1 µg/mL de pepstatin A (ref L9783, Sigma) 1 µg/mL de leupeptina (P5318, Sigma) y PMSF a 1mM (phenylmethilsulfonyl fluoride) (P7626, Sigma) como inhibidores enzimáticos de proteasas. El proceso se efectuó mediante agitación magnética a una temperatura de 4° C, durante 5 horas.

1.4: Filtración y diálisis

La fracción hidrosoluble se sometió a centrifugación de 8.400 g x 30 min. a 4° C, en una centrifuga Rotanta RS (Hettich), tras la cual se descartó el sedimento.

El sobrenadante obtenido fue sometido a filtrado con vacío, en un conjunto de embudo Buchner y matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore AP (Millipore).

El filtrado obtenido fue sometido a un proceso de diálisis en una membrana con un limite de exclusión de 7.000 Da (Medicell International), durante 12 horas a 4° C frente a agua desionizada

Tras una posterior filtración con un filtro de un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore), se procedió a su congelación a - 80° C, (Sanyo MDF - 235).

1.5: Estabilización

La estabilización se realizó mediante un proceso de liofilización en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Telstar) según una receta específicamente diseñada, cuyas características son expresadas en la tabla nº 1.

DESCRIPCION	TEMPERATURA (° C)	VACÍO (mbar)	h: min.
Preparación bandejas	- 30		
Congelación	- 40		0:30
Congelación	- 40		3:00
Prep. Condensador	- 50		0:10
Vacío Cámara		0.200	
Secado primario	- 5	0.200	5:00
Secado primario	10	0.200	8:00
Secado primario	30	0.300	8:15
Secado primario	30	0.300	7:0
Test final secado primario	30	0.300	0:5
Secado secundario	30		4:0
Secado secundario	30		5:0
Test final secado secundario	30		0.5

Tabla 5: Receta de Liofilización

1.5.1: Determinación de parámetros analíticos

1.5.1.1: Humedad relativa:

La humedad relativa de las muestras liofilizadas, se realizó de acuerdo a la descripción del método de Karl-Fischer; el cual utiliza el reactivo del mismo nombre (originalmente en relación 1:3:10 una mezcla de yodo + dióxido de azufre + piridina en etanol), que al reaccionar cuantitativa y selectivamente con el agua, permite conocer y medir su contenido en la muestra problema. Para ello se empleó un equipo de valoración volumétrica de agua Crison, modelo Compact KF I Titrator (Crison). El procedimiento se realizó sobre la base de los programas definidos por el fabricante:

Nº programa	operación
"20"	estandarización
"16"	titración

y dada la sustitución de la piridina en el reactivo iodosulfuroso R original, por otros compuestos básicos Hydranal (Sigma-Aldrich Química):

- Standard => xileno + butanol
- Tritant => metanol
- Solvent => imidazol, anhídrido sulfuroso, metanol

Se procedió conforme a lo indicado en la Real Farmacopea Española (RFE, 1997) a su validación previa, para posteriormente de aplicar los programas “20 y 16”, disponer de los datos de humedad relativa de la muestra.

1.5.1.2: Contenido proteico:

El contenido proteico fue valorado mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Su fundamento es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el Azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm, cuando se une a las proteínas. Para ello se empleó el kit “Bio-Rad Protein Assay” (BIO-RAD Lab), que de acuerdo con las instrucciones del fabricante, emplea como recta patrón BSA a diferentes concentraciones (0; 2; 4; 6; 8; 10 µg/mL) sobre la que se compara la muestra y cuyas lecturas se realizan a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU 640 (Beckman-Coulter).

1.5.1.3: Contenido en azúcares:

La determinación de azúcares (hexosas) se realizó mediante la técnica de la Antrona, según la modificación introducida por Chung y Nickerson (Chung, 1954). Para ello se empleó antrona (0.2 g) de calidad analítica (Merck 1468), sobre ácido sulfúrico frío (100 mL), de calidad analítica (Probus). Una vez disuelta en su totalidad la antrona (30 – 60 minutos) en condiciones de temperatura ambiente, se extrajeron 5 mL que se añadieron a la muestra de extracto alergénico de *Alternaria alternata* (1 mL) en un tubo de ensayo (Pyrex). La mezcla fue sometida a agitación y mantenida en baño de hielo, hasta comprobarse su homogeneidad. Tras el calentamiento de la mezcla homogénea a 100° C durante 10 minutos y su posterior enfriamiento, se procede a su lectura en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU 640 (Beckman-Coulter) a una longitud de onda de 540 nm. La solución estándar o patrón que se empleó fue de glucosa anhidra, de calidad analítica (GI 125 Scharlau), ajustada a concentraciones de 0; 12.5; 25; 50; 100 y 200 µg/mL en agua destilada; las cuales siguieron el mismo tratamiento que las muestras de extracto alergénico.

El cálculo se realizó mediante la recta de regresión calculada entre las absorbancias y las concentraciones de glucosa empleadas como patrón. Los resultados se expresan en el % de hexosas por peso de muestra.

2: IDENTIFICACION DE ALÉRGENOS

2.1: Determinación de pesos moleculares. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)

2.1.1: Fundamento teórico:

Cualquier molécula cargada se desplaza al ser expuesta en un campo eléctrico. Dado que las proteínas son moléculas con carga neta a cualquier pH distinto del punto isoelectrico, estas migran en un campo eléctrico dependiendo de su densidad de carga (relación entre carga y masa). De este modo, se utiliza esta característica de las proteínas para llevar a cabo su separación.

Actualmente los soportes mas utilizados son los que participan activamente en el proceso de separación al interaccionar físicamente con las partículas de migración (almidón, agarosa, poliacrilamida), cuyo tamaño de poro es el orden del tamaño de las moléculas a separar y que proporcionan, por tanto, la posibilidad de separar proteínas según su carga y tamaño. Entre ellos, el soporte de acrilamida es el que mayores ventajas ofrece: elevada pureza de sus reactivos constituyentes, es químicamente inerte, estable en amplios rangos de pH, temperatura y fuerza iónica, transparente y, además, permite la formación de gradientes precisos.

Los geles de poliacrilamida (abreviada como bisacrilamida), que reacciona con los grupos funcionales libres de las cadenas terminales. El compuesto TEMED cataliza la formación de los radicales libres del persulfato, necesario para que se inicie el proceso de polimerización.

La mayoría de los estudios que emplean electroforesis zonal de proteínas lo hacen mediante el empleo de condiciones desnaturalizantes, de modo que las proteínas son disociadas y analizadas en sus unidades polipeptidicas individuales. Estos métodos, conocidos como electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS PAGE) son ampliamente utilizados y se encuentran muy estandarizados.

2.1.2: Descripción de la SDS PAGE:

Básicamente se emplea el método originalmente propuesto por Laemmli (Laemmli, 1970) con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal utilizados para Mini-Protean II (Bio-Rad).

2.1.2.1: Tampones y soluciones:**1.5 M Tris-HCl; pH: 8.8 (Sepaador)**

Tris base	27.23 g (18.15/100 mL)
Agua destilada	150 mL
Ajuste a pH 8.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C.	

0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8 (Apilador)

Tris base	6 g
Agua destilada	100 mL
Ajuste a pH 6.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C	

SDS (dodecilsulfatosódico) al 10%

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

Tampón de tratamiento ("Sample buffer")

Agua destilada	4 mL
0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
2-β-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL

Tampón de electrodos pH: 8.3 (5X)

Tris base	9 g (15 g/ L)
Glicina	43.2 g (72 g/L)
SDS	3 g (5 g/L)
Agua destilada	600 mL

Almacenamiento a 4° C y se calienta a 37° C si se produce precipitación
Se diluyen 60 mL de tampón stock 5X con 240 mL de agua destilada.

Solución de Azul de Coomassie (Tinción)*

Azul de Coomassie R-250	1 g
Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de tinción: 60 minutos a 50° C o 12 horas a temperatura ambiente.

*si se emplea la tinción propuesta por el fabricante "Biosafe de Coomassie" (Bio-Rad), el gel debe de previamente lavarse 3 veces con agua destilada y añadir posteriormente la tinción, manteniéndola durante 1 hora y desteñir a continuación el gel con agua.

Solución decolorante

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de decoloración: entre 1 y 3 horas.

2.1.2.2: Montaje de las placas:

De acuerdo a las instrucciones del equipo Mini-Protean II dual slab cell

2.1.2.3: Preparación de los geles: Sistema discontinuo

Gel Separador “running gel” (porcentaje de acrilamida 12.5%) => cantidad para 2 geles de 0.75 mm

Acrilamida (40%) 29:1	2.8 mL
Tris HCl 1.5 M pH: 8.8	1.7 mL
Agua destilada	2 mL
SDS 10%	66 µL

Persulfato amónico (fresco)	70 µL (30 mg/mL) => 3%
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	14 µL
Cantidad por placa	3.2 mL
Tiempo de polimerización	10 minutos
INTERFASE: 40 µL de Butanol/agua por cada lado de la placa	

* El porcentaje de acrilamida se establece en función del peso molecular de la muestra que es objeto de estudio. Se utiliza un porcentaje de acrilamida del 12,5% cuando la muestra tiene un peso molecular relativo que oscila entre los 15 y los 95 kDa. Cuando la muestra tiene un peso molecular mas elevado se reduce el porcentaje de acrilamida, superando siempre el porcentaje establecido para el gel preparador, y cuando el peso molecular es inferior al anteriormente señalado se aumenta dicho porcentaje.

El grosor del gel se ajusta en proporción a la cantidad de proteína que pongamos, utilizando para este fin cristales diseñados para este uso

Gel Apilador o Concentrador “stacking gel” (porcentaje de acrilamida 4%) => cantidad para 2 geles de 0.75 mm

Acrilamida	0.7 mL
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.7 mL
Agua destilada	4.2 mL
SDS 10%	66 µL

desgasificación 10 minutos => Polimerización:

Persulfato amónico (fresco)	70 µL
Tetrametilendiamina (TEMED)	14 µL

2.1.2.4: Preparación de las muestras:

Las muestras se disuelven en el tampón de muestra, a una concentración de unos 0,5 a 2 mg/mL de proteína calculada según el método Bradford (Bradford, 1976), llevándose a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Tras su enfriamiento, los restos insolubles se eliminan por centrifugación a 14.000 r.p.m, en una centrifuga Micro (Helltich) durante 5 minutos, descartándose el precipitado.

El patrón de pesos moleculares se recompone así mismo en el tampón de muestra, debiendo previamente a su empleo haber alcanzado los 100° C durante 5 minutos.

2.1.2.5: Condiciones electroforéticas:

Tras el rellenado de la cubeta interior con el tampón de electroforesis y añadiendo el resto a la cubeta; se dispensa el patrón y las muestras en las calles con una pipeta en un volumen de 10 µL. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 200 voltios durante 30 – 45 minutos, en función del frente de migración que presenta el azul de bromofenol. En ese momento se desconecta la fuente y se extrae el gel de entre las dos placas.

2.1.2.6: Tinción:

El gel se coloca en una placa de Petri y se añade la solución colorante de Coomassie, en dos protocolos:

- Rápido: 1 hora a 60 °C
- Lento: 24 horas a temperatura ambiente

El exceso de colorante es retirado mediante la solución decolorante hasta que el fondo del gel quede casi transparente (1 – 3 horas) y puedan ser visualizadas adecuadamente las bandas del patrón y de las muestras.

2.1.2.7: Determinación de Pesos Moleculares:

Se realiza de acuerdo al método propuesto por Weber y Osborn (Webber, 1969), construyendo una recta de calibrado, que representa la movilidad (en mm) de una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (PM conocido). La movilidad se mide desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda.

Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ($r > 0.90$), el peso molecular de las proteínas o péptidos de la muestra problema se determina a partir de sus movilidades.

Las proteínas empleadas como patrones, cuando se utilizaron geles al 12,5% de acrilamida fueron adquiridas a Amersham biosciences, referencia 17-0446-

01 correspondientes a unos estándares de pesos moleculares, que se especifican en la tabla siguiente:

Amersham biosciences referencia 17-0446-01	
Proteínas	Pesos moleculares (kDa)
Fosforilasa b	97.0
Seroalbúmina bovina	66.0
Ovoalbúmina	45.0
Anhidrasa carbónica	30.0
Inhibidor de tripsina	20.1
Lisozima	14.4

Tabla 6: Estándares de pesos moleculares

2.2: Transferencia de bandas proteicas, separadas por electroforesis a membranas Inmovilizantes. Western blot

2.2.1: Fundamento teórico:

El proceso se define como la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a un filtro (matriz o membrana de inmovilización) que puede ser sometido a los tratamientos necesarios para la identificación de las bandas. Esto lleva consigo las siguientes ventajas (Gershoni y Palade, 1983):

- a) Los filtros son más manejables y flexibles.
- b) Las proteínas inmovilizadas son fácilmente y por igual accesibles a varios ligandos (ya que se obvian las limitaciones introducidas por la porosidad de los geles de gradiente)
- c) Generalmente se requieren menores cantidades de reactivos.
- d) Los tiempos de los procesos (incubaciones y lavados) se reducen significativamente.
- e) Se pueden hacer múltiples replicas del mismo gel.
- f) Las transferencias se pueden guardar durante periodos de tiempo considerables.
- g) La misma transferencia se puede utilizar para múltiples análisis sucesivos.
- h) Y lo más importante de todo, la transferencia es susceptible de análisis que de otra forma serian muy difíciles o imposibles de efectuar en los geles.

Las membranas pueden ser de diferentes tamaño de poro: 0,45 μm ; 0,22 μm (son los mas habituales). A poro más pequeño hay más retención de proteína (conveniente cuando se trabaja con moléculas de bajo peso molecular) pero dificulta o limita la interacción de los anticuerpos.

La unión proteica a la membrana no es covalente, por lo tanto, es probable que con los sucesivos pasos del protocolo (bloqueo, lavados...) se pierda una proporción significativa de la proteína retenida a la membrana. Algunos materiales parecen presentar ventajas sobre otros; por lo que si esto presenta un problema en los experimentos se pueda probar con membranas de difluoruro de polivinilideno, como por ejemplo Hybond (Amersham biosciences (PVDF) que presentan una mayor capacidad de adsorción y fijación de proteínas, que las convencionales de nitrocelulosa y/o nylon.

2.2.2: Descripción. Inmunotransferencia (Western blot)

Es el procedimiento mas utilizado actualmente para la transferencia. La inmunotransferencia se basa en la electroelución de las proteínas del gel. Esto es posible por el hecho de que las proteínas (en contraste con el DNA) se adsorben a la membrana, incluso en tampones de baja fuerza iónica. Por lo tanto, se pueden electroeluir las proteínas fuera del gel hacia los filtros en condiciones que no necesitan corrientes eléctricas impracticablemente altas. Hay que hacer constar que la electroelución de macromoléculas para la inmunotransferencia fue usada por primera vez por Arnheim y Southern en 1977.

El tampón de transferencia más tradicional es el descrito por Towbin y cols (1979): Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%. El metanol inhibe el hinchamiento del gel y mejora la resolución de la inmunotransferencia, pero estos porcentajes pueden producir que se elimine el SDS de las proteínas llegando a precipitar en gel. Esto no es problema en el caso de las proteínas pequeñas, pero en el caso de que se quieran transferir proteínas con un punto isoelectrico alcalino o un peso molecular de más de 100 kDa se recomienda reducir el contenido en metanol (a menos de 10%). También se puede añadir SDS a la solución de transferencia.

Las proteínas pequeñas (<20 kDa) normalmente transfieren bien independientemente de los porcentajes de metanol. Sin embargo se deben tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Limitar el tiempo en el tampón de transferencia (menos de 10 min.) porque pueden migrar rápidamente sin fuerza iónica.
- Para evitar la perdida a través de la membrana (Blow-trough): Tampón de transferencia con 20% de metanol que aumenta el tabicamiento (partitioning) de la proteína a la membrana.
- Reducir la intensidad de corriente a la mitad para que haya más tiempo para interaccionar con la membrana.

En resumen cuando la proteína a transferir es grande se debería migrar la muestra en geles de acrilamida de bajo porcentaje, reducir la cantidad de metanol, aumentar la intensidad de corriente y transferir durante más tiempo. Cuando la proteína es pequeña, metanol al 20%, menos carga y menos tiempo de transferencia.

Para proteínas grandes y básicas se puede utilizar un tampón de transferencia compuesto de CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico) 10 mM y metanol 5%-10% pH 10,5-11 (Matsudaria, 1987).

Para transferir geles nativos se debe eliminar por completo el metanol del tampón de transferencia

El empleado en estos experimentos es el método descrito por Towbin (Towbin y cols., 1979), en un equipo de transferencia Bio-Rad compuesto por:

- Mini Trans-blot electrophoretic transfer cell.
- Mini Protean II cell ó Trans-blot semi-dry transfer cell.
- Power Pac 200

2.2.3: Método de transferencia semiseco

- a) Preparación del Tampón de Transferencia (Schafer-Nielsen y cols., 1980) compuesto por:

Glicina 39 mM	5.82 g
Tris 48 mM	2.93 g
SDS 1.3 mM	3.75 mL al 10%
Metanol 20% (v/v)	200 mL
Agua destilada completar hasta	1 L

pH del tampón 9.2; que nunca debe de ajustarse con ácidos o bases y puede almacenarse a 4° C.

- b) El gel de poliacrilamida, una vez finalizada su electroforesis, debe de ser equilibrado para retirar las sales y restos de detergente, que incrementarían la conductividad de la transferencia. Para ello el gel de poliacrilamida debe de sumergirse en el tampón de transferencia durante al menos 10 minutos; siempre que su grosor sea de 0.75 mm. Si el gel fuera mas grueso el tiempo seria mayor.
- c) La membrana de PVDF y el papel de filtro protean KL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), deben de cortarse 1 o 2 cm mas grande que el gel de poliacrilamida. Dadas las características hidrófobas de la membrana de PVDF, debe de someterse a un pretratamiento de:

Metanol	15 segundos
Agua destilada	1 minuto

Tampón de Transferencia >2 minutos

- d) Colocación de los componentes de la transferencia en la placa del aparato:
En primer lugar el papel de filtro Protean XL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), embebidos en el Tampón de Transferencia. La membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y otro de papel de filtro.
- e) La transferencia se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre 10 – 15 V (3 mA/cm²) y nunca excederá de 25 V. Este valor se obtiene tras la medida del área del gel, que al multiplicarse por la constante 5.5 y dividirse por 1.000, nos indica el número de mA requeridos. El tiempo aproximado de transferencia no debe ser superior a los 45 minutos.
- f) Una vez finalizado el proceso de transferencia, se retira la membrana de PVDF, bien para ser teñida o procesada para inmunodetección

2.2.3.1: Tinción de membranas de PVDF transferidas: directa

- a) Solución de tinción Negro Amido (Amido Black 10 B; Panreac, al 0.1%):
Amido Negro 10 B 0.2 g
Solución decolorante 200 mL
- b) Solución decolorante:
Metanol 900 mL
Ácido acético glacial 20 mL
Agua destilada 80 mL

Se coloca la membrana de PVDF en la solución de tinción durante 10 minutos y posteriormente se traslada la misma a la solución decolorante, hasta que el fondo quede claro. Retiramos en ese momento la membrana y la dejamos secar.

2.2.3.2: Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible

Las membranas pueden así mismo teñirse con la solución de Ponceau, para ello deberán de sumergirse en una solución al 0.5% de rojo Ponceau, 1% de ácido acético durante un minuto y ulterior desteñido con agua destilada hasta conseguir un contraste óptimo. La tinción puede retirarse completamente con una solución de hidróxido sódico 0.1 N.

2.2.4: Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF

Se procedió de acuerdo al protocolo de Shen (Shen, 1988), con ligeras modificaciones:

- a) Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, la membrana de PVDF se corta en las diversas calles que van a ser incubadas individualmente.

- b) Se procede a un proceso de saturación de la membrana, para evitar las uniones inespecíficas de las inmunoglobulinas o de los conjugados inmunoglobulina – enzima. Para ello, la membrana de PVDF se incubó bien con tampón PBS-Tween 0.1%, bien con BSA 1% PBS-Tween 0.05%, o bien con PBS-leche 3% dependiendo del anticuerpo utilizado, durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.
- c) Los restos del Tampón de saturación, son eliminados mediante 4 lavados con Tampón PBS de 5 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente.
- d) La incubación de las membranas de PVDF, con el suero de los pacientes, se realiza durante un periodo de 12 – 16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4° C. Los sueros de los pacientes, pueden emplearse individualmente o agrupados “pool”. A nivel de IgE individualizados, los sueros se emplearon sin diluir (sueros de clase $\geq$ III en RAST o equivalente). Cuando se emplean agrupados, se procedió a diluciones 1:2, 1:5 y 1:10.

Cuando el anticuerpo reconocedor de los antígenos presentes es una IgG procedente de un conejo inmunizado contra dicho antígeno, las diluciones dependen del título. En este caso, para el antisero de conejo frente al Alt a 1, se han utilizado diluciones a 1:5000; 1:10000

Tras la incubación con el suero, los anticuerpos no fijados se eliminan mediante 4 lavados de 5 minutos con Tampón PBS, en condiciones de agitación constante y a temperatura ambiente.

- e) La adición del conjugado anti IgE humana marcada con peroxidasa de rábano (HRP-anti Ig E Dakopatts (ref. P 295) o HRP anti IgE Biosource (ref. AH10509), diluida previamente 1:5000 en Tampón PBS-Tween 0.1%; a la membrana de PVDF en un volumen suficiente que la cubra, se realizó manteniéndose durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente.

La utilización de un anticuerpo secundario biotinilado se produjo cuando era necesario aumentar la sensibilidad del experimento. Para ello se utilizó una anti IgE biotinilada Biosource (ref. AH10509) diluida 1:10000 en PBS-Tween 0.1% para los sueros de pacientes sensibilizados; y una anti IgG de conejo biotinilada (Jackson immunoresearch Laboratorios, Inc, Pensilvania, EU (ref 711-065-152)) diluida 1:10000 en tampón BSA 1% PBS -Tween 0,05% para el antisero de conejo anti Alt a 1. Ambos anticuerpos se incuban junto con la membrana durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente.

- f) Los conjugados no fijados fueron eliminados, mediante 4 lavados con Tampón PBS, de 5 minutos de duración, en agitación y a temperatura ambiente.

- g) Las membranas que han recibido una incubación con anticuerpos unidos a biotina, se incuban con Estreptavidin-peroxidasa (Sigma S5512) a una dilución 1:1000 de la solución stock que se encuentra a 1 mg/mL, durante 30 minutos

El revelado del inmunocomplejo se realizó empleando el sistema ECL + Plus. Western Blotting detection reagents, ref. NEL104 de Perkin Elmer (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA); mediante el siguiente protocolo:

- a) Extraer los reactivos de la cámara fría y mantenerlos a temperatura ambiente unos minutos antes de su utilización.
- b) Mezclar las soluciones etiquetadas como A y B inmediatamente antes de su uso en una proporción de 1:1. y toda la superficie de la membrana debe de ser cubierta.
- c) El exceso de tampón de lavado se retirará y la membrana debe de colocarse sobre una superficie limpia (un buen soporte es emplear un trozo vidrio); siempre manteniendo el lado que contiene las proteínas adsorbidas hacia arriba.
- d) Retirar el exceso de la mezcla de detección. Es recomendable realizarlo sosteniendo la membrana en posición vertical y dejando así que escurra el líquido. El extremo inferior de la membrana deberá de estar en contacto con un papel secante, con el fin de eliminar el líquido acumulado en el borde inferior.
- e) La membrana debe de colocarse inmediatamente después sobre un pliego de plástico transparente; con la cara que lleva las proteínas adsorbidas hacia arriba, cuidando de retirar muy suavemente las burbujas de aire, que se puedan producir entre el plástico y la membrana. Evitar fundamentalmente la presión sobre la misma.
- f) La membrana envuelta en el plástico con el lado que porta las proteínas adsorbidas hacia arriba, se coloca dentro del cassette de revelado (Hypercassette Amersham Life Science código RPN 13642). Debe de asegurarse que el cassette está totalmente seco. No deben de existir restos de reactivos humedeciendo la cassette, con el fin de reservar la ausencia de humedad en la película.
- g) En habitación oscura con luz roja de seguridad, colocamos una película de autorradiografía MXG film de Kodak, 100 MIF, 18 x 24 cm (código 525 3356), encima de la membrana. Cerrar el cassette y exponer durante 15 segundos, cuidando de no mover la película durante la exposición. Tras el tiempo de exposición retiramos la película expuesta y colocamos otra sin exponer encima de la membrana. La primera película debe de ser revelada inmediatamente y en función de su resultado, podremos estimar el tiempo que debe de mantenerse en exposición la segunda de las películas, que puede variar entre 1 minuto

y 1 hora. Si el tiempo de exposición necesario es menor de 5 segundos, se recomienda diluir los anticuerpos, dada la dificultad de controlar tiempos de exposición tan cortos.

2.3: Procedimiento de evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección

El peso molecular y la intensidad de las distintas bandas pueden ser evaluadas mediante un sistema de tratamiento de imagen, en base al empleo de un densitómetro Bio-Rad, Calibrated Imaging Densitometer GS 710; equipado con un sistema específico de análisis de imagen Bio Rad Diversity Data Base. Mediante éste equipo podemos obtener las imágenes de los geles de electroforesis de poliacrilamida o de las membranas de PVDF y su “escaneo” e integración de datos, nos permite conocer los pesos moleculares de cada banda en función de sus movilidades comparadas respecto del patrón o estándar empleado, haciendo un análisis de regresión lineal entre las variables logaritmo del peso molecular y logaritmo de la movilidad, medido en “pixels”, exigiéndose una correlación $r > 0.90$ entre ambas variables.

En un aspecto semicuantitativo, la intensidad de cada calle o banda puede ser representada como expresión del resultado en intensidad integrada de imagen (densidad óptica por cm^2).

3. ANTIGENOS Y ANTISUEROS EXPERIMENTALES

3.1: Purificación del alérgeno Alt a 1 a partir del extracto alérgénico de *Alternaria alternata*

El procedimiento de purificación diseñado para el alérgeno mayor Alt a 1 se concibió sobre la base de utilización de las técnicas cromatográficas convencionales basadas en la carga eléctrica y el tamaño de la proteína, para lo cual se ha acudido al empleo de las cromatografías de intercambio iónico y catiónico, así como de exclusión molecular por gel filtración.

Para ello se han empleado cromatógrafos Akta Purifier 10 y Akta Explorer 100 (GE Healthcare) y columnas Hitrap Q XL (GE Healthcare) para el proceso de intercambio aniónico, Hitrap SP FF (GE Healthcare) para el proceso de intercambio catiónico y Hiloal Superdex 75 Prep Grad (GE Healthcare) para el proceso de gel filtración.

El siguiente esquema muestra en forma resumida las características del sistema de purificación empleado para la obtención del alérgeno mayor Alt a 1.

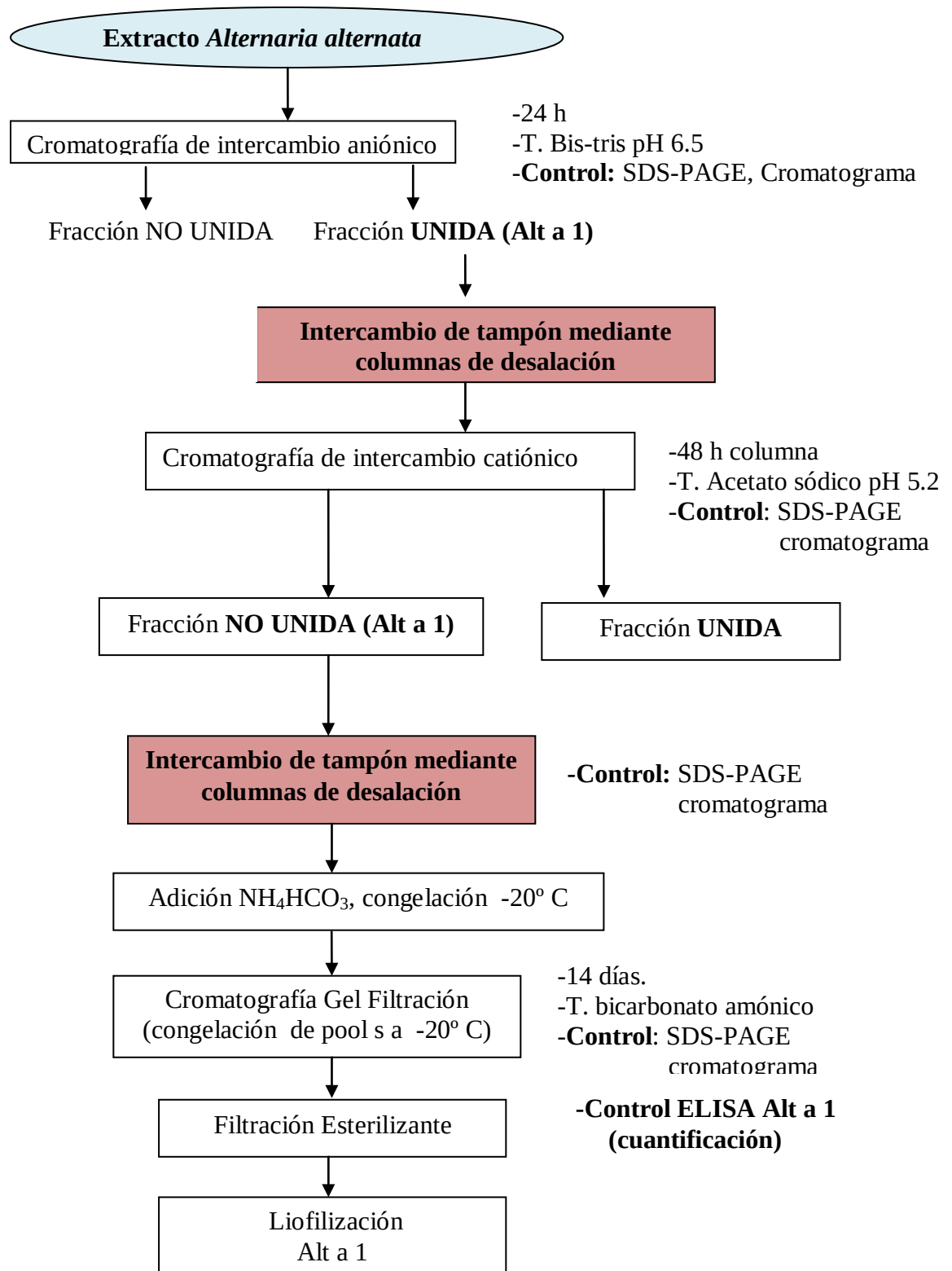


Figura 12: Flow Chart del proceso de purificación

3.1.1: Cromatografía de intercambio aniónico

La primera etapa del proceso de purificación del alérgeno mayor Alt a 1 mediante cromatografía de intercambio aniónico parte del extracto alergénico de *Alternaria alternata* que es resuspendido en tampón 20mM Bis-Tris pH 6.5 hasta su disolución mediante agitación magnética a pH controlado de 6.5. El extracto así resuspendido es centrifugado a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos y ajustada su conductividad a un valor <mS/cm y ulteriormente filtrado por 0.45 micras.

La columna empleada en el proceso de intercambio aniónico Hitrap Q XL 5 mL (GE Healthcare) acoplada a un cromatógrafo Akta Purifier, fue previamente acondicionada mediante lavado con agua ultrapura a un flujo de 2.5 mL/mn para eliminar el etanol de almacenamiento de la columna y equilibrada con tampones 20 mM Bis-tris pH 6.5 y 20 mM Bis-tris + 0.5 M NaCl pH 6.5.

Tras inyectar en la columna el extracto alergénico acomodado anteriormente de *Alternaria alternata*, se colocaron 15 tubos en el colector de fracciones y se realizó un total de 5 pases del extracto alergénico acomodado. Una alícuota de 150 µL de cada tubo fue obtenida como control para verificar y seleccionar los tubos que contienen el alérgeno Alt a 1 mediante SDS PAGE. Una vez realizadas las SDS PAGE de las diferentes eluciones de los 5 pases del extracto de *Alternaria alternata* por la columna Hitrap Q XL, se seleccionan y congelaron las eluciones de cada pase donde se ha detectado la presencia de Alt a 1 y se realiza un “pool a” con todas las eluciones seleccionadas, que es finalmente dializado mediante el uso de 4 columnas de desalación High Prep 26/10 Desalting (GE Healthcare), comprobándose la conductividad antes y después del proceso de desalación.

3.1.2: Cromatografía de intercambio catiónico

La segunda etapa del proceso de purificación del alérgeno mayor Alt a 1 mediante cromatografía de intercambio catiónico parte del volumen obtenido, tras la desalación del “pool” de eluidos en la cromatografía de intercambio aniónico. El “pool a” es ajustado a una concentración 20 mM mediante acetato sódico en agitación magnética hasta su completa disolución y equilibrado a pH 5.2, comprobando la conductividad del “pool a” que debe de ser < 4 mS/cm.

La columna empleada en el proceso de intercambio catiónico Hitrap SP FF 5 mL (GE Healthcare) acoplada a un cromatógrafo Akta Purifier, fue previamente acondicionada mediante lavado con agua ultrapura a un flujo de 2.5 mL/mn y equilibrada con tampones 20 mM acetato sódico pH 5.2, 20 mM acetato sódico + 1 M NaCl pH 5.2 y 20 mM acetato sódico, pH 5.2.

Tras inyectar en la columna el “pool a” ajustado procedente de la cromatografía de intercambio aniónico, se colocaron 15 tubos en el colector de fracciones y se realizó un total de 7 pases. Alícuotas de 150 µL de cada tubo fueron obtenidas como control para verificar y seleccionar los tubos que contienen el alérgeno Alt a 1 mediante SDS PAGE. Una vez realizadas las SDS PAGE de las diferentes eluciones de los 7 pases del “pool” obtenido tras el

intercambio aniónico por la columna Hitrap SP FF 5 mL se seleccionaron y congelaron las eluciones de cada pase donde se ha detectado el alérgeno Alt a 1 y se realizó un nuevo “pool b” con todas las eluciones seleccionadas, que es finalmente dializado mediante el uso de 4 columnas de desalación Hig Prep 26/10 desalting (GE Healthcare), comprobándose la conductividad antes y después de dializar.

3.1.3: Cromatografía de gel filtración

La tercera etapa del proceso de purificación del alérgeno mayor Alt a 1 mediante cromatografía de gel filtración, parte del volumen obtenido en el “pool b” procedente de las cromatografías de intercambio aniónico y catiónico. El “pool b” es ajustado a una concentración 0.1 M mediante la adición de bicarbonato amónico en condiciones de agitación magnética hasta su completa disolución.

La columna empleada en la cromatografía de gel filtración Hiload Superdex 75 prep grade 26/60 (GE Healthcare) con un volumen de 350 mL acoplada a un cromatógrafo Akta Purifier 100, fue previa y semanalmente acondicionada con agua ultrapura a un flujo de 1mL/mn y equilibrada con tampón 0.1 M bicarbonato amónico a un flujo de 2.5 mL/mn.

Tras inyectar en la columna el “pool b” procedente de las cromatografías de intercambio aniónico y catiónico, se colocaron 15 tubos en el colector de fracciones y se realizó un total de 45 pases. Alicuotas de 150 µL fueron obtenidas como control para verificar y seleccionar los tubos que contienen el alérgeno Alt a 1 mediante SDS PAGE. Una vez realizadas las SDS PAGE de las diferentes eluciones de los 45 pases del “pool b” por la columna Hiload Superdex 75 prep grade 26/60, previamente congeladas, se realizó un nuevo “pool c” con todas las eluciones que contienen el alérgeno mayor Alt a 1 y el “pool c” fué congelado.

3.2: Estabilización del alérgeno Alt a 1

El denominado “pool c” conteniendo el alérgeno mayor Alt a 1 fue sometido a un proceso de liofilización en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Telstar), según la receta descrita en el apartado 1.5 (tabla 6).

3.3: Inmunización:

3.3.1: Fundamento teórico

Existe un cierto número de factores que pueden ser manipulados para obtener una respuesta inmune favorable hacia un antígeno determinado. Todos ellos están relacionados con el proceso de inmunización e incluyen la elección del animal, dosis y forma del inmunógeno, vía de administración, número de inyecciones y periodo transcurrido entre dichas inyecciones (Harlow, 1988). La obtención de anticuerpos apropiados depende, en gran medida, del régimen de inmunización elegido, y por tanto, de la determinación de las características concretas de cada uno de los factores citados.

En general, en el proceso de inmunización hay que tener en cuenta varias consideraciones:

- a) Las inmunizaciones deben hacerse en animales tan alejados de la escala evolutiva de la fuente del antígeno como sea posible, con objeto de asegurar una respuesta inmune activa y evitar fenómenos de autotolerancia. Para el caso concreto de la producción de anticuerpos policlonales (monoespecíficos) suelen usarse conejos.
- b) La maduración del sistema inmune se alcanza a diferentes tiempos postnatales, según la especie animal. Los conejos son considerados adultos a los 6 meses de vida.
- c) Animales individuales, aun y cuando sean isogénicos, pueden introducir respuestas inmunes completamente diferentes frente a preparaciones antigénicas idénticas. Además, los animales de laboratorio ocasionalmente pueden morir como consecuencia de la manipulación experimental, por lo que siempre es aconsejable inmunizar a mas de un animal para cada tipo de ensayo.

3.3.2: Protocolos de inmunización

Obtención de antisueros policlonales (monoespecíficos) de conejo

Se inmunizan conejos usando las proteínas recombinantes. Se siguen protocolos estándar en los que se inyectan los alérgenos, en adyuvante completo de Freund, alternativamente por vía subcutánea e intramuscular aproximadamente cada 15 días. La última recolección de sangre se hace a los 80 días de la primera inmunización. El título de anticuerpo y su especificidad se analizan mediante técnicas de ELISA e Inmunotransferencia.

El protocolo fue desarrollado tal y como indica en la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco en Vitoria.

La cantidad necesaria por inyección fué de 20-100 µg de Alt a 1

Día	0	14	28	38	6	66	80
Inyección	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a			
Sangrado	Preimmune			2 mL	2+20 mL	60 mL	

4. CARACTERIZACION Y COMPORTAMIENTO DEL ALERGENO MAYOR NATIVO Alt a 1

Para constatar las características del alérgeno mayor Alt a 1 nativo, se estableció la definición de la denominada “huella peptídica” mediante la técnica de espectrometría de masas y Malditof. Tof mediante espectrometría de masa:masa, a fin de comprobar su similaridad con las definidas en los bancos

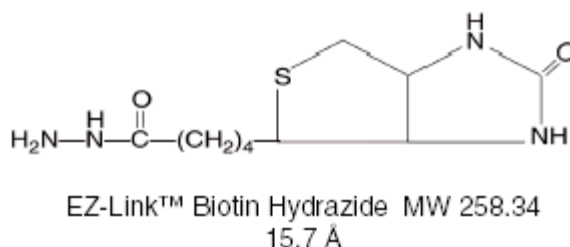
de datos de proteínas. Ambas técnicas fueron realizadas en el servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

El comportamiento, en cuanto a su capacidad fijadora de Ig E se refiere, del alérgeno mayor nativo Alt a 1 obtenido, se evaluó con alérgenos recombinantes (rAlt a 1) comparativamente, mediante el empleo de técnicas de inmunotransferencia, que aportaron además datos de sus características físicas (pesos moleculares en la separación previa electroforética en geles SDS PAGE) (Laemmli, 1970; Towbin y cols., 1979) y mediante técnicas de ELISA con el alérgeno Alt a 1 sin desnaturalizar.

Para desarrollar las técnicas anteriormente descritas se emplearon sueros humanos con un título clase >2 (Phadia) de Ig E específica de *Alternaria alternata* adquiridos a Plasmalab (USA) y de los anticuerpos policlonales en conejo monoespecíficos frente a Alt a 1, generados en la Universidad del País Vasco.

4.1: Cuantificación de alérgenos mayores

En la actualidad existen pocos kits comerciales para la cuantificación de alérgenos mayores. La metodología más empleada para dicha cuantificación es el doble sándwich ELISA (Chapman y cols., 1987; Fahlbusch y cols., 1994; Vailes y cols., 2001). El método consiste en la unión de uno o varios anticuerpos para la captura del alérgeno, con lo que se evitan posibles cambios conformacionales que pueden originarse con la unión directa de la proteína a la fase sólida. El uso de anticuerpos monoclonales para la realización de esta técnica genera cierta controversia, dado que si usamos sólo uno, que reconozca un único epitopo, la especificidad puede ser excesiva y sólo reconocer ciertas variantes alérgicas (Aalberse y van Ree, 2000). Esta disyuntiva se resuelve si se utilizan 'pools' de anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales suficientemente específicos. El siguiente paso consistiría en marcar las inmunoglobulinas utilizadas para la parte superior del sándwich con biotina, por ejemplo: Se utilizó la EZ-Link™ Biotin-Hydrazide, de la casa comercial Pierce, que puede biotinilar inmunoglobulinas por sus residuos glicídicos para la retención total de la actividad inmunológica (O'Shannessy y cols., 1984).



El proceso se complementa con un paso adicional de estreptavidina-peroxidasa y revelado colorimétrico con sustratos de este enzima (ABTS ó TMB).

4.1.1: ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

4.1.1.1: Fundamento teórico

Los enzimoimmunoensayos (EIA) son técnicas inmunológicas que emplean reacciones antígeno anticuerpo en las que el marcaje de los mismos se realiza con enzimas. Así, a la reacción inmune sigue una reacción indicadora (normalmente con aparición de color) en la que se determina fotométricamente la actividad del enzima marcador.

El ELISA es un tipo de enzimoimmunoensayo heterogéneo [la actividad del enzima es la misma tanto si esta formando parte del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac, inmunocomplejo) como si no], en el que la aparición de las dos fracciones se consigue gracias al uso de soportes sólidos a los cuales se adhiere el complejo Ag-Ac, eliminándose el reactivo marcado libre mediante lavados.

En el ELISA convencional el enzima (peroxidasa de rábano HRP) se encuentra conjugado a un anticuerpo que reconoce a toda inmunoglobulina de unas características determinadas, que a su vez se ha unido a una placa de microtitulación.

4.1.1.2: Cuantificación de Alt a1. ELISA doble sándwich

- a) El alérgeno Alt a 1 que se utiliza como patrón o recta de calibración se encuentra almacenado como solución stock a 0.2 mg/mL en PBS + Thimerosal (0,02%). Los anticuerpos que se usan en esta determinación son policlonales monoespecíficos de conejo anti Alt a 1.
- b) Las placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018), se activan con 100 μ L de una solución de anticuerpo, IgG anti Alt a 1 de conejo purificada por una columna de proteína A, a 2 μ g/mL en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6, doce horas a 4°C. Corresponde a una dilución 1/100 del stock de anticuerpo (por ejemplo, 100 μ L en 10 mL). Por lo tanto, la concentración de IgG por pocillo será de (0,2 μ g = 200 ng).
- c) Tras la incubación de 12 horas, los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 μ L/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- d) Las placas se incuban durante una hora con 200 μ L de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% a temperatura ambiente.
- e) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 μ L/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.

- f) A cada pocillo se le añaden 50 μ L de muestra de alérgeno diluido y se incuban durante una hora. Se emplea Alt a 1 (vial etiquetado como Alt a 1 estándar de 10 μ g/mL, de forma que la curva control se encuentre en un rango de concentración que empieza en 25 ng/mL (1/400 en dilución del stock), hasta aproximadamente 0.5 ng/mL de Alt a 1 de la siguiente manera:
 - f.1) La primera dilución (400 μ L totales) se mezcla bien y se transfieren 200 μ L de ésta primera a través de una serie de tubos Eppendorf que contienen 200 μ L de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% para realizar diluciones seriadas. Se utilizan 50 μ L por pocillo para un total de 3 réplicas para cada dilución (es decir, empleamos un total de 150 μ L). Los pocillos control o blanco deben incubarse solamente 1% de BSA en PBS-T al 0.05% (solución de bloqueo).
 - f.2) La muestra problema se prepara en diluciones, empezando por 1:1000 y hasta 1:16000, por ejemplo, para que previsiblemente tengan concentraciones del alérgeno mayor Alt a 1, que se encuentren dentro de la curva patrón (es decir, por debajo de 25 ng/mL y por encima de los 0.5 ng/mL). Obviamente estas diluciones de la muestra problema son puramente empíricas, y es posible que haya que repetir el experimento con diluciones mayores o menores que nos sirvan para realizar una estimación certera del alérgeno que pretendemos cuantificar (Alt a 1 en este caso).
- g) Los pocillos se lavan 3 veces con 200 μ L/pocillo de PBS-T al 0.05% y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- h) La placa se incuba durante una hora a temperatura ambiente con 50 μ L de anticuerpo policlonal biotinilado (vial etiquetado como Ab anti Alt a 1 biotin) a una dilución 1/1000 en BSA al 1% en PBS-T al 0.05%. Este anticuerpo se utiliza como parte superior del “sándwich”.
- i) Los pocillos se lavan 3 veces con 200 μ L/pocillo de PBS-T 0.05 % y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- j) Se incuban a continuación con 100 μ L de una dilución 1/1000 de Estreptavidin-peroxidasa (Sigma S5512. Los 0,25 mg que contiene el vial se reconstituyen en 1 mL de agua destilada), durante 30 minutos a temperatura ambiente La dilución de la Estreptavidina-peroxidasa se recomienda hacerla en 1% de BSA en PBS-T al 0.05%.
- k) Se lavan los pocillos 3 veces con 200 μ L/pocillo con PBS-T al 0.05% y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- l) A cada pocillo se le añaden 100 μ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H₂O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La

lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, y los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.

- m) Las absorbancias de cada pocillo fueron obtenidas tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

Las lecturas de absorbancia son directamente proporcionales a la cantidad de Alt a 1 unido, y los valores se extrapolan de la respectiva curva patrón.

4.1.1.3: ELISA directo: Alt a 1.

- a) El alérgeno en fase sólida lo constituye un anticuerpo anti Alt a 1 que se encuentra acoplado a una placa microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018. a una concentración de 200 ng/pocillo.
- b) La placa se mantiene incubando 12 horas a 4°C.
- c) A cada pocillo se le añaden 100 µL de una solución de bloqueo formada por BSA 1% PBS-Tween 0,05% y se mantiene dicha solución durante 1 hora.
- d) El alérgeno Alta 1 se coloca en los pocillos de la placa siguiendo un diseño. Se realizan dos replicas por cada suero (paciente sensible a *Alternaria alternata* con una clase ≥ 3) y cuatro replicas para el “pool” de estos sueros. La cantidad que se coloca en cada pocillo de Alta 1 y se establece en 25 ng. La placa se mantiene en agitación orbital a temperatura ambiente durante una hora.
- e) Tras 3 lavados con PBS-Tween 0.05% y el secado correspondiente, se colocan 50 µL/pocillo del suero correspondiente a cada paciente por cada 2 pocillos, y se mantienen en agitación durante una hora a temperatura ambiente.
- f) Tras el lavado por 3 veces de cada pocillo con PBS-Tween 0,05%, se seca la placa y se procede a la adición de 50 µL de una anti IgE humana obtenida en cabra (Biosource cat. AHI0501) a una dilución 1:2000, en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente
- g) Tras el nuevos lavados con PBS-Tween 0,05%, se procede a la adición de 50 µL de una anti IgG de cabra biotinilada a una dilución 1:5000 (Jackson ImmunoResearch; cat. 705-065-147) en solución de bloqueo durante también 1 hora a temperatura ambiente.
- h) Tras lavados posteriores y adición de una dilución 1:1000 de Estreptavidina-peroxidasa (Sigma cat. S5512) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- i) Finalmente se lavó la placa con 100 μ L y se reveló 100 μ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H₂O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, siendo los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.
- j) Las absorbancias de cada pocillo fue obtenida tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

4.1.1.4: ELISA inhibición *Alternaria*

- a) El alérgeno en fase sólida lo constituyen los componentes del extracto de *Alternaria alternata*, que se encuentran acoplados a placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018. a una concentración de 250 μ g/mL. La placa se mantiene incubando durante doce horas a 4°C.
- b) Tras la incubación se elimina el contenido y se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0,05%
- c) Los alérgenos inhibidores en fase líquida, lo constituyen los componentes del extracto de *Alternaria alternata*, Alt a 1 . Como control negativo se utilizó el tampón de incubación.
- d) Los sueros empleados corresponden a pacientes con IgE específica a *Alternaria alternata* y con una clase ≥ 3
- e) El método consiste en la preparación de una batería de diferentes concentraciones de las soluciones de los alérgenos inhibidores en tampón de incubación, sobre el siguiente banco:

Alternaria alternata: 10000, 3330, 1110, 370,123, 41, 13.7, 4.6 μ g/mL
Alt a 1 : 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.041, 0.0137, 0.0046 μ g/mL
- f) A cada tubo se añaden 200 μ L de suero, 200 μ L de cada una de las concentraciones del alérgeno inhibidor, excepto en un tubo, en el que sólo se añaden 200 μ L del tampón de incubación y 200 μ L de BSA que corresponde al 100% de unión (0% de inhibición)
- g) Los tubos una vez tapados son preincubados a temperatura ambiente durante tres horas y en agitación orbital.

- h) A cada pocillo se le añaden 100 μ L de una solución de bloqueo formada por BSA 1% PBS-Tween 0,05% y se mantienen con dicha solución durante una hora.
- i) Tras tres horas de preincubación se pusieron en cada uno de los pocillos seleccionados, el contenido de los tubos con la fase inhibidora a las diferentes concentraciones, y se mantiene la placa en agitación durante dos horas a temperatura ambiente.
- j) Tras el lavado por 3 veces de cada pocillo con PBS-Tween 0,05%, se seco la placa y se procedió a la adición de 50 μ L de una anti IgE humana obtenida en cabra (Biosource cat. AHI0501) a una dilución 1:2000, en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente.
- k) Tras 3 nuevos lavados con PBS-Tween 0,05%, se procedió a la adición de 50 μ L de una anti IgG de cabra biotinilada a una dilución 1:5000 (Jackson ImmunoResearch; cat. 705-065-147) en solución de bloqueo durante también 1 hora a temperatura ambiente.
- l) Tras un lavado posterior y la adición de una dilución 1:1000 de estreptavidina-peroxidasa (Sigma cat. S5512) en solución de bloqueo, se mantiene durante una hora a temperatura ambiente.
- m) Finalmente se lavó la placa con 100 μ L y se reveló 100 μ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H₂O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, y los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.
- n) Las absorbancias de cada pocillo fue obtenida tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

La recta obtenida con los porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones del inhibidor empleadas, se calcula según la siguiente fórmula:

$$100 - (100 \times \text{absorbancia muestra problema} / \text{absorbancia muestra BSA})$$

Una vez obtenida la recta de inhibición, se procede al cálculo de la concentración del alérgeno inhibidor, que produce un 50% de inhibición.

4.1.1.5: Cuantificación de los niveles de Ig E específica

Se realizó mediante la técnica de FEIA de acuerdo a su protocolo empleando reactivos Phadia para la cuantificación de Ig E específica frente a *Alternaria alternata* y el alérgeno mayor rAlt a 1.

La lectura se realizó en un fluorímetro (FluoroCount 96) a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades kU/L (kilo unidades/L) o Clases (1 – 5), según una curva de referencia obtenida con los estándares del fabricante Phadia, tal como se expresa a continuación.

Suero de referencia KU / L	Clase	Nivel de IgE específica
A	50 – 100	Muy alto
B	17.5 – 50	Alto
C	3.5 – 17.5	Moderado
D	0.7 – 3.5	Bajo
E	0.35 – 0.7	No detectable

Tabla 7: Niveles de Ig E específica y clases

5: ESTANDARIZACION BIOLOGICA

5.1: Eficacia diagnóstica

El extracto completo de *Alternaria alternata* y el alérgeno purificado Alt a 1 se valoraron biológicamente, mediante el estudio de su reactividad cutánea en pacientes sensibilizados, de acuerdo al método propuesto por Aas (Aas, 1978) y modificado por Malling (Malling, 1987) y siempre de acuerdo con las premisas recogidas en el estudio metodológico de Dreborg (Dreborg, 1984) y que en su conjunto se encuentran publicadas en la EMEA en su reciente “Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues” (EMEACHMP/BWP/304831/2007) que regula en la CEE éste tipo de productos.

La composición cuali-cuantitativa del extracto de *Alternaria alternata* y el de Alt a1 se establecieron mediante técnicas inmunoquímicas (ELISA Doble Sándwich), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE) y posterior inmunodetección (Immunoblotting), utilizando sueros de los pacientes sensibilizados.

La potencia alergénica se estableció mediante la técnica de RAST Inhibición estableciéndose el valor Ag₅₀; como la concentración de extracto de *Alternaria alternata* y de su alérgeno mayor Alt a 1 que inducen un 50% de inhibición del RAST; no existiendo en la actualidad un estándar internacional o de referencia admitido para éste tipo de extracto.

5.2: Pruebas cutáneas

Se realizaron según el procedimiento descrito por Osterballe (Osterballe, 1979), en el que la punción se realiza con la lanceta en un ángulo de 90° con la superficie cutánea y a través de la gota de la solución de extracto diagnóstico o del control positivo de clorhidrato de histamina 10 mg/mL; 54.3 mM/L. El contorno de las pápulas obtenidas fue marcado con un rotulador de punta fina (Pilot V5) y transferido mediante una cinta adhesiva transparente a un papel milimetrado para el cálculo de las áreas por planimetría, mediante un programa específico (AUTOCAD), que expresa las superficies en mm².

Los alérgenos empleados en las pruebas cutáneas de *Alternaria alternata* y de su alérgeno mayor Alt a 1 fueron previamente definidos en su valor HEP y ajustados en su concentración a un valor de 2 HEP para poder cumplir con los objetivos del estudio epidemiológico y de rentabilidad clínica de uso del alérgeno mayor Alt a 1.

Las pruebas se realizaron en la cara anterior del antebrazo, por duplicado y disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm. y desde 3 cm. debajo de la zona de flexión del codo, hasta 5 cm. antes de la zona de flexión de la muñeca. En el antebrazo opuesto y por duplicado y en sentido inverso se realizaron las pruebas de las cuatro diluciones más el control positivo de histamina.

Ningún paciente recibió medicación de interferencia con la sensibilidad cutánea.

Se estableció un valor positivo de la prueba cutánea, cuando el diámetro mayor de la pápula obtenida en cada una de las pruebas se mostró ≥ 3 mm.

6. PACIENTES

Los pacientes fueron seleccionados aleatoria y prospectivamente en nuestro Servicio de Alergia sobre los siguientes criterios:

- Residir en la isla de Gran Canaria
- Padecer asma y/o rinitis alérgica al menos de 1 año de evolución
- No haber recibido medicación sintomática o preventiva, al menos un mes antes de ser sometidos a las pruebas cutáneas, que pudiera interferir con los resultados de la prueba cutánea.
- Presentar una prueba cutánea positiva (> 3 mm de pápula) por prick test y un nivel de Ig E específica positivo ($>$ Clase 2. Phadia)
- Ausencia de enfermedad importante

7. TOXICIDAD

El apartado de toxicidad para el alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, fue evaluado en los apartados que corresponden a su uso diagnóstico mediante pruebas cutáneas conforme a lo expresado en Farmacopea Europea y RD 288/1991.

7.1: Toxicidad anormal en ratón por vía intraperitoneal

Se ensayó la toxicidad del alérgeno mayor Alt a 1 en ratas y ratones Wistar en grupos paralelos de 5 animales inyectados intraperitonealmente en dosis única, con un volumen de solución salina fisiológica conteniendo Alt a 1 a una concentración de 0.125 mcg/100 g de peso corporal del animal en uno de los grupos de 5 animales y en el mismo volumen se inyectó intraperitonealmente solución salina fisiológica.

Tras el periodo de observación de 7 días, los animales son observados para evaluar posibles signos clínicos y variaciones de peso corporal significativas de toxicidad. Tras el sacrificio de los animales se estudian las necropsias en órganos como cerebro, riñones, corazón, bazo, hígado, peritoneo y nódulos linfáticos para evaluar signos de toxicidad.

7.2: Capacidad irritante no específica en rata

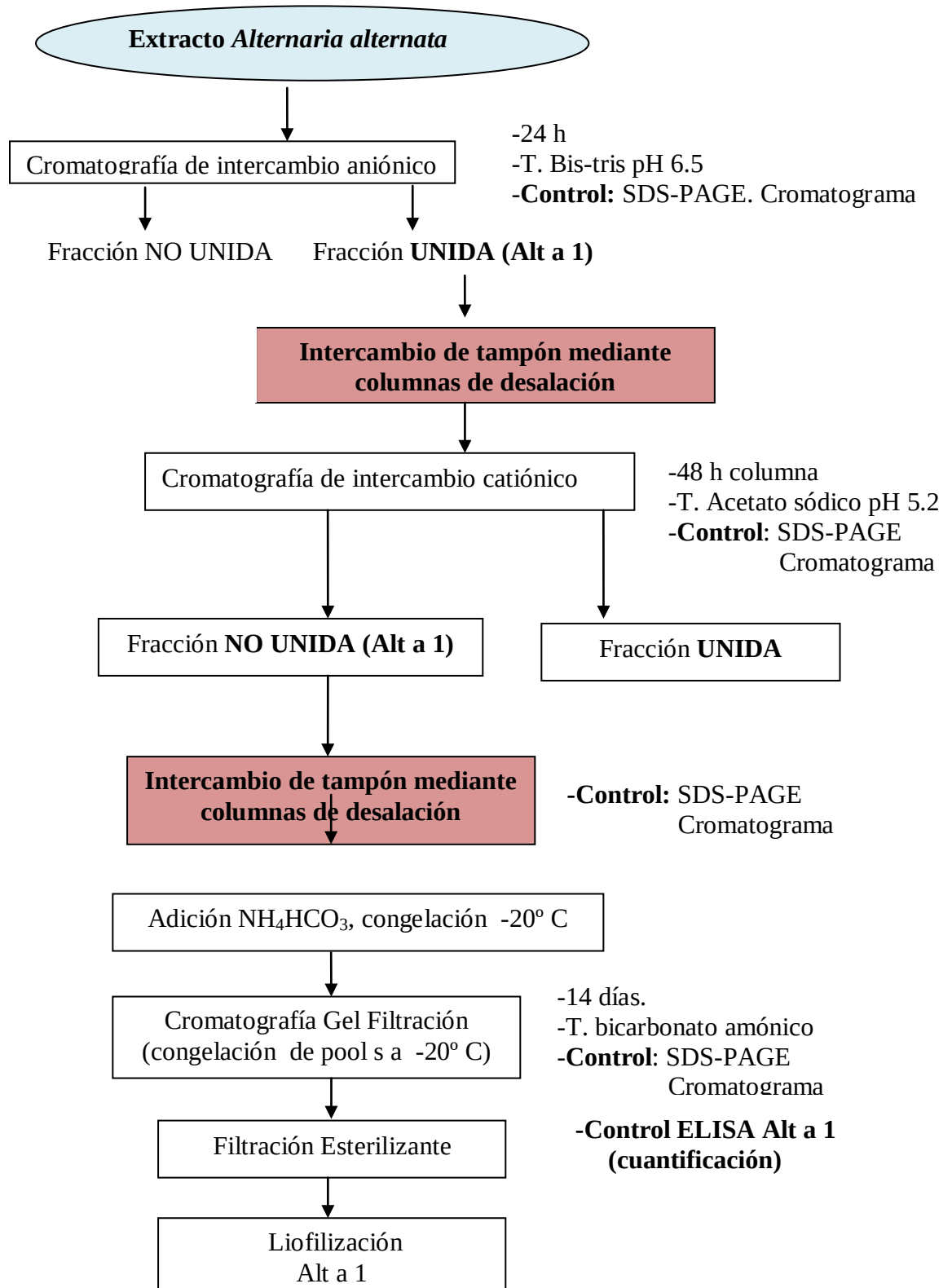
Se ensayó la toxicidad del alérgeno mayor Alt a 1 en ratones hembra Wistar en grupos paralelos de 5 animales inyectados subcutáneamente en dosis única, con un volumen de solución salina fisiológica conteniendo Alt a 1 a una concentración de 0.125 mcg/100 de peso corporal del animal en uno de los grupos de 5 animales y en el mismo volumen se inyectó subcutáneamente solución salina fisiológica.

Tras el periodo de observación de 7 días, los animales son observados para evaluar posibles signos clínicos y variaciones de peso corporal significativas de toxicidad. La evaluación del daño dérmico se realizó de acuerdo a la Guía 404 de la OCDE.

RESULTADOS

1. PROCEDIMIENTO DE PURIFICACION DE Alt a 1

El procedimiento de purificación de Alt a 1 diseñado se estableció de acuerdo al siguiente esquema, partiendo del extracto alergénico completo:



El rendimiento del proceso se estableció en un 30% de riqueza en la obtención del alérgeno Alt a 1, sobre la base de masa liofilizada de extracto alérgico de *Alternaria alternata* versus masa liofilizada de Alt a 1. Este rendimiento puede considerarse más que aceptable sobre la consideración de rendimientos de purificación de otros alérgenos que se establecen en un rendimiento del 10%.

1.1: Cultivo de *Alternaria alternata*

El esquema de purificación seguido, de acuerdo al protocolo anteriormente expresado, parte de una materia prima *Alternaria alternata* (CBS 106-24) cultivada en medio sintético (Czapec modificado) en matraces Fernbach de 1.8 L, conteniendo 700 mL de medio en condiciones de temperatura 25°C y humedad relativa > 45% durante 21 días.

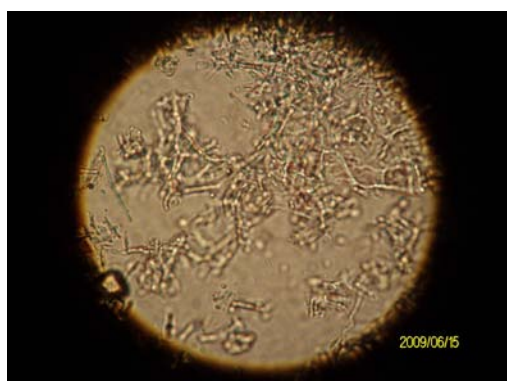


Figura 13: Morfología de cultivo

Con el fin de evaluar la selección de la materia prima de partida para purificar el alérgeno mayor Alt a 1 en su estado nativo, se seleccionaron 2 fuentes de distinta procedencia (Allergon y Crystal). La potencia relativa de una fuente frente a la otra se detectó mediante ELISA inhibición, observándose, que el extracto proteico de la fuente procedente de Allergon presentaba una potencia relativa 6,32 veces mayor.

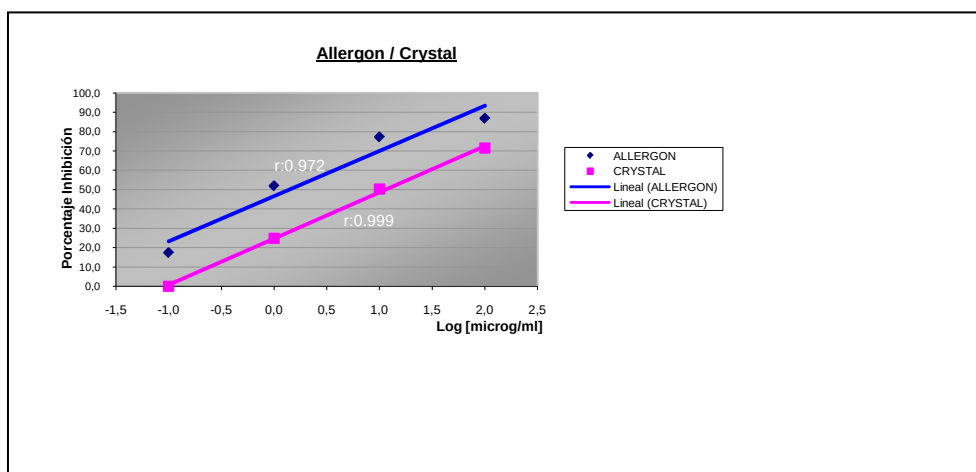


Figura 14: Fuentes de materia prima

Las Ag 50 de cada uno de los extractos obtenidos fué de 1,58 y 10 $\mu\text{g/mL}$, datos obtenidos por regresión lineal al extrapolar el 50 % de inhibición sobre la concentración que origina dicha inhibición.

1.2: Antigenograma del extracto de *Alternaria alternata*

El extracto alergénico obtenido a partir del cultivo de *Alternaria alternata* en las condiciones de homogeneización y extracción hidrosoluble, fue sometido a SDS PAGE para comprobar la presencia de proteínas separadas por su peso molecular en las condiciones descritas en el apartado de materiales y métodos.

Con objeto de validar el proceso de extracción y técnica, se realizaron tres lotes de extractos (calles 1, 2 y 3) y se tiñeron con Comassie y plata:

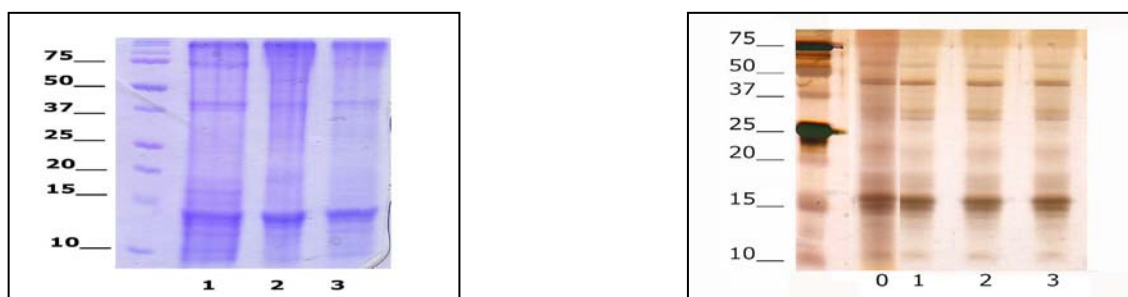
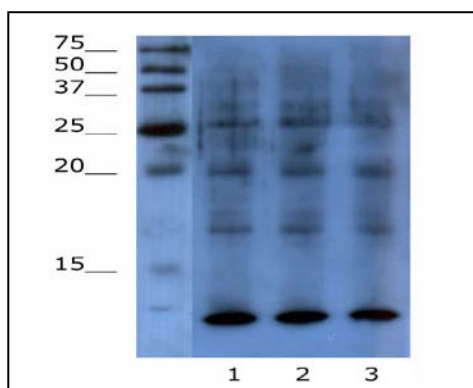


Figura 15: antigenogramas de *Alternaria alternata*

La mayor intensidad de la banda inferior (en el entorno de los 15 kDa) se establece como concordante con la que correspondería con el alérgeno mayor Alt a 1.

1.3: Alergograma del extracto de *Alternaria alternata*

La capacidad fijadora de Ig E específica, se estableció por immunoblotting, mediante la incubación con suero de clase > 3 frente a *Alternaria alternata* en las condiciones descritas en el apartado de materiales y métodos y donde se muestra la capacidad fijadora de las bandas teñidas con Comassie y con el mismo objetivo de validación se corrieron tres lotes de extractos alergénicos (calles 1, 2 y 3) de *Alternaria alternata*:



La mayor intensidad de capacidad fijadora de Ig E se establece en el entorno del peso molecular correspondiente al alérgeno mayor Alt a 1.

Figura 16: Alergograma de *Alternaria alternata*

1.4: Cromatografía de intercambio aniónico

La primera etapa de la purificación del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, se estableció mediante éste tipo de cromatografía.

El cromatograma de la primera etapa de purificación de Alt a 1 a partir de un extracto alergénico de *Alternaria alternata*, muestra que la fracción que contiene Alt a 1 se eluye en el minuto 22.22.

En esta primera etapa de cromatografía el objetivo a conseguir fué la separación de Alt a 1 de los contaminantes mayoritarios presentes en el extracto, basándose en la diferencia de pI.

El cromatograma muestra lo descrito anteriormente.

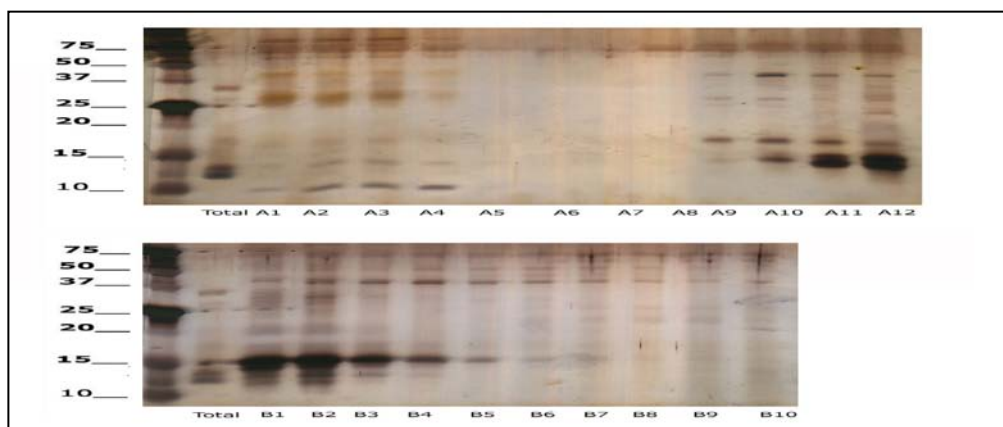


Figura 17: Cromatograma de intercambio aniónico y SDS PAGE de Alt a 1

1.5: Cromatografía de intercambio catiónico

Cromatograma de la segunda etapa de purificación de Alt a 1 mediante cromatografía de intercambio catiónico. La fracción que contiene Alt a 1 se eluye en el “flowthrough” (No unido).

En esta segunda etapa de cromatografía el objetivo es la separación de Alt a 1 de los contaminantes que no se separaron en la primera etapa de cromatografía, basándose en la diferencia de pI.

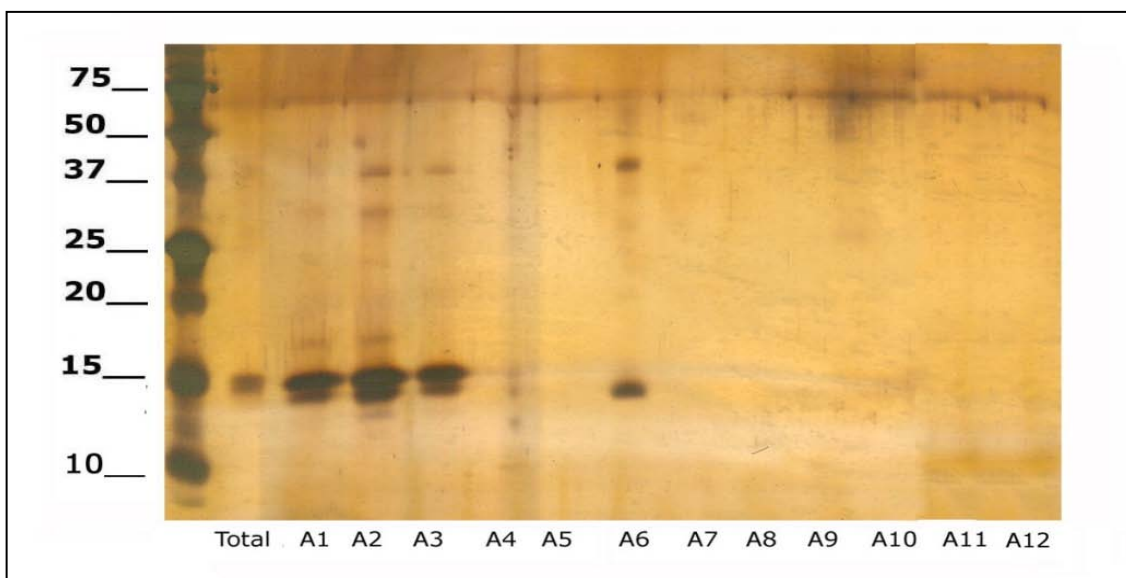
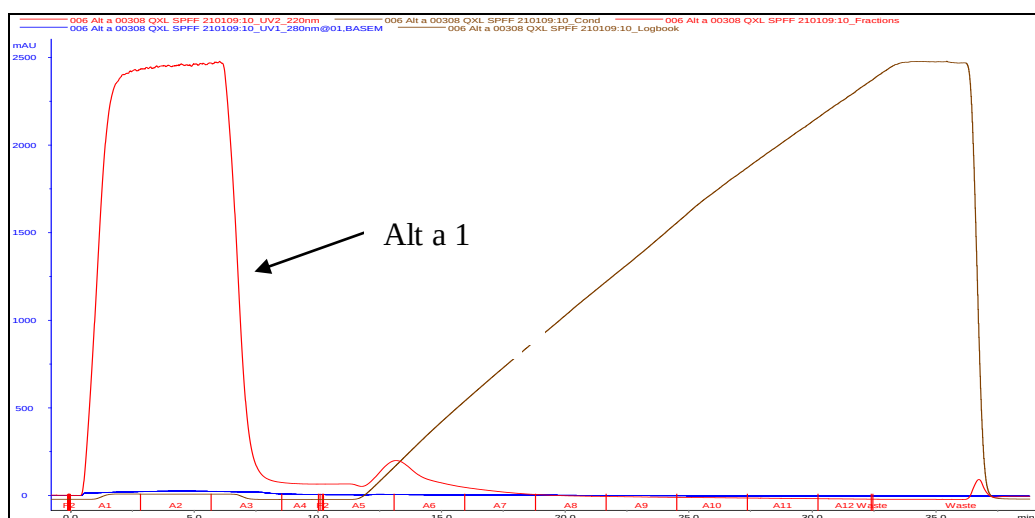


Figura 18: Cromatograma de intercambio catiónico y SDS PAGE de Alt a 1

1.6: Cromatografía de gel filtración

Cromatograma de la tercera etapa de purificación de Alt a 1 mediante cromatografía de de gel filtración. La proteína Alt a 1 purificada se eluye en el minuto 66.73. En esta tercera etapa de cromatografía el objetivo es la separación de Alt a 1 mediante diferencia de pesos moleculares, para obtener la proteína purificada con un alto grado de pureza.

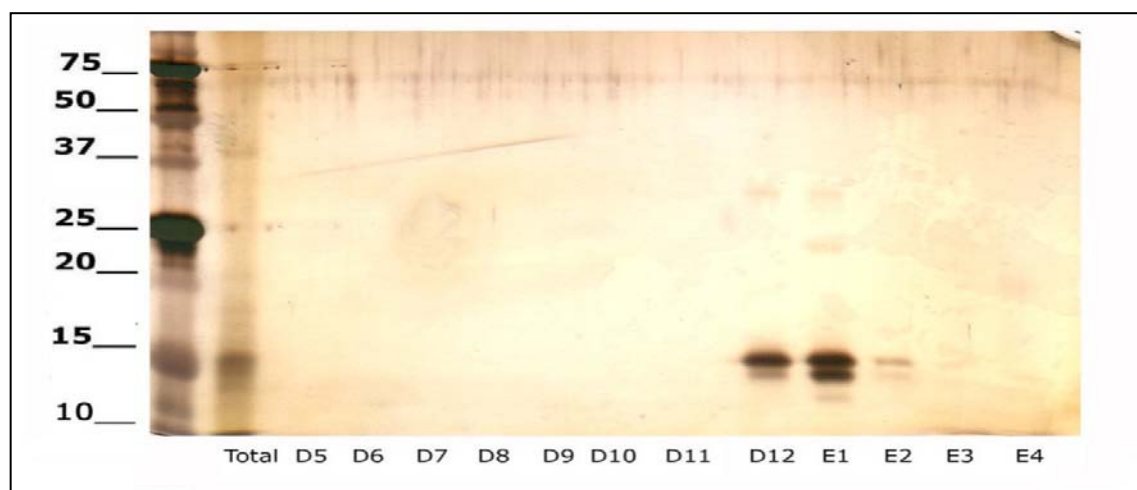
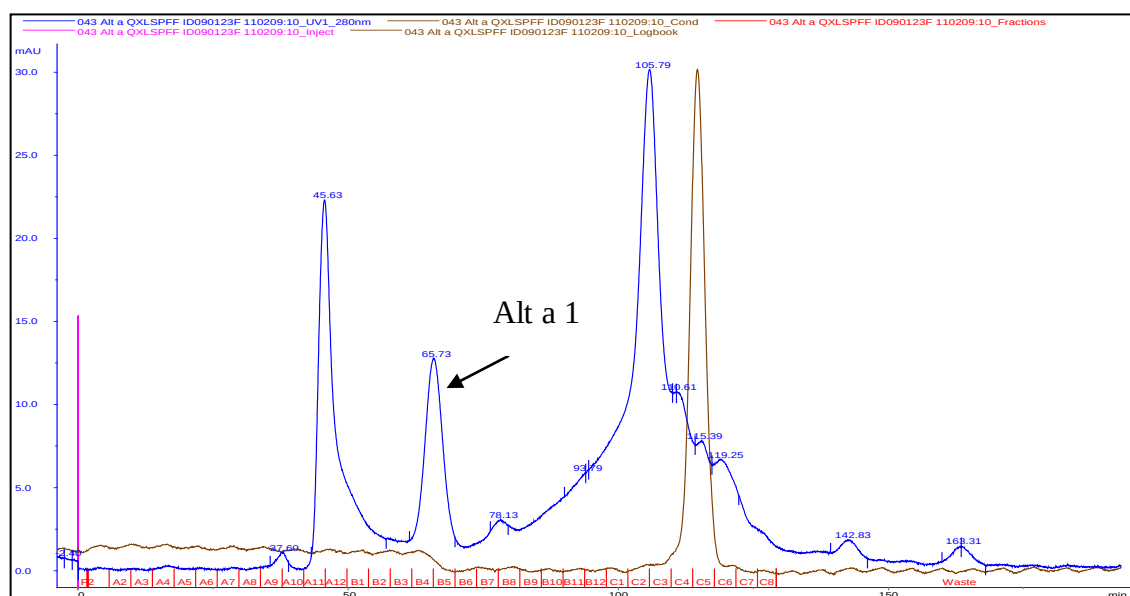


Figura 19: Cromatograma de gel filtración y SDS PAGE de Alt a 1

1.7: Antigenograma y alergograma del alérgeno Alt a 1

Las siguientes figuras muestran las electroforesis e immunoblotting del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata* purificado a partir de extractos alérgénicos mediante el procedimiento anteriormente expuesto:

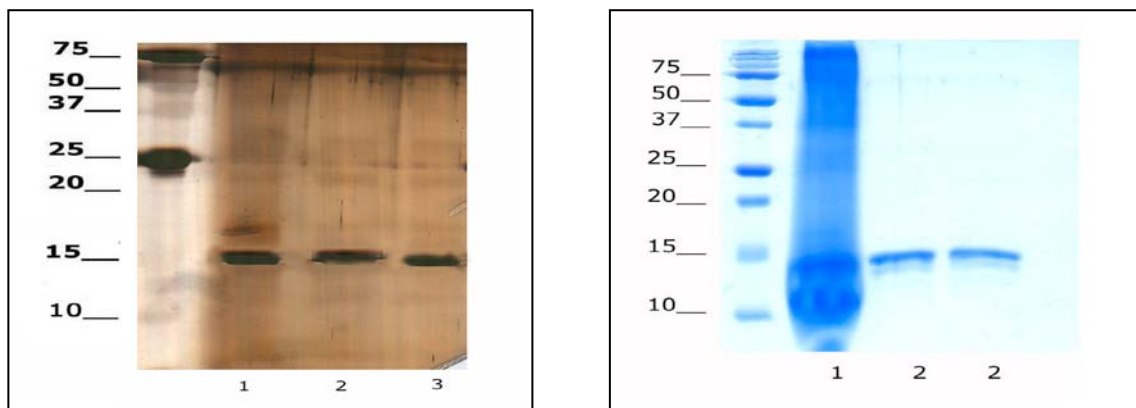


Figura 20: Tinciones con plata y Comassie del alérgeno mayor Alt a 1

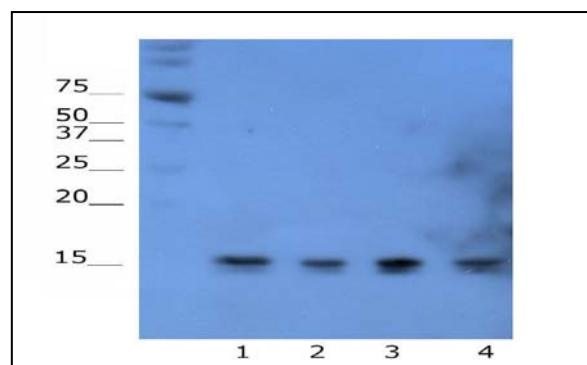


Figura 21: Immunoblotting del alérgeno mayor Alt a 1 que muestra la fijación de Ig E específica a partir de sueros de pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*.

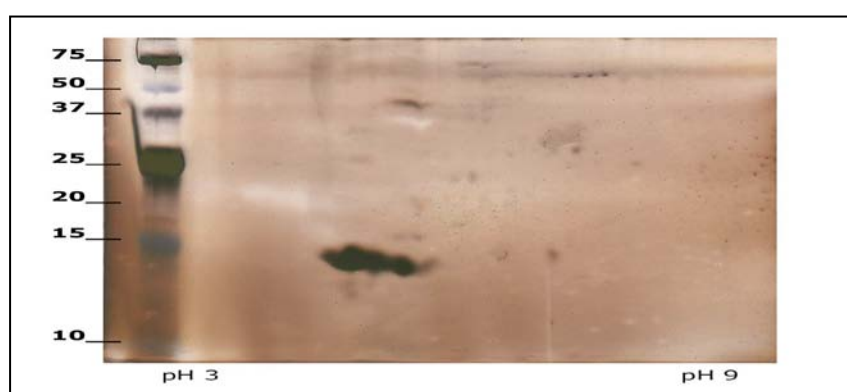


Figura 22: Electroforesis bidimensional del alérgeno Alt a 1 teñida con plata

1.8: Cuantificación del peso molecular por espectrometría de masas del alérgeno Alt a 1

Gráfico de espectrometría de masas, que permite la determinación del peso molecular del Alt a 1 purificado. El peso molecular de la proteína se estableció en 29.1 kDa. El pico de 14.5 kDa corresponde a la doble carga de la proteína. (Nota: en este caso no se digiere la proteína, porque el objetivo es determinar el peso molecular en vez de identificación de proteínas)

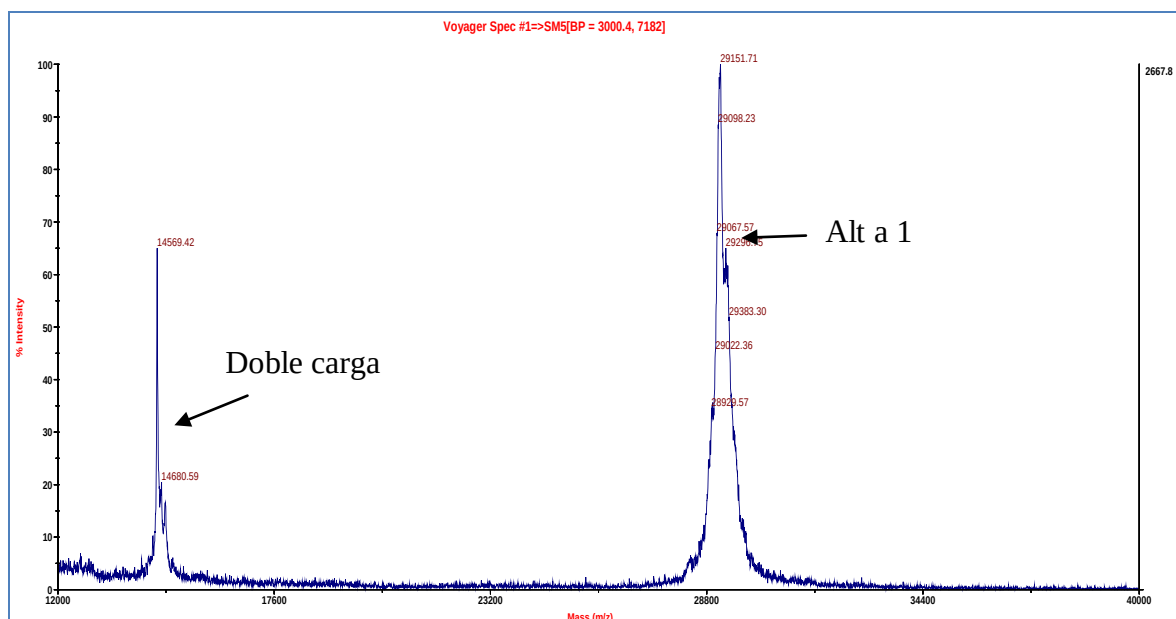


Figura 23: Espectrometría de masas de Alt a 1

(Nota: en este caso no se digirió la proteína, porque el objetivo era determinar el peso molecular en vez de la identificación de la misma).

1.9: Caracterización del alérgeno Alt a 1

La huella peptídica obtenida por espectrometría de masas concluye que la secuencia de Alt a 1 es coincidente con la P79085 (UniProt PDB) y el Malditof.Tof revela que responde a la isoforma Alt a 1.0101 con un peso molecular determinado en 17.254 D, coincidente análogamente con el preconizado por la IUIS.

2.TOXICIDAD DEL ALERGENO Alt a 1

Los ensayos de toxicidad anormal en grupos de ratones y ratas Wistar por administración intraperitoneal, conforme a Farmacopea, a dosis única de 0.125 mcg/100 g de peso corporal animal, no mostraron ningún signo de toxicidad (Documentos internos Diater MG/48/05 y MG/49/05).

En ensayo de capacidad irritante no específica en grupos de ratas Wistar por administración subcutánea a dosis de 0.125 mcg/100 g de peso corporal animal, no mostraron signos relevantes de toxicidad (Documento interno Diater MG/50/05).

En ambos protocolos toxicológicos se ensayó como blanco solución salina fisiológica.

3. INMUNIZACION DE CONEJOS CON ALERGENO Alt a 1

Con el objetivo de obtener sueros policlonales monoespecíficos del extracto alérgico de *Alternaria alternata* y del alérgeno Alt a 1, se inmunizaron conejos usando ambos.

Para ello se siguieron protocolos estándar en los que se inyecta el alérgeno, en adyuvante completo de Freund, alternativamente por vía subcutánea e intramuscular aproximadamente cada 15 días. La última recolección de sangre se realizó aproximadamente a los 80 días de la primera inmunización.

4. ESTUDIOS CON ANTISUEROS POLICLONALES MONOESPECÍFICOS

El título de anticuerpo y su especificidad se analizaron mediante técnicas de ELISA e immunoblotting. Se acoplaron el alérgeno purificado Alt a 1 y el extracto alérgico de *Alternaria alternata* sobre una placa de microtitulación para comprobar el reconocimiento antigénico de los mismos.

Tal y como muestra el immunoblotting con antisueros (preinmune e inmune) el antisuero reconoce el alérgeno Alt a 1 presente en el extracto de *Alternaria alternata* (calle 1 Alt a 1 y calle 2 *Alternaria alternata*).

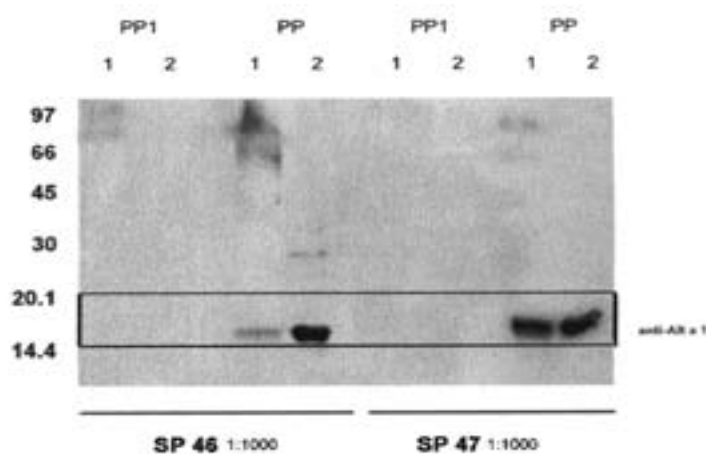


Figura 24: Especificidad de antisueros generados por Alt a 1.

La especificidad del antisuero se ensayó por ELISA e immunoblotting, no observándose ningún tipo de reactividad cruzada con extractos de otros hongos: *Alternaria alternata* (calle 1) *Penicillium notatum* (calle 2), *Aspergillus fumigatus* (calle 3), *Cladosporium herbarum* (calle 4), *Stemphylium botryosum* (calle 5) y *Candida albicans* (calle 6), tal y como se muestra a continuación y que revela el reconocimiento del antisuero para la forma dimerica del Alt a 1, con una masa molecular relativa de unos 30 kDa, y de la forma monomerica de unos 17 kDa en el extracto de *Alternaria alternata* (calle 1). En el resto de

los extractos no se produjo ninguna fijación alérgeno específica, estableciéndose así la especificidad del antisuero para el Alt a 1.

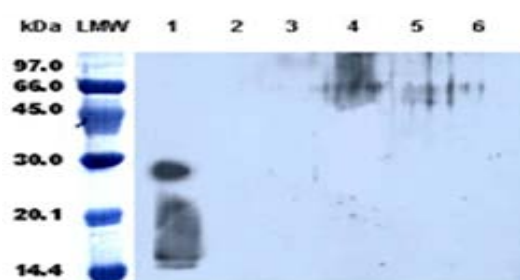


Figura 25: Reactividades cruzadas entre extractos de hongos

El antisuero policlonal monoespecífico anti Alt a 1 es capaz de reconocer el dímero de Alt a 1 del extracto de *Alternaria alternata*, con un peso molecular de unos 30 kDa y el monómero de 15-17 kDa presente en el mismo (calle 1).

Además, el reconocimiento de las proteínas presentes en el extracto de *Alternaria alternata* se ponía de manifiesto mediante técnica ELISA, utilizando para ello el antisuero anti-*Alternaria alternata* capaz de reconocer dichas proteínas. El uso de un control negativo (suero preinmune) reveló que sobre el mismo extracto solamente el antisuero anti-*Alternaria alternata* era capaz de reconocer las proteínas del extracto

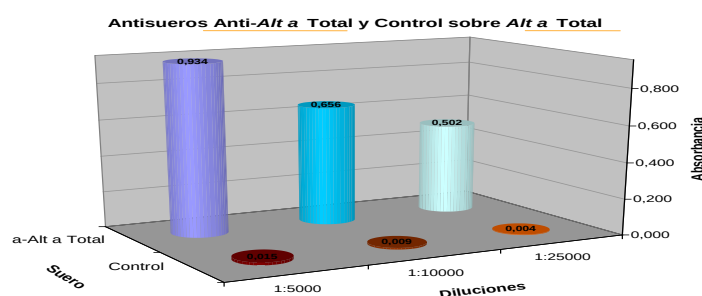


Figura 26: Especificidad del antisuero: *Alternaria*

De la misma manera el reconocimiento por éste antisuero del alérgeno Alt a 1 purificado se ensayó mostrando su especificidad y sensibilidad, tal como se muestra a continuación:

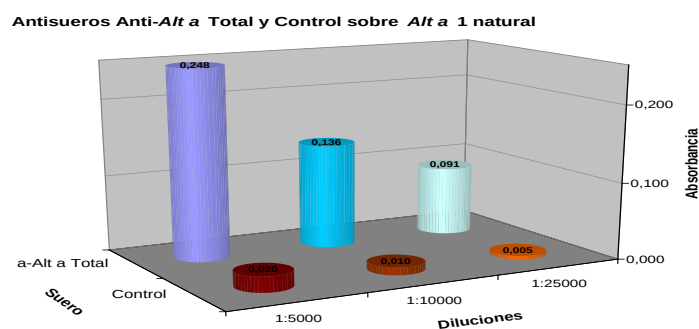


Figura 26: Especificidad del antisuero: Alt a 1

5. ESTUDIOS CON SUEROS HUMANOS

5.1: Especificidad y sensibilidad del alérgeno mayor Alt a 1

El reconocimiento del alérgeno mayor Alt a 1, así como de las proteínas que componen el extracto de *Alternaria alternata*, fue ensayado paralelamente mediante el antisuero policlonal mono específico anti Alt a 1 y por una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al hongo (Clase > 3), como control adicional se incorporó así mismo un Alt a 1 recombinante.

El inmunoblotting realizado mostró que las masas moleculares relativas del alérgeno Alt a 1 purificado y el presente en el extracto alérgénico de *Alternaria alternata* son reconocidos por el antisuero específico para el alérgeno Alt a 1 de 15 kDa (calles 2 y 3). En el caso de la proteína recombinante (calle 1), la diferencia en la masa molecular relativa, estimada en el entorno de los 18 kDa, es debida a la cola adicional de 6 histidinas derivadas de su proceso de obtención. El “pool” de sueros de pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata* reconocen así mismo el alérgeno Alt a 1 tanto en su forma purificada como recombinante (calles 1 y 2). En el caso del extracto alérgénico de *Alternaria alternata* (calle 3), se observan diferentes bandas que corresponden al mosaico alérgénico con masas moleculares diferentes, derivado de las diferentes especificidades de los anticuerpos específicos no solo de Alt a 1.

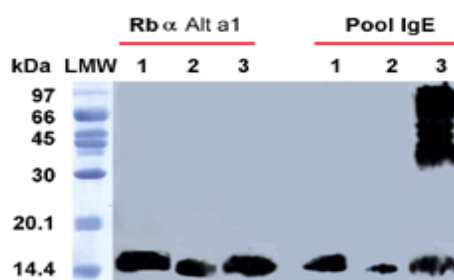


Figura 27: Inmunoblotting de formas recombinante y nativa de Alt a 1

5.2: Estudios de ELISA inhibición con sueros humanos

Una vez definida la especificidad y sensibilidad del alérgeno mayor Alt a 1, se diseñó un ensayo “*in vitro*” para determinar la capacidad de bloqueo de Ig E específica humana entre Alt a 1 y el extracto alérgénico de *Alternaria alternata*.

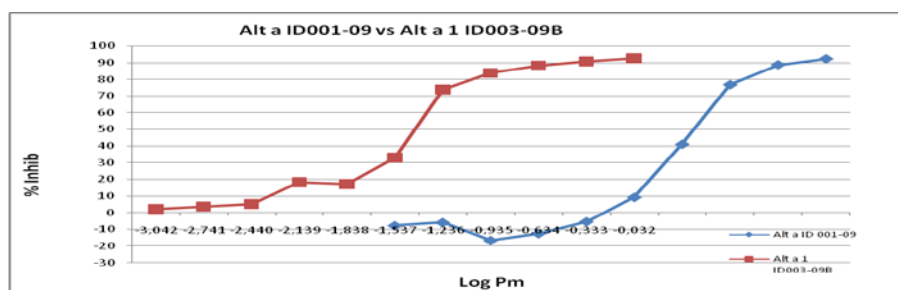


Figura 28: Cinéticas de inhibición de *Alternaria alternata* y de Alt a 1

De esta manera pudimos determinar que las curvas de inhibición tanto del extracto alergénico de *Alternaria alternata*, como del alérgeno mayor purificado Alt a 1, mostrándose un paralelismo entre las curvas, pero con una mayor potencia para el alérgeno Alt a 1, al establecerse una menor concentración para conseguir el 50% de inhibición.

6. PRUEBAS CUTANEAS

6.1: Estandarización biológica del alérgeno Alt a 1 y del extracto alergénico de *Alternaria alternata*

Para la realización de las pruebas cutáneas mediante prick test, se empleó una concentración de alérgeno Alt a 1 de 1.5 mcg/mL y de 1.14 mg/mL del extracto alergénico de *Alternaria alternata*, ambas en una solución glicero salina al 50%.

La definición de la concentración elegida se realizó en base a estudios previos que demuestran que ambas concentraciones corresponden al denominado valor HEP, establecido mediante el cálculo de la media geométrica de las áreas de pápulas en relación con la media geométrica de las áreas de pápula obtenida por la histamina. De esta manera se aplicó la equivalencia siguiente:

$$10.000 \text{ UB} = 1\text{HEP}$$

De esta forma 10.000 unidades biológicas se corresponden con 1 unidad HEP (Histamin Equivalent Prick), es decir que el área de papula generada por la histamina a 10 mg/mL se corresponde con el área de papula generada por el extracto alergénico de *Alternaria alternata* a 1,14 mg/mL, y con el área de papula generada por el extracto de Alt a 1 a 1.5 µg/mL.

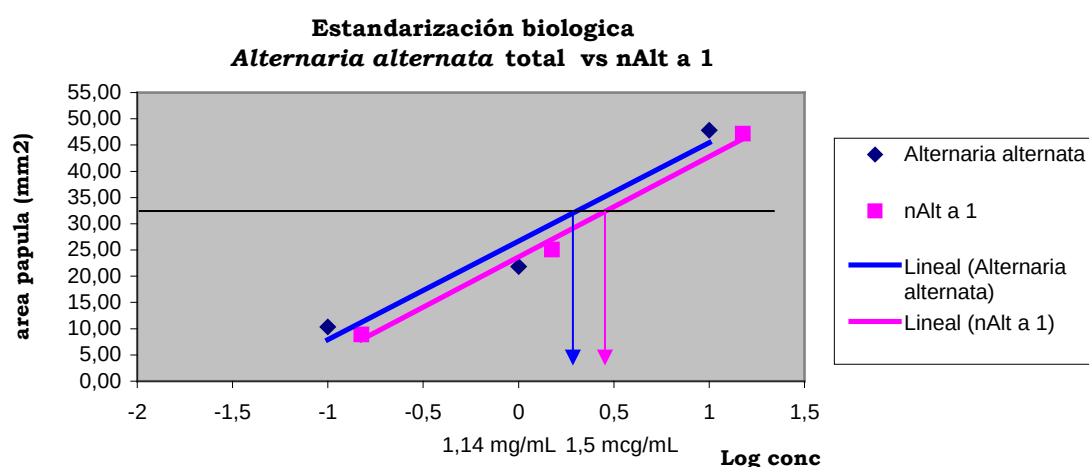


Figura 29: Estandarización biológica de Alt a 1

7. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE INCIDENCIA

Para establecer el estudio epidemiológico y la rentabilidad clínica diagnóstica del diagnóstico con Alt a 1 se tabularon y codificaron los datos de acuerdo a las variables estudiadas y que se definen a continuación:

Variables codificadas:

- Sexo:
1=hombre
2=mujer
- Antecedentes familiares atopia:
1=padre
2=madre
3=Ambos
4=ninguno
5=hermanos
- Sensibilidad extractos alérgicos:
1=negativo
2=positivo
- Concordancia con CAP:
1=No
2=si
- Síntomas:
1=Rinitis
2=Asma
3=RAM*
4=RAL**
5=DA***
6=Urticaria
7=Otros
8=Rinitis+Asma
9=Rinitis+Asma+RAL
10=Rinitis+Urticaria
11=Rinitis+DA
12=Rinitis+Asma*RAM
13=Rinitis+RAL
- Cap positivo:
1=si es positivo
2=si no es positivo

*RAM: Reacciones alérgicas a medicamentos

**RAL: Reacciones alérgicas a alimentos

***DA: Dermatitis atópica

nd: no detectables

ND: no definidos o indeterminados

Resultados

El siguiente cuadro muestra la tabulación de los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas y en los títulos de Ig específica (clases) frente a extractos de *Alternaria alternata* y a su alérgeno mayor Alt a 1:

Paciente	Edad	Sexo	Alternaria*	Alt a 1*	Histamina*	IgE concord.	Síntomas
RB:1	16	1	38.05	84.65	32.52	2	ND
RP:2	37	1	Negativo	Negativo	32.8	2	8
PM:3	39	2	Negativo	Negativo	11.32	2	ND
LA:4	34	2	Negativo	3.99	4.7	2	9
EF:5	19	1	67.74	23.54	25.09	2	ND
MC:6	39	2	0.56	Negativo	22.38	2	ND
AM:7	29	1	18.12	19.99	11.27	2	8
DH:8	53	2	Negativo	Negativo	22.39	2	ND
KM:9	16	1	19.24	19.07	18.35	nd	ND
RP:10	39	2	2.92	7.41	18.3	nd	2
IV:11	30	2	22.28	24.78	21.6	2	ND
MG:12	36	2	22	9.11	20.07	nd	6
DT:13	27	2	23.55	16,85	50.8	1	1
FV:14	22	1	37.25	30.83	32.08	1	ND
NI:15	17	2	31.45	24.08	30.77	1	1
BI:16	5	2	Negativo	Negativo	17.38	nd	ND
TR:17	24	2	54,34	33.63	46.11	1	8
MM:18	12	1	23.91	7.35	30.38	1	8
MR:19	19	2	24,84	16.11	17.46	1	1
MS:20	37	1	22.17	Negativo	14.11	1	10
JP:21	7	1	17.54	Negativo	24.5	nd	8
AM:22	19	1	6.56	4.2	27.01	1	nd
SR:23	16	2	Negativo	Negativo	20.64	2	11
GL:24	42	2	Negativo	Negativo	26.06	2	12
DN:25	27	1	Negativo	Negativo	26.93	2	8
IG:26	48	2	Negativo	Negativo	18,5	1	1
TM:27	43	2	Negativo	Negativo	24.84	2	13
NC:28	20	2	Negativo	Negativo	30.2	2	12

Tabla 8: Tabulación de pacientes por edad sexo y criterios de positividad “in vivo” mediante prick test e “in vitro”.

*Los valores de *Alternaria*, Alt a 1 y el control positivo de histamina se muestran en área de pápulas expresadas en mm².

De forma análoga se establecieron los resultados con la batería de alérgenos estándar, tabulados sobre los mismos pacientes y expresando así mismo los antecedentes atópicos declarados en la historia clínica:

Dp: ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*

Df: ácaros *Dermatophagoides farinae*

Bl: ácaros *Blomia*

Le: ácaros *Lepidoglyphus*

Ty: ácaros *Tirophagus*

Ep: Epitelio de perro

Eg: Epitelio de gato

Lo: pólen de gramíneas *Lolium perenne*

Ar: pólen de malezas *Artemisia vulgaris*

Ol: pólen de árboles *Olea europaea*

Clave:

1: Negativo

2: Positivo

Resultados

Paciente	Antecedentes	Dp	Df	Bl	Le	Ty	Ep	Eg	Lo	Ar	Ol	Alternaria IgE +	Alt a 1 IgE +
RB:1	4	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	2
RP:2	4	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
PM:3	4	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
LA:4	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1
EF:5	4	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1
MC:6	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM:7	4	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
DH:8	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KM:9	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
RP:10	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
IV:11	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
MG:12	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
DT:13	4	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
FV:14	4	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2
NI:15	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
BI:16	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
TR:17	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1		2	2
MM:18	4	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2
MR:19	4	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
MS:20	5	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2
JP:21	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
AM:22	4	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
SR:23	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1
GL:24	4	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
DN:25	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
IG:26	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2
TM:27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NC:28	3	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 9: Tabulación de pacientes por antecedentes y positividad en pruebas “in vivo” a la batería estándar ensayada e “in vitro” por la presencia de IgE específica (CAP).

La muestra de la población estudiada sobre 28 pacientes arrojó los siguientes resultados:

- El número de pacientes monosensibilizados a *Alternaria alternata* sin sensibilización a otros alérgenos inhalantes obtenidos ha sido de 2 pacientes, lo que representan un 7.1% del total de la población estudiada.
- El número de pacientes polisensibilizados a alérgenos inhalantes, que incluyen una sensibilización a *Alternaria alternata* ha sido de 10, lo que representan un 36% del total de la población estudiada.
- La concordancia entre pruebas cutáneas positivas e Ig E específica ha sido de 14 sobre 23, lo que representa un 61% del total de la población estudiada referido sólo a *Alternaria alternata*.
- Los alérgenos asociados a la polisensibilización más importantes fueron ácaros:

Dermatophagoides pteronyssinus que representan un 80% del total de la población estudiada.

El epitelio de perro y la especie de ácaros *Dermatophagoides farinae* fueron los siguientes alérgenos más asociados a la sensibilización por *Alternaria alternata* y que representan un 75% del total de la población estudiada.

- La historia familiar fue positiva en un 29% de los padres del total de la población estudiada.
- La distribución pediátrica/adulta de la sensibilización a *Alternaria alternata* fué de 7/21 y 3/9 para Alt a 1; que representan un 25% y un 75% del total de la población estudiada.
- La distribución por sexos de sensibilización a *Alternaria alternata*/Alt a 1 fué de 17/6 en mujeres y de 11/6 en varones, lo que representa un 60.7% y un 39.3% respectivamente del total de la población estudiada.
- La edad de sensibilización a *Alternaria alternata* se estableció en varones/hembras en los 23/26 años.
- El asma sólo o asociado a otras patologías para *Alternaria alternata*/Alt a 1 se presentó en 10/2 pacientes, que representan un 36% y un 17% del total de los pacientes sensibilizados.

8. RENTABILIDAD CLINICA DIAGNOSTICA CON EL ALERGENO Alt a 1

La realización paralela de las pruebas cutáneas con el extracto alergénico de *Alternaria alternata* y el alérgeno mayor purificado Alt a 1, en los pacientes mono y polisensibilizados a *Alternaria alternata* arrojó los siguientes resultados:

- Número de pacientes estudiados sensibilizados a *Alternaria alternata*: 12 en pruebas cutáneas por prick y de 13 en IgE específica (CAP).
- La concordancia entre resultados de pruebas cutáneas con el alérgeno Alt a 1 y el extracto alergénico de *Alternaria alternata* fue del 58%.
- Las concordancias entre los resultados obtenidos con la titulación de sueros humanos de fijación de Ig E específica:
 - .) Positivos Ig E específica frente a *Alternaria alternata*: 13 (57%)
 - .) Positivos Ig E específica frente al alérgeno Alt a 1 fue de: 13 (57%)
- Las concordancias pruebas cutáneas positivas – Ig E positivas se estableció:
 - .) Concordancias con *Alternaria alternata*: 77%*

.) Concordancias con el alérgeno Alt a 1: 54%

*Se tabularon 2 pacientes con prick positivo sin valor de Ig E específica

- El valor predictivo diagnóstico del alérgeno Alt a 1 se estableció en 60%*

*Se consideran 10 pacientes con positividad a *Alternaria* en prick e IgE (CAP)

Se consideran 6 pacientes con positividad a Alt a 1 en prick y CAP

En resumen los resultados analizados aportan los siguientes datos:

Descripciones	Valores	%
Pacientes monosensibilizados a Alt a 1		7.1
Pacientes polisensibilizados y positivos a Alt a 1		36
Concordancia IgE específica (CAP) y prick <i>Alternaria</i>		61
Alérgenos en polisensibilizados y positivos a <i>Alternaria</i>		80
Historia familiar positiva		29
Edad pediátrica en el estudio		25
Población pediátrica sensibilizada a <i>Alternaria</i>		30
Población adulta: varones sensibilizados a <i>Alternaria</i>		50
Población adulta: mujeres sensibilizadas a <i>Alternaria</i>		50
Rango de edad de varones sensibilizados a <i>Alternaria</i>	23	
Rango de edad de mujeres sensibilizadas a <i>Alternaria</i>	26	
Casos de asma	10	36
Casos de asma por <i>Alternaria</i>	2	17
Concordancia entre <i>Alternaria</i> y Alt a 1	7	58
Positivos con IgE específica a <i>Alternaria</i>	13	57
Concordancia IgE específica (CAP) y prick <i>Alternaria</i>		77
Concordancia IgE específica (CAP) y prick Alt a 1		54

Tabla 10: Resumen de resultados

DISCUSSION

Los extractos alergenicos son herramientas indispensables en el diagnostico de las enfermedades alérgicas, así como en la investigación de los procesos y componentes implicados en este fenómeno (Bousquet, 1998)

En los extractos alergénicos sólo una pequeña parte de las proteínas extraídas muestran actividad alérgica. Esto implica que tanto en el diagnóstico, como durante la inmunoterapia podemos estar administrando moléculas que pueden tener un efecto desconocido, beneficioso, inocuo, irritativo e incluso perjudicial, en la respuesta inmune y por tanto en el paciente.

Se ha descrito la posibilidad de que la expresión y presencia de determinados alérgenos, como ocurre con los pólenes, se restrinjan a ciertos estadios del desarrollo o que ciertos extractos puedan estar contaminados, como podría pasar por ejemplo epitelios de animales contaminados con ácaros. Además, en los extractos complejos las proteínas de interés pueden presentar problemas de estabilidad afectadas en alguna medida por la presencia de otros componentes de la mezcla.

El objetivo de la estandarización de extractos alergénicos es preparar composiciones conocidas de forma reproducible, con un potencial biológico susceptible de ser calibrado en la producción industrial para el uso diagnóstico y terapéutico (Bousquet, 1998) y está claro que se puede conseguir de una forma más precisa con uno o varios de los alérgenos perfectamente caracterizados (van Ree, 1998). La estandarización de los extractos alergenicos se encuentra cimentada sobre la base de la cuantificación de los alérgenos mayores (van Ree, 2000). Este aspecto es mas importante en el caso de un extracto altamente heterogéneo y complejo como es la *Alternaria alternata*.

La cuantificación de alérgenos mayores y de Alt a 1 en concreto, es importante para la estandarización de extractos fúngicos porque permite que el control de calidad de la fuente alergénica, la optimización de los procesos de extracción, y la comparación entre distintos lotes con el extracto de referencia previamente estandarizado, sea mas efectivo. El caso del Alt a 1 es un modelo ideal pues se cumplen los condicionamientos de categorización de un alérgeno mayor y que representa que por encima del 50% de los pacientes sensibilizados a la fuente alérgica se reconozca el citado alérgeno (De Vougue, 1997)

Si bien una sola proteína no cubriría comprensiblemente todo el espectro de alérgenos presentes en un extracto complejo, en determinadas circunstancias y fuentes alérgicas, donde la prevalencia de los alérgenos aislados sea significativa, su empleo puede y debe estar indicado. Tal es el caso del alérgeno purificado Alt a 1, que puede cuantificar su implicación en la sensibilización con la misma precisión que el extracto alérgico de *Alternaria alternata* y además, puede ser purificado industrialmente, proporcionando además una adecuada estabilidad tras una efectiva estrategia de liofilización.

El procedimiento de purificación diseñado permite acometer lo anteriormente descrito, dada la caracterización realizada sobre el alérgeno Alt a 1 y el estudio de la cinética de su comportamiento ensayada ampliamente mediante las técnicas de SDS PAGE, immunoblotting y ELISA realizadas paralelamente con

el extracto alergénico de *Alternaria alternata* empleando sueros humanos y antisueros policlonales monoespecíficos producidos en conejos.

Los ensayos realizados mediante técnica ELISA e inmunoblotting empleando estos antisueros generados, muestran que no parece existir ningún tipo de reactividad cruzada con extractos de otros hongos: *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Stemphylium botryosum* y *Candida albicans*, que implique al alérgeno Alt a 1, confirmandose la especificidad del citado alérgeno Alt a 1 para este antisuero.

Se ha citado una posible reactividad cruzada con *Stemphylium botryosum*, hongo aerovagante que pertenece a la misma familia de *Alternaria alternata* (Familia Pleosporaceae) y que pudiera presentar un reconocimiento similar, en concreto con una proteína que tiene características similares al Alt a 1 (Agarwal, 1982).

La elección de una fuente alergénica natural para la posterior purificación del alérgeno nativo, se produjo tras la cuantificación de la potencia relativa de los extractos alergénicos seleccionados mediante ELISA inhibición observándose, la variedad y posible pleomorfismo descrito para *Alternaria alternata* (Palacios 1986) que el extracto alergénico presenta y la importancia de la fuente alergénica (Mitakakis 2001). La materia prima inicial, procedente del cultivo de la cepa CBS 106-24 por la compañía Allergon (Suecia) presentaba una potencia relativa 6,32 veces mayor que el extracto alergénico procedente de otras fuentes de suministro.

El alérgeno Alt a 1 fué a su vez testado en orden a evaluar su especificidad y sensibilidad mediante el antisuero policlonal monoespecífico de conejo para comparar el grado de reconocimiento que este mostraba por la forma nativa y el extracto alergénico de *Alternaria alternata*, incorporando así mismo un alérgeno recombinante rAlt a 1, común en las técnicas “in vitro” comercialmente disponibles para estudiar la sensibilidad a éste alérgeno, revelando la fijación mediante inmunoblotting. El antisuero policlonal monoespecífico fue capaz de reconocer el dímero de Alt a 1 del extracto de *Alternaria alternata*, con un peso molecular de unos 30 kDa y el monomero de 15-17 kDa presente en el mismo, así como la forma purificada de Alt a 1 de 15-17 kDa y la recombinante de 16-18 kDa. También, mediante ensayo ELISA, se puso de manifiesto el reconocimiento del alérgeno purificado Alt a 1.

El empleo de anticuerpos policlonales monoespecíficos frente al empleo de monoclonales para la realización de éste tipo de técnicas se decidió, dado que el uso de monoclonales genera cierta controversia, dado que si usamos sólo uno, que reconozca un único epitopo, la especificidad puede ser excesiva y sólo reconocer ciertas variantes alergénicas (Aalberse y van Ree, 2000)

El reconocimiento del alérgeno purificado Alt a 1 por un pool de sueros humanos se revelo mediante inmunoblotting, demostrandose de esta manera que el alérgeno Alt a 1 es reconocido por las Ig E específicas del suero de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*. (De Vouge, 1996).

El alérgeno Alt a 1 reacciona con la mayoría de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*. (De Vouge, 1996). De hecho el alérgeno Alt a 1 inhibe en un 70% la actividad del extracto de *Alternaria alternata*, lo que sugiere que el resto de los alérgenos que forman parte del extracto son significativamente menos relevantes clínicamente que el alérgeno Alt a 1, aún cuando el alérgeno Alt a 2 parece puede comportarse como un alérgeno mayor con un reconocimiento de la Ig E estimado en el 61% (Bush 1999). Van Ree y cols (2000) sugieren que normalmente son necesarios de 1 a 3 alérgenos para una correcta estandarización y uso clínico de los alérgenos y en el caso específico de *Alternaria alternata*, los resultados obtenidos muestran la validez de éste axioma.

Estos hechos han sido recientemente demostrados mediante estudios de estandarización de extractos de *Alternaria alternata* total, *Alternaria alternata* sin Alt a 1 y nAlt a 1 sobre una muestra de pacientes sensibilizados. La medición de las papulas obtenidas tras la aplicación de diferentes concentraciones de los extractos antes citados mediante prick test revela que las áreas de las papulas obtenidas con el extracto de *Alternaria alternata* total y las áreas del extracto de Alt a 1 eran estadísticamente equivalentes, no así la del extracto desprovisto de Alt a 1 que originó papulas significativamente menores (Pineda 2005).

Un apartado de importante relevancia en la sensibilización a hongos son los estudios de incidencia de la micoflora alérgica en la atmósfera y que concretamente en el caso de *Alternaria alternata*, por su virtual presencia perenne en la atmósfera y en los edificios presenta elevado interés como fuente de sensibilización (Infante 1992) y que consideran junto con el género *Cladosporium* como los más importantes alérgenos fúngicos (Resano 1998). Los estudios realizados en éste sentido por la Red Española de Aerobiología (REA) en la península que apuntan como áreas de mayor incidencia de conidios de *Alternaria* por m³ de aire la ciudad de Córdoba (media diaria 38.04 y pico máximo de 1.152) y de menor incidencia Orense (media diaria 6.02 y pico máximo 101) (Infante 1999). En la Comunidad Canaria los recuentos realizados en La Laguna, muestran una mayor representación de esporas de *Cladosporium* en los recuentos (La Serna 2002).

La asociación entre las aconcentraciones atmosféricas de hongos y el desarrollo de crisis asmáticas es un hecho conocido (Bjomson 2002), habiéndose establecido que concentraciones de esporas en el aire por encima de las 1.000 por m³ de aire suponen un factor de riesgo para fallecer por una crisis de asma en niños y adultos jóvenes (Targonski 1995), así como la mayor frecuencia significativa de ingresos en UVI por causa de asma grave de los pacientes sensibilizados a hongos (Black 2000). La relación causa-efecto y el cumplimiento de los postulados de Thommen ha sido también documentada en los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*, a los que se asocia con un mayor riesgo de padecer asma (Halonen 1997, Perzanowski 1998, Downs 2001, Zurek 2002) y paros respiratorios por asma desencadenados durante la estación estival y otoñal concordantes con las mayores concentraciones de esporas fúngicas (O'Hollaren 1991).

Las cifras de prevalencia de sensibilización a *Alternaria alternata* encontradas en éste estudio, mantienen el patrón de discordancia con las documentadas

del 10% (Corsico 1998) y de 3.1% de polisensibilización y 1.3% de monosensibilización en población pediátrica (Cantani 2004), lo que justifica la necesidad de promover estudios de éste índole incorporando los recuentos aerobiológicos, con el fin de conocer no sólo la estacionalidad del hongo, sino también las cifras pico reactivas, con el objetivo de poder recomendar las medidas terapéuticas adecuadas a los pacientes sensibilizados a éste tipo de alérgenos.

La incorporación de alérgenos purificados y estandarizados biológicamente, como es el caso del alérgeno mayor Alt a 1, favorece además el diagnóstico clínico y abre nuevas líneas de investigación no sólo en el diagnóstico clínico, sino también en el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

CONCLUSIONES

1. Se consiguió una purificación prácticamente a homogeneidad del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, mediante una combinación de técnicas cromatográficas de intercambio aniónico, catiónico y gel filtración
2. Se estableció un rendimiento del proceso de purificación estimado en el 30% del producto intermedio a partir del obtenido en el extracto de *Alternaria alternata*, estabilizándose el alérgeno purificado Alt a 1 mediante liofilización.
3. Se estudiaron las principales características biológicas del alérgeno mayor Alt a 1, comparativamente con el extracto alergénico de *Alternaria alternata*, mostrándose sus características cinéticas mediante la aplicación de técnicas electroforéticas de SDS PAGE e immunoblotting, así como de ELISA, mediante el uso de anticuerpos policlonales monoespecíficos anti Alt a 1 en conejos y sueros humanos de pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*.
4. Se demostró la ausencia de reactividad cruzada del alérgeno mayor Alt a 1 con extractos de otros hongos: *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Stemphyllium botryosum* y *Candida albicans*, confirmandose la especificidad del alérgeno Alt a 1 para este antisuero
5. Se definió la prevalencia de *Alternaria alternata* en los pacientes alérgicos a hongos en la isla de Gran Canaria, establecida en un 7.1% en el caso de monosensibilizados y del 36% en el de polisensibilizados, siendo las fuentes de sensibilización más comúnmente asociadas los ácaros (especies del género *Dermatophagoides*: *D. pteronyssinus* 80% y el epitelio de perro conjuntamente con otra especie del mismo género de ácaros *D. farinae* 75%). Otros valores de interés relacionados, como los antecedentes familiares de atopia y la distribución por edad y sexo de la sensibilización, fueron definidos en la población estudiada.

6. Se demostró la rentabilidad clínica del diagnóstico de la sensibilidad a *Alternaria alternata*, mediante el empleo del alérgeno mayor Alt a 1 en forma paralela con el extracto de *Alternaria alternata*, fijándose los valores predictivos diagnósticos mediante pruebas cutáneas por prick test y fijación de IgE específica en ambos casos superiores al 50%.
7. La fijación de IgE específica fué del 100% en los pacientes seleccionados sensibilizados a *Alternaria alternata* y en el mismo porcentaje en relación a su alérgeno mayor Alt a 1, que se corresponde con el 57% de la población estudiada presuntamente sensibilizada a hongos (13 pacientes).
8. El valor predictivo del diagnóstico de la sensibilización a *Alternaria alternata* empleando el alérgeno mayor Alt a 1 se estableció en el 60%.

BIBLIOGRAFIA

- Aalberse, R. C. y van Ree, R.** (2000). Monoclonal Antibody Assays for Allergens: Pick Your Antibodies with Care! *J Allergy Clin Immunol* (Editorial) 106, 625-626.
- Aas, K., Backmann, A., Belin, L., y cols** (1978). Standardization of Allergen Extracts with Appropriate Methods. The Combined Use of Skin Prick Testing and Radio Allergosorbent Test. *Allergy* 33, 130-137.
- Aas, K., Leegaard, L. Aukrust, L. Grimmer, Q.** (1980). Immediate Type Hypersensitivity to Common Moulds. *Allergy* 35, 443-451.
- Abbas, A. K., Williams, M. E., Burstein, H. J., Chang, T. L., Bossu, P. y Lichtman, A. H.** (1991). Activation and Functions of CD4+ T-Cell Subsets. *Immunol Rev* 123, 5-22.
- Abraham, S. N. y Arock, M.** (1998). Mast Cells and Basophils in Innate Immunity. *Semin Immunol* 10, 373-381.
- Agarwal, M., Jones, RT., Yunginger, JW.** (1982). Shared Allergenic and Antigenic Determinants in Alternaria and Stemphilium Extracts. *J Allergy Clin Immunol* 70, 437-444.
- Ainsworth GC, S. F., Sussman AS** (1973). The Fungy.A Taxonomic Review. Academic Press, London, 4.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., Akdis, C. A.** (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific Tregulatory1 and Thelper 2 cells. *J Exp Med* 199, 1567-1575
- Arnheim, N. y Southern, E. M.** (1977). Heterogeneity of the Ribosomal Genes in Mice and Men. *Cell* 11, 363-370.
- Asturias, J. A., Arilla, M. C., Ibarrola, I., Eraso, E., Gonzalez-Rioja, R. y Martinez, A.** (2003). A Sensitive Two-Site Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of the Major Alternaria Alternata Allergen Alt a 1. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90, 529-535.
- Aukrust, L., Borch, SM.** (1984). Cross Reactivity of Moulds. *LA/lax* 4, 1-6.
- Baird, B., Sheets, ED., Holowka, D.,** (1999). How Does the Plasma Membrane Participate in Cellular Signaling by Receptors for Immunoglobulin E? *Biophys Chem* 82, 109-119.
- Barnes C, S. K., Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J.** (2000). Comparison of Outdoor Allergenic Particles and Allergen Levels. *Ann Allergy Asthma Immunol* 84, 47-54.

- Beaumont, F., Kauffmann, HF., deMonchy, JGR., Sluiter, HJ., de Vries, K.** (1985). Volumetric Aerobiological Survey of Conidial Fungi in the North-East Netherland. Ii. Comparison of Aerobiological Data and Skin Test with Mold Extracts in an Asthamtic Population. *Allergy* 46, 99-104.
- Bellinghausen, I., Knop, J., Saloga, J.** (2001). The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 126, 97-101
- Bellinghausen, I., Konig, B., Bottcher, I., Knop, J., Saloga, J.** (2005). Regulatory activity of human CD4+CD25+ T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology* 116, 103-111.
- Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D., de la Salle, C.,** (1992). Human Epidermal Langerhans Cells Express the High Affinity Receptor for Immunoglobulin E (Fc ϵ RI). *J Exp Med* 175, 1285-1290.
- Biguet, J., Tran Van Ky, P., andrieu, S., Fruit, J.** (1964). Analyse Immunoelectroforetique D'Extraits Celulaires Et De Milieu De Culture D'Aspergillus Fumigatis Par Des Immunoserums Experimentaux Et Des Serums Malades Attints D'Aspergiloma Broncopulmonaire. *Bulletin de la Societe Mycologique de France* 75, 273-284.
- Bjomson, C. L., Mitchell, I., Adair, C., Green, F., Rose, M. S.** (2002). Chinook weather conditions, air pollution, and allergens: association with emergency rooms visits for asthma. *Proceedings American Thoracic Society*. 98 International Conference 2002. B39 poster E26.
- Black, P. N., Udy, A. A., Brodie, S. M.** (2000). Sensitivity to fungal allergen is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 55:501-504.
- Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H., Kinet, J.P.,** (1989). Complete Structure and Expression in Transfected Cells of High Affinity Ige Receptor. *Nature* 337, 187-189.
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Ann Biochem* 72, 248-254.
- Breitenbach, M., Achatz, G., Oberkofler, H., Simon, B., Unger, A., Lechenauer, E., Kandler, D., Ebner, C., Kraft, P.** (1995). Molecular Characterization of Allergens of Cladosporium Herbarum and Alternaria Alternata. *International archives of allergy and Immunology* 107, 458-469.
- Brower, J.** (1996). Cross-Reactivity between Aspergillus Fumigatus Y Penicillium. *International archives of allergy and Immunology* 110, 166-173.

- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. y Wiley, D. C.** (1993). Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Burge, H. A.** (1992). Classification of the Fungi. *Clin Rev Allergy* 10, 153-163.
- Bush, R., Sanchez, H., Geisler, D.,** (1999). Molecular Cloning of a Major *Alternaria Alternata* Allergen, Ralt a 2. *J Allergy Clin Immunol* 104, 665-671.
- Busse, J. E. G. a. W. W.** (2002). Relationship of Viral Infections to Wheezing Illnesses and Asthma. *Nature reviews* 2, 132-138.
- Cantani, A., Businco, E., Maglio, A.** (1988). *Alternaria* Allergy: A Three Year Controlled Study in Children Treated with Immunotherapy. *Allegologia et Immunopathologia* 16, 1-4.
- Cantani, A., Ciaschi, V.** (2004). Epidemiology of *Alternaria alternata* allergy: a prospective study in 6840 italian astmatic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sc* 8:289-294.
- Cole, G., Samson, RA.** (1984). The Conidia. Mould allergy Y al-Doory and JF Domson Ch 5 Lea and Febiger Philadelphia, 66-103.
- Constant, S. L., Lee, K. S. y Bottomly, K.** (2000). Site of Antigen Delivery Can Influence T Cell Priming: Pulmonary Environment Promotes Preferential Th2-Type Differentiation. *Eur J Immunol* 30, 840-847.
- Cookson, W. O., Moffatt, M.F.,** (2000). Genetics of Asthma and Allergic Disease. *Hum Mol Genet* 9, 2359- 2364.
- Corsico, R., Cinti, B., Feliziani, V., Gallesio, M. T., Liccardi, G., Loreti, A.** (1998). Prevalence of sensitization to *Alternaria* in allergic patients in Italy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 80:71-76.
- Costa, J. J., Weller, P. F. y Galli, S. J.** (1997). The Cells of the Allergic Response: Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *Jama* 278, 1815-1822.
- CHMP/BWP/304831/96** (2007). Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues. EMEA.
- Curran, I., Young NM., Burton, M., Vijay, HM** (1993). Purification and Characterization of Alt a-29 from *Alternaria Alternata*. *International archives of allergy and Applied immunology* 102, 267-275.
- Chung, C., Nickerson, W.** (1954). Polysaccharide Syntheses in Growing Yeast. *J Biol Chemistry* 208, 395-406.

- De Vouge, M., Thaker, A.J., Curran, I.H.A., Zhang, L., Muradia, G., Rode, H., Vijay, H.M.** (1996). Isolation and Expression of a Cdna Clone Encoding an Alternaria Alternata Alt a 1 Subunit. *International archives of allergy and immunology* 111, 385-395.
- Deards, M., Montague, A.E.** (1991). Purification and Characterization of a Major Allergen of Alternaria Alternata. *Molecular Immunology* 28, 409-415.
- Dreborg, S.** (1984). Skin Test Used in Type I Allergy Testing (Posotion Paper). *Allergy* 39, 596-601.
- Downs, S. H., Mitakakis T. Z., Marks, G. B., Car, N. G., Belousova E. G., Leuppi J. D.** (2001). Clinical importance of Alternaria exposure in children. *Am J Respir Crit Care Med* 164:455-459.
- Durham I, S. C. A., Trowsdale L** (1987). Molecular Mapping of the Human Major Histocompatibility Complex by Pulse-Field Electrophoresis. *Proc Nat Acad Sci USA* 84, 7237-7241.
- Einarsson, R., Aukrust, L.** (1992). Allergens of the Fungi Imperfecti. *Clinical Reviews in allergy* 10, 165-190.
- Feijen, M., Gerritsen, J., Postma, D.S.,** (2000). Genetics of Allergic Disease. *Br Med Bull* 56, 894-907.
- Feinberg, S.** (1935). Mold Allergy. Its Importance of Asthma and Hay Fever. *Wisconsin medicine journal* 34, 254-257.
- Folkerts, G., Walzl, G., Openshaw, P.J.,** (2000). Do Common Childhood Infections 'Teach' the Immune System Not to Be Allergic? *Immunol Today* 21, 118-120.
- Galli, S. J., Maurer, M. y Lantz, C. S.** (1999). Mast Cells as Sentinels of Innate Immunity. *Curr Opin Immunol* 11, 53-59.
- Garman, S. C., Kinet, J.P., Jardetzky, T.S.,** (1998). Crystal Structure of the Human High-Affinity Ige Receptor. *Cell* 95, 951-961.
- Gershoni, J. M. y Palade, G. E.** (1983). Protein Blotting: Principles and Applications. *Anal Biochem* 131, 1-15.
- Grant, J.** (1992). Fundamentals of the Immune System and Hypersensitivity Reactions. *Allergy: Theory and Practice*; 2th. Ed. Philadelphia. WB Saunders Co. 7-18.
- Gravesen, S., Frisvad, J.C., Samson, R.A** (1994). *Microfungi*. Munksgaard Copenhagen.
- Gravesen, S., Nyholm, C.** (1983). Common Major Allergen in Alternaria and Ulocadium. *Folia Alergologica et Immunologia clinica* 80, 669-679.

Gregory, P. (1973). Microbiology of the Atmosphere. L Hill Aylesbury.

Grunewald, S. M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein, C. E., Brocker, E. B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W. y Duschl, A. (1998). An Antagonistic Il-4 Mutant Prevents Type I Allergy in the Mouse: Inhibition of the Il-4/Il-13 Receptor System Completely Abrogates Humoral Immune Response to Allergen and Development of Allergic Symptoms in Vivo. *J Immunol* 160, 4004-4009.

Halonen, M., Stern D. A., Wright A. L., Taussig, L. M., Martínez F. D. (1997). Alternaria is a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1356-1361.

Harlow, E., Lane, D. (1988). Antibodies, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harris, L. (1940). Experimental Reproduction of Respiratory Mould Allergy. *Journal of allergy* 14, 279-282.

Hawksworth DL, K. P., Sutton BC, Pegler DN (1995). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi 8^o ed CAB International, Wallingford.

Hiller, R. e. a. (2002). Microarrayed Allergen Molecules: Diagnostic Gatekeepers for Refined Allergy Treatment. *FASEB J Jan 14* (DOI 10.1096/fj.01-0711fje).

Holgate, S. T., Church, M (1993). Allergy Gower medical Publishing. Londres.

Horner, W., Helbling, A., Salvaggio, JE., Lehrer, SR. (1995). Fungals Allergens. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 161-179.

Horst, M., Hejjaoui, A., Horst, V., michel, F.B., Bousquet. (1990). Double Blind Placebo Controlled Rush Immunotherapy with a Standardized Alternaria Extract. *J Allergy Clin Immunol* 85, 460-472.

Infante, F., Galán C., Domínguez, J., Angulo, J., Mediavilla, A. (1992). Air spore microfungi in dwellings of South of Spain. *Aerobiol* 8 (2):245-253.

Infante, F. (1997). Caracterización aerobiológica de los principales hongos de interior. *Rev Portuguesa Immunoalergol* 5(2):108-115.

Infante, F., Alba, F., Caño, M., Castro, A., Domínguez, E., Méndez, J., Vega, A. (1999). A comparative study of the incidence of *Alternaria* conidia in the atmosphere of five spanish cities. *Polen* 10:05-13.

Jongepier, H., Boezen, H. M., Dijkstra, A., Howard, T. D., Vonk, J. M., Koppelman, G. H., Zheng, S. L., Meyers, D. A., Bleecker, E. R. y Postma, D. S. (2004). Polymorphisms of the Adam33 Gene Are Associated with Accelerated Lung Function Decline in Asthma. *Clin Exp Allergy* 34, 757-760.

- Kaad, P., Ostergaard, PAA.** (1982). The Hazard of Mould Hyposensitization in Children with Asthma. *Clin Allergy* 12, 317-320.
- Karlsson-Borga, A., Jonsson, P., Rolfsen, W.** (1989). Specific Ige Antibodies to 16 Widespread Mold Genera in Patients with Suspected Mold Allergy. *Annals of allergy* 63, 521-526.
- Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S. G. y Trowsdale, J.** (1991). A New Human Hla Class II-Related Locus, Dm. *Nature* 353, 571-573.
- Kim, S., Chaparas, SD.** (1979). Characterization of Antigens from *Aspergillus Fumigatus*. Iii. Comparison of Antigenic Relationships of Clinically Important *Aspergilli*. *American Review of Respiratory Disease* 120, 1297-1303.
- Kinet, J. P.** (1999). The High-Affinity Ige Receptor: (Fc ϵ ri) from Physiology to Pathology. *Ann Rev Immunol* 17, 931-972.
- Kinet, J. P., Blank, U., Ra, C., White, K., Metzger, H., Kochan, J.,** (1988). Isolation and Characterization of Cdnas Coding for the Beta Subunit of the High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E. *Proc Nat Acad Sci USA* 85, 6483-6487.
- Koivikko, A.** (1983). Patient Exposure to Moulds. Mould allergy workshop Foucard, t & Dreborg, S Upssala, 35-41.
- Kumar, A., Kurup, VP., Greenberger, PA., Fink, JN.** (1993). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody to a Major Concanavalin A-Nonbinding Antigen of *Aspergillus Fumigatus*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 121, 431-436.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- La Serna, I., Dopazo, A., Aira M. J.** (2002). Airborne fungal spores in the campus of Anchieta (La Laguna, Tenerife/Canary Is.). *Grana* 41:119-123.
- Levings, M.K., Roncarolo M. G.** (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4CD25 and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 293, 303-326.
- Licorish, K., Novey, H., Kozak, P., Fairshier, RD., Wilson, AF.** (1985). Role of *Alternaria* and *Penicillium* Apores in the Pathogenesis of Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 76, 819-825.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., Robinson, D., S.** (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-driven T cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608-615

Lopez, M. S., JE (1985). Mold-Sensitive Asthma. *Clinical Reviews in allergy* 3, 183-196.

Malling, H. (1987). Skin Prick Test: Methodological Studies and Clinical Applications. Linköping University Medical Dissertation n° 239.

Malling, H. J., (1992). Immunotherapy for Mold Allergy. *Clinical Reviews in allergy* 10, 237-251.

Malling, H. J., Dreborg, S., Weeke, B. (1986). Diaagnosis and Immunotherapy in Mould Allergy. Iii. Diagnosis in Cladosporium Allergy by Means of Symptom Score, Bronchial Provocation Test, Skin Prick Test, Rast,Crie and Histamine Release. *Allergy* 41, 57-67.

Malling, H. J., Dreborg, S., Weeke, B. (1987). Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. Iv. Igenediated Parameters During a One Year Placebo Controlled Study of Immunotherapy with Cladosporium. *Allergy* 42, 305-314.

Malling, H. J., Agrell, B., Croner, S., Dreborg, S., Foucard, T., Kjelman, M., Koivikko, A., Roth, A., Weeke, B. (1985). Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. I. Screnning for Mould Allergy. *Allergy* 40, 108-114.

Malling, H. J., Skov, PS., (1988). Diagno Sis and Immunotherapy in Mold Allergy. Viii. Qualitative an Quantitative Estimation of Ige in Cladosporium Immunotherapy. *Allergy* 43, 228-238.

Martinez, J. (1986). Relaciones Huesped Parasito En La Aspergillosis Aviar. Estudio De La Respuesta Inmune Humoral De Columbia Limbia Frente a La Inmunización Con Antigenos Aspergilares Y De Sus Respuesta Histologica En La Infección Experimental.Consideraciones Epidemiologicas. Tesis doctoral Barcelona.

Martinez, J., Martinez, A., Eraso, E, Guisantes, J., Palacios, R., (1994). Estudio De Reactividad Cruzada Entre Alternaria Alternata Y Otros Hongos De Interes Alergologico. revista Iberoamericana de micologia 11, 68-70.

Martinez, J., Martinez, A., Gutierrez, G., Llamazares, A., Palacios, R., Saenz de Santamaria, M., (1994). Influencia Del Proceso De Obtencion En La Actividad Alergenica Y Rendimiento De Extractos De Alternaria Alternata. revista Iberoamericana de micologia 11, 13.

McFadden, E. R., Jr. y Gilbert, I. A. (1992). Asthma. *N Engl J Med* 327, 1928-1937.

Metcalfe, D. D., Baram, D. y Mekori, Y. A. (1997). Mast Cells. *Physiol Rev* 77, 1033-1079.

Mishra, S., Ajello, L., Ahearn, DG., Burge, HA., Kurup, VP., Pierson, DL., Price, DL., Samson, RA., Sandhu, RS., Shelton, B., Simmons, RB.,

- Switzer, KF** (1992). Environmental Mycology and Its Importance to Public Health. *Journal of medical and veterinary mycology* 30, 287-305.
- Mitakakis, T., Barnes, C., Tovey, ER.** (2001). Spore Germination Increases Allergen Release from *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 107, 388-390.
- Mudde, G. C., Van Reijssen, F. C., Boland, G. J., de Gast, G. C., Bruijnzeel, P. L. y Bruijnzeel-Koomen, C. A.** (1990). Allergen Presentation by Epidermal Langerhans' Cells from Patients with Atopic Dermatitis Is Mediated by Ige. *Immunology* 69, 335-341.
- Neukirch, C., Henry, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F.** (1999). Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma?. A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 103:709-711.
- Nilsson, D.** (1983). General Biology Collecting Methods and Prevalence of Moulds in Europe. Mould allergy workshop Foucard, t & Dreborg, S Upssala, 13-34.
- Nilsson, D., Aas, K.** (1978). Immunological Specific and Correlation of Diagnostic Test for Bronchial Allergy to *Cladosporium Herbarum*. *Acta paediatrica scandinavia* 65, 33-38.
- Nyholm, L., Lowenstein, H., Yunyinger, JW** (1983). Immunochemical Partial Identity between Two Independently Identified and Isolated Major Allergens from *Alternaria Alternata* (Alt-1, Ag1). *J Allergy Clin Immunol* 71, 461-467.
- O. Duffort, D. B., F. Polo** (2002). Quantification Assay for the Major Allergen in *Alternaria Alternata*, Alt a 1. *Alergol Inmunol Clin* 17, 162-168.
- O'Neil, C., Reed, MA., Hugges, JM., Butcher, BT., Lehrer, SB.,** (1987). *Fusarium Solani* Evidence for Common Antigenic-Allergenic Determinants with Other Fungi Imperfecti. *Clin Allergy* 17, 127-133.
- O'Hollaren MT, Y. J., Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, et al.** (1991). Exposure to an Aeroallergen as a Possible Precipitating Factor in Respiratory Arrest in Young Patients with Asthma. *N Engl J Med* 324, 359-363.
- Olonitola, P., Dada, JD., Galadima, M., Odama, LE.** (1994). Fungal Spores in the Homes Asthmatic Patients in Zaria, Nigeria. *Annals of allergy* 73, 273-274.
- Osterballe, O., Week, B.** (1979). A New Lancet for Skin Prick Testing. *Allergy* 34, 209-212.
- Ostergaard, P., Kaad, PH., Kristensen, P.** (1986). A Prospective Study on the Safe of Immunotherapy in Children with Severe Asthma. *Allergy* 41, 588-593.

- Palacios, R., Gárate, A. M., Ruíz-Bravo, C.** (1986). Caracterización bioquímica y estandarización inmunológica de los antígenos fúngicos. Libro Ponencias XV Congreso Nacional Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica. 119-127
- Paris, S., Debeaupuis, JP., Prevost, MC, Cassiotto, M., Latge, JP.** (1991). The 31 Kda Major Allergen Alt a I1563 of *Laternaria Alternata*. *Molecular Immunology* 28, 409-415.
- Paris, S., Fitiing, C., Ramirez, E., Latge, JP. David, B.** (1990). Comparison of Diferent Methods of *Alternaria* Allergens. *J Allergy Clin Immunol* 85, 941-948.
- Paris, S., Fitting, C., Latge, JP. Hermann, D., Guinnepain, MT., David, B** (1990). Comparision of Conidial and Micelial Antigens of *Alternaria Alternata*. *International archives of allergy and Applied immunology* 92, 1-8.
- Perzanowsky, M. S., Sporik, R., Squillace, S. P., Gelber, L. E., Call, R., Carter, M.** (1998). Association of sensitization to *Alternaria* allergens with asthma among school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 101:626-632.
- Paul, W. E., Seder, R. A. y Plaut, M.** (1993). Lymphokine and Cytokine Production by Fc Epsilon Ri+ Cells. *Adv Immunol* 53, 1-29.
- Pineda F.** (2005). Expresión y purificación del alérgeno Alt a 1 de *Alternaria alternata*. Implicación en la hipersensibilidad tipo I. Memoria Tesis Doctoral Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Madrid.
- Prince, H. S., WA; Morrow, MB.** (1934). Molds in the Ethiology of Asthma and Hay Fever. *State Journal of medicine* 30, 340-344.
- Quindos, G., Severo, LC., Knight, F., Ponton, J., Hearn, V., McKenzie, DWR** (1993). Antigenic Cross-Reactivitty between *Candida Albicans* and *Aspergillfumigatusus*. *revista Iberoamericana de micologia* 10, 79-82.
- Resano, A., Sanz, M.L., Oheling, A.** (1998). Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in asthmatic patients and its in vitro diagnostic confirmation. *J Invest Allergol Clin Immunol* 8(6):353-358.
- RFE** (1997). 2.5.12; Determinación De Agua:Semimicrodeterminación. 68.
- Robert K. Bush, M., and Jay J. Prochnau, MD** (2004). *Alternaria*-Induced Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 113, 227-234.
- Romagnani, S.** (1997). Atopic Allergy and Other Hypersensitivities Interactions between Genetic Susceptibility, Innocuous and/or Microbial Antigens and the Immune System. *Curr Opin Immunol* 9, 773-775.
- Romagnani, S.** (2004). Immunologic Influences on Allergy and the Th1/Th2 Balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400.

- Saini, S. S., Klion, A. D., Holland, S. M., Hamilton, R. G., Bochner, B. S. y Macglashan, D. W., Jr.** (2000). The Relationship between Serum Ige and Surface Levels of Fcepsilonr on Human Leukocytes in Various Diseases: Correlation of Expression with Fcepsilonri on Basophils but Not on Monocytes or Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 106, 514-520.
- Schafer-Nielsen, C., Svendsen, P. J. y Rose, C.** (1980). Separation of Macromolecules in Isotachophoresis Systems Involving Single or Multiple Counterions. *J Biochem Biophys Methods* 3, 97-128.
- Shen, H., lin, WL., Tsai, JJ., Han, SH** (1996). Allergenic Components in Three Sppecies of *Penicillium*. Cross-Rectivity among Major Allergens. *Clinical exp allergy* 26, 444-451.
- Shen, H., Wang, SR., Tang, RB. y cols** (1988). Identification of Allergen and Antigen of Bermuda-Grass Pollen by Immunoblott Analysis. *Clin Allergy* 18, 401-410.
- Smith, D. H., Malone, D.C., Lawson, K.A., Okamoto, L.J., Battista, C., Saunders, W.B.,** (1997). A National Estimate of the Economic Costs of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 787-793.
- So, A.** (1994). Genetics, Polymorphism and Regulation of Expresion of Hla Region Genes. *Hla and Disease*. Lechler (Ed) San Diego, CA Academic Press Inc.
- Spector, S., Farr, R.** (1979). Bronchial Inhalation Challenge Qth Antigens. *Journal of allergy and clinical immunology* 64, 580-586.
- Steringer, Y., Aukrust, L., Einarsson, R.** (1987). Variability of Antigenicity/Alergenicity in Diffrent Strains of *Alternaria Alternata*. *International archives of allergy and immunology* 84, 190-197.
- Stock, P., Akbari, O., Berry, G., Freeman, G. J., Dekruiff, R. H., Umetsu, D. T.,** (2004). Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 5, 1149-1156
- Targonski, P. V., Persky, V. W., Ramekrshnan, V.** (1995). Effect of enviromental molds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 95:955-961.
- Tarlo, S., fradkin, A. Tobin, RS.** (1988). Skin Testing with Extracts of Fungal Species Derived from the Homes of Allergic Clinic Patients in Toronto, Canada. *Clinical Allergy* 18, 45.52.
- Tee, R., Gordon, DJ., Taylor, AJN.,** (1987). Cross-Reactivity between Antigens of Fungal Extracts Studied by Rast Inhibiton and Immuoblot Technique. *J Allergy Clin Immunol* 79, 627-633.

Torres Rodriguez JM, M. Q. J. (1984). Micosis Que Afectan a La Piel Y Mucosas. Doyma, Barcelona, 1-11.

Torres Rodriguez JM., M. Q. J., Corominas Sanchez., Acebillo J. (1982). Identificación Y Distribución De Hongos Atmosfericos Intra Y Extradomiciliarios En Barcelona Por Medio De Cultivo En Placa. XII Congreso de la SEAIC Sevilla Libro de ponencias y comunicaciones Madrid, 479-482.

Turner, H. y Kinet, J. P. (1999). Signalling through the High-Affinity Ige Receptor Fc Epsilonri. *Nature* 402, B24-30.

Vailes, L., Sridhara, S., Cromwell, O., Weber, B., Breitenbach, M. y Chapman, M. (2001). Quantitation of the Major Fungal Allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in Commercial Allergenic Products. *J Allergy Clin Immunol* 107, 641-646.

Valenta, R. e. a. (1991). Identification of Profilin as a Novel Pollen Allergen; Ige Autoreactivity in Sensitized Individuals. *Science* 253, 557-560.

Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K. y cols. (2002). Association of the Adam33 Gene with Asthma and Bronchial Hyperresponsiveness. *Nature* 418, 426-430.

van Ree, R. (2000). A New Start for Allergen References and Standarzitation Based on Purified (Natural and Recombinant) Allergens Nd Monoclonal and Monospecific Polyclonal Antibodies. Regulatory Control and standarzitation of allergenic extracts Darsmstadt, Germany: GIT Verlag, 87-92.

van Ree, R. y Aalberse, R. C. (1999). Specific Ige without Clinical Allergy. *103*, 1000-1001.

van Ree, R., Van Leeuwen WA, Aalberse RC (1998). How Far Can We Simplfy in Vitro Diagnostics for Grass Pollen Allergy? A Estudy with 17 Pollen Extracts and Purified Natural and Recombinant Allergens. *J Allergy Clin Immunol* 102.

van Ree, R. e. a. (1996). False-Positive Skin-Prick Test Responses to Commercially Available Dog-Dander Extracts Caused by Contamination with House Dust Mite Dermatophagoides Pteronyssinus) Allergens. *J Allergy Clin Immunol* 98, 1028-1034.

Verma, J., ganagal, SV., (1994). Studies of Fusarium Solani. Cross-Reactivity among Fusarium Species. *Allergy* 49, 330-336.

von Hertzen, L. C. (2000). Puzzling Associations between Childhood Infections and the Later Occurrence of Asthma and Atopy. *Ann Med* 32, 397-400.

- Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C. P. y Guggenmoos-Holzmänn, I.** (1997). Indoor Allergen Exposure Is a Risk Factor for Sensitization During the First Three Years of Life. *J Allergy Clin Immunol* 99, 763-769.
- Wardlaw, A. J., Moqbel, R. y Kay, A. B.** (1995). Eosinophils: Biology and Role in Disease. *Adv Immunol* 60, 151-266.
- Weiner, H. L.** (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory T cells. *Immunol Rev* 182, 207-214.
- Webber, K., Osborn, H.** (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4411.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J. y Karp, C. L.** (2001). The Germless Theory of Allergic Disease: Revisiting the Hygiene Hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1, 69-75.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G. y van Ree, R.** (2002). Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 296, 490-494.
- Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C.J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B.,** (1997). Expression of Il-4 and Il-5 mRNA and Protein Product by Cd4⁺ and Cd8⁺ T Cells, Eosinophils, and Mast Cells in Bronchial Biopsies Obtained from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics. *J Immunol* 158, 3539-3544.
- Yunginger, J. W., Jones, R.T., Nesheim, M.E., Geller, M.** (1980). Studies on Alternaria Allergens. III Isolation of a Major Allergenic Fraction (Alt-I). *J Allergy Clin Immunol* 58.
- Zhang, L., Curran, I.H.A., Muradia, G., De Vouge, M.W., Rode, H., Vijay, H.M.** (1995). N-Terminals of a Major Allergen Alt a 1 of Alternaria Alternata Defined to Be an Epitope. *International archives of allergy and immunology* 108, 254-259.
- Zureik, M., Neukirch, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F.** (2002). *European Community Respiratory Health Survey*. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* 325:411-414.