



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Análisis de la producción de IgE sérica y mucosal en respuesta
al polen de *Phleum pratense* en un modelo porcino de
hipersensibilidad respiratoria”**

T E S I S

Que presenta

AXEL SOTO MUÑOZ

Para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

En

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Marco Antonio Vega López

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

Ciudad de México

Agosto, 2019

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero agradecer a las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en los momentos tristes, difíciles y alegres. Estas palabras son para ustedes.

Quiero dar un profundo agradecimiento a mi familia, padres y hermanos por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo del posgrado y sobre todo la paciencia que me han tenido. Este trabajo es de ustedes.

Al Dr. Marco Antonio Vega López y el Dr. César Augusto Sandino Reyes López por la oportunidad que me dieron para formar parte de sus laboratorios, por la paciencia, la orientación, la disponibilidad y por ser estupendos maestros a lo largo de mi trabajo.

Gracias a mi comité tutorial, Dra. Mineko Shibayama Salas y Dr. Leopoldo Santos Argumedo por sus consejos, observaciones y regaños, que sin duda alguna me ayudaron a enriquecer mi trabajo.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado, de la FES-Cuautitlán-UNAM, por proporcionarme el extracto de *Taenia hydatigena*.

Muchas gracias a la Cochiauxiliar Biol. María del Carmen Ramírez Estudillo por el tiempo, paciencia y sobre todo por su enseñanza durante todo mi proyecto, así como al Cochitécnico Luis Alberto Hernández que siempre estuvo disponible para apoyar en las actividades del proyecto.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de inmunobiología de las mucosas por todos sus consejos, opiniones y buena vibra en cada seminario, por lo que agradezco el apoyo del M.V.Z Octavio, M.C. Mario Fragoso Saavedra, Q.F.B. Francisco Huerta. ¡Gracias cochiamigos!

A mis amigos de generación; Alex, Charly, Gaby, Esly, Adrián y Juan por siempre alentarme a seguir, ver más allá de mis expectativas, por el apoyo antes, durante y al término de esta etapa; y a los amigos de toda la vida por siempre animarme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por ser beneficiario con No. de becario 862848

Y por último a mí, por tanta paciencia.

Índice general

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Asma	3
Asma eosinofílica	8
Asma neutrofílica	8
Respuesta inmunológica	9
Interacciones entre células epiteliales y células dendríticas en respuesta a los alérgenos	11
El panorama Th1/Th2	12
Células implicadas	13
LTCD4⁺	13
Mastocitos	13
Papel de los mastocitos en el asma	14
Eosinófilos	15
Basófilos	15
Impacto del asma	15
Prevalencia del asma a nivel mundial	17
Fondo genético	17
Tratamiento para el asma	17
Inmunoglobulinas	18
Cadena pesada	19
Cadena ligera	20
IgA	20
IgG	22
IgE	24
Generalidades	24
Receptores de la IgE	26
Síntesis de IgE	29
Funciones de la IgE	29
Disminución de la IgE total	30

Aumento de IgE total	31
Desencadenantes ambientales de las respuestas de IgE en el asma	31
Alérgenos	31
<i>Phleum pratense</i> (planta timotea)	32
Modelos animales para el estudio del asma	34
El cerdo como modelo experimental traslacional en medicina respiratoria	37
Anatomía pulmonar	37
Histología	37
Antecedentes	39
Justificación	41
Hipótesis	42
Objetivos	43
Objetivo general	43
Objetivos particulares	43
Material y Métodos	44
Resultados	53
Discusión	69
Conclusiones	76
Perspectivas	77
Bibliografía	78
Anexo	86

Índice de tablas

Tabla 1	Concentración de inmunoglobulinas en sangre	26
Tabla 2	Ventajas y desventajas de varios modelos animales de asma	35
Tabla 3	Linearidad de la curva	60
Tabla 4	Precisión intraensayo	61
Tabla 5	Precisión interensayo	62
Tabla 6	Datos de los pacientes asmáticos	88

Índice de figuras

Figura 1	Fisiopatología del asma	4
Figura 2	Proceso de sensibilización en el asma	5
Figura 3	Variantes genotípicas y fenotípicas en el asma	6
Figura 4	Tipos de asma	7
Figura 5	Mecanismos que provocan el broncoespasmo	7
Figura 6	Representación esquemática de la cascada inflamatoria en el asma alérgica	10
Figura 7	Desarrollo de linfocitos Th1 y Th2	12
Figura 8	Estructura de un anticuerpo	20
Figura 9	Factores potenciales que promueven la producción de IgE en el asma	22
Figura 10	Receptores de IgE y su respectiva señalización río abajo	27
Figura 11	Esquema de inmunización para obtener nivel alto sérico de IgE porcina	28
Figura 12	Esquema de inmunización para la obtención del antisuero de ratón anti-IgE de cerdo	44
Figura 13	Esquema representativo de la curva y la muestra problema utilizadas en la estandarización del ELISA anti-IgE de cerdo	48
Figura 14	Esquema representativo del diseño para el ELISA IgE alérgeno-específica	50
Figura 15	Inmunorreactividad de IgG después del paso por la columna de proteína G	51
Figura 16	Inmunorreactividad de IgA después del paso por la columna de afinidad anti-IgA	53
Figura 17	Inmunorreactividad de IgM después del paso por la columna de afinidad anti-IgM	54
Figura 18	SDS-PAGE y Western blot para caracterización de IgE	54
Figura 19	Gel nativo de la IgE porcina	55
Figura 20A y B	Anafilaxia pasiva cutánea	56
Figura 21	Diluciones de los antisueros de ratón anti-IgE porcina	58

Figura 22	<i>Western blot</i> de la especificidad de los antisueros de ratón anti-IgE porcina	59
Figura 23	Análisis de regresión lineal del estándar comercial vs estándar del laboratorio	60
Figura 24	Concentración óptima de recubrimiento de los pozos con el alérgeno	61
Figura 25	Dilución óptima para las muestras séricas	62
Figura 26	ELISA IgE alérgeno – específica de <i>Phleum pratense</i> en suero	63
Figura 27	ELISA IgE alérgeno – específica de <i>Phleum pratense</i> en moco nasal	64
Figura 28	ELISA IgE alérgeno – específica <i>Phleum pratense</i> en saliva	64
Figura 29	IgG, IgA e IgE alérgeno – específica de <i>Phleum pratense</i> en suero	65
Figura 30	IgG, IgA e IgE alérgeno – específica de <i>Phleum pratense</i> en moco nasal	65
Figura 31	IgG, IgA e IgE alérgeno – específica <i>Phleum pratense</i> en saliva	66
Figura 32	IgG e IgA alérgeno–específica de <i>Phleum pratense</i> en lavado broncoalveolar	67
Figura 33	Reactividad de anticuerpos IgE antígeno específicos provenientes del sueros porcinos y pacientes asmáticos, frente a las proteínas inmunológicas de <i>Phleum pratense</i>	68
Figura 34	Proteínas del polen <i>Phleum pratense</i> ya reconocidas de IgE específica en humanos	68

Resumen

El asma alérgica es una hipersensibilidad mediada por IgE, que produce inflamación crónica de las vías respiratorias, remodelación del tejido y disminución reversible del flujo de aire. Esta patología es de importancia en salud pública por su alta incidencia en la población, no tiene cura y, hasta el momento, no se puede diagnosticar tempranamente ni prevenir porque se desconocen sus mecanismos desencadenantes. En México, hasta 8 % de la población padece asma, siendo los niños menores de 5 años los más afectados. Ante la imposibilidad de realizar estudios en humanos sobre los mecanismos desencadenantes, el desarrollo del problema, el diagnóstico temprano, la prueba de nuevos agentes terapéuticos, desensibilizantes y profilácticos, se requieren modelos animales cuyas diferencias con el humano sean mínimas. La mayoría de los modelos empleados están basados en rata o ratón y tienen limitaciones importantes. Los cerdos comparten con el humano similitudes anatomofisiológicas, sobre todo a nivel del sistema respiratorio, con un alto potencial traslacional, por lo que en el laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas se ha desarrollado un modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria mediante un protocolo de sensibilización con un extracto comercial del polen de *Phleum pratense* (*Php*), un alérgeno reconocido en el humano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de IgE específica en suero y mucosas en ese modelo porcino. Ante la poca disponibilidad de anticuerpos comerciales contra la IgE porcina, se purificó y caracterizó IgE de cerdo mediante columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales anti-Ig de cerdo (anti-IgA, anti-IgM y anti-IgG) y se produjeron antisueros policlonales inmunizando ratones con la cadena pesada de IgE porcina. Con esos anticuerpos anti-IgE porcina se estandarizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo indirecto, para evaluar la producción de IgE en suero y mucosas de los cerdos experimentales y controles del modelo de hipersensibilidad respiratoria. Encontrado una producción de esta inmunoglobulina específica en suero, con una diferencia significativa entre los días 49 y 56 del protocolo de inmunización ($P < 0.05$) lo que indica que la IgE va en aumento. Pero sin encontrarse aún una producción en mucosas. También se comparó el patrón de inmunorreactividad de los sueros porcinos y de pacientes asmáticos contra las proteínas alérgicas del extracto comercial del *Php*, encontrando una heterogeneidad en el patrón de reconocimiento tanto en los cerdos como en pacientes asmáticos y la mayoría de los cerdos reconoce a la proteína *Php* p1 como sucede en los pacientes asmáticos. Los resultados confirmaron la bioactividad de la IgE específica asociada a la hipersensibilidad respiratoria en el modelo y describen que los antisueros anti-IgE porcina son adecuados para su uso en ensayos específicos de alérgenos. Esto mejorará la utilidad del modelo porcino en alergias y proporcionará una medida adicional de la respuesta inmune de tipo 2 en los cerdos y, sobre todo; en explicar más sobre la patogénesis del asma, por ejemplo, lo que condiciona que se tenga una inflamación neutrofílica o eosinofílica, en qué momento cambia el perfil de la respuesta de anticuerpos IgM o IgG a uno de IgE, y cuál es la cinética de sensibilización de la mucosa. Por otra parte, probar tratamientos nuevos para el asma, buscar elementos para el diagnóstico temprano que permitan la prevención y el control del desarrollo de la patología o incluso probar tratamientos para revertir (desensibilización) o prevenir el problema, son

metas altamente deseadas que podrían investigarse en un modelo traslacional semejante en tamaño, fisiología y desarrollo al humano, como lo es el cerdo.

Abstract

Allergic asthma is an IgE-mediated hypersensitivity, which causes chronic inflammation of the airways, tissue remodeling and reversible decrease in airflow. This pathology is of importance in public health because of its high incidence in the population, it has no cure and, so far, it cannot be diagnosed early or prevented because its trigger mechanisms are unknown. In Mexico, up to 8% of the population suffers from asthma, with children under 5 being the most affected. Given the impossibility of conducting studies in humans on the triggering mechanisms, the development of the problem, the early diagnosis, the testing of new therapeutic, desensitizing and prophylactic agents, animal models whose differences with the human are minimal are required. Most of the models used are based on rat or mouse and have important limitations. Pigs share with the human anatomophysiological similarities, especially at the level of the respiratory system, with high translational potential, so in the Immunobiology laboratory of Mucous has developed a porcine model of respiratory hypersensitivity by means of a sensitization protocol with a commercial extract of the pollen of *Phleum pratense* (Php), an allergen recognized in humans.

The objective of this work was to evaluate the production of specific IgE in serum and mucous membranes in this pig model. Given the low availability of commercial antibodies against porcine IgE, pig IgE was purified and characterized by affinity columns with anti-pig Ig monoclonal antibodies (anti-IgA, anti-IgM and anti-IgG) and polyclonal antisera were produced by immunizing mice with the porcine IgE heavy chain. With these anti-porcine IgE antibodies, an indirect quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was standardized to evaluate the production of serum and mucous IgE from experimental pigs and controls of the respiratory hypersensitivity model. Found a production of this specific immunoglobulin in serum, with a significant difference between days 49 and 56 of the immunization protocol ($P < 0.05$) indicating that the IgE is increasing. But without still finding a mucous production. The immunoreactivity pattern of porcine sera and asthmatic patients against the allergenic proteins of the commercial extract of Php was also compared, finding a heterogeneity in the pattern of recognition in both pigs and asthmatic patients and most pigs recognize the Php p1 protein as it happens in asthmatic patients. The results confirmed the bioactivity of the specific IgE associated with respiratory hypersensitivity in the model and describe that porcine anti-IgE antisera are suitable for use in specific allergen assays. This will improve the utility of the pig model in allergies and provide an additional measure of the type 2 immune response in pigs and, above all; in explaining more about the pathogenesis of asthma, for example, what determines that there is a neutrophilic or eosinophilic inflammation, when the profile of the response of IgM or IgG antibodies to one of IgE changes, and what is the kinetics of sensitization of the mucosa. On the other hand, trying new treatments for asthma, looking for elements for early diagnosis that allow the prevention and control of the development of the pathology or even trying treatments to reverse (desensitization) or prevent the problem, are highly desired goals that could be investigated in a translational model similar in size, physiology and human development, as is the pig.

Introducción

Asma

El asma se caracteriza por una reacción de las vías aéreas que conduce a una obstrucción reversible del flujo de aire en asociación con la hiperreactividad de la vía aérea (AHR) y la inflamación de ésta [1]. Por ello, el asma alérgica se considera un trastorno heterogéneo de las vías respiratorias que involucra la inflamación, la disminución de la función y la remodelación del tejido. Esta enfermedad afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo, con aproximadamente 250,000 muertes anuales [2]. En las últimas dos décadas, a medida que el corticosteroide inhalado se ha convertido en un agente de tratamiento para la enfermedad, la mortalidad del asma ha disminuido [3]. Los niños tienen el mayor porcentaje de asma en comparación con otros grupos de edad. Se espera que el número de pacientes aumente en más de 100 millones para 2025 [2,3].

En general, la mayoría de los casos de asma comienza en la infancia por la sensibilización a alérgenos inhalados comunes, como los ácaros del polvo doméstico, la caspa de los animales, los hongos y el polen. Estos alérgenos estimulan la proliferación de células T *helper* tipo 2 (Th2) y, posteriormente, la producción y liberación de interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-13) [3]. Además, se han descrito mecanismos epigenómicos que dependen de estímulos ambientales (la dieta, el contacto con microbiota y sus productos metabólicos, la exposición a contaminantes extramuros o intramuros) que pueden modificar la expresión de estos genes de diferentes maneras para activar o inhibir su efecto [4]. Una vez establecida la predisposición, existen múltiples factores desencadenantes (alérgenos, infecciones, contaminantes ambientales, irritantes, cambios de temperatura, ejercicio físico, emociones) que pueden causar exacerbaciones en los pacientes con asma (Figura 1) [3,4]. La inflamación es inducida por la liberación de mediadores químicos por las células inflamatorias. Como resultado de la inflamación crónica de las vías respiratorias, se produce una remodelación del tejido, caracterizada por el engrosamiento de la pared alveolar, que puede tener profundas consecuencias por el estrechamiento de las vías respiratorias, lo que contribuye a la cronicidad y la progresión de la enfermedad [3].

Se cree que el asma surge de la compleja interacción de la susceptibilidad genética y las influencias ambientales [3]. La predisposición genética a montar una respuesta local de inmunoglobulina IgE, conocida como atopia, es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la enfermedad [3]. La mayoría de los problemas asmáticos está asociada con la atopia [4,5], sin embargo, también existen variantes, definidas clínicamente, que no montan una respuesta de IgE a los alérgenos ambientales [7]. La inflamación asociada a Th2 y la producción de IgE también son características del asma no atópica o intrínseca, aunque no se sabe qué impulsa este proceso [5]. De hecho, el asma ahora se considera un trastorno compuesto por distintos endotipos [5,6].

En general, el proceso de la enfermedad se considera como un fenómeno de dos etapas. La primera consiste en la sensibilización a un alérgeno aéreo, la cual da lugar al desarrollo preferencial de linfocitos Th2, antígeno específicos, donde el alérgeno es capturado y procesado por una célula presentadora de antígeno (APC), que lo transporta

hasta el ganglio linfático regional más cercano, en donde lo presenta a los linfocitos T CD4+, dando lugar a una respuesta de tipo Th2 [7]. La activación y diferenciación de linfocitos Th2 da lugar a la producción de diversas citocinas como IL-13, que tiene efecto sobre células caliciformes, dando lugar a la hipersecreción de moco e hiperplasia de células; la IL-5 que aumenta la vida media de los eosinófilos, de IL-4 que da lugar al cambio de isotipo para la producción de anticuerpos IgE específicos para el alérgeno (en los individuos sanos la respuesta generada sería del tipo Th1, caracterizada por la producción de anticuerpo IgG1, la cual está bien controlada y no tiene consecuencias clínicas), la IgE específica se sitúa en los receptores de alta afinidad para la región Fc de las IgE (FcεRI) en la superficie de los basófilos y mastocitos tisulares que los expresan constitutivamente, de tal manera que las células quedan sensibilizadas (Figura 2) [6,7], sin conocerse del todo por que ocurren estos fenómenos en el paciente atópico.

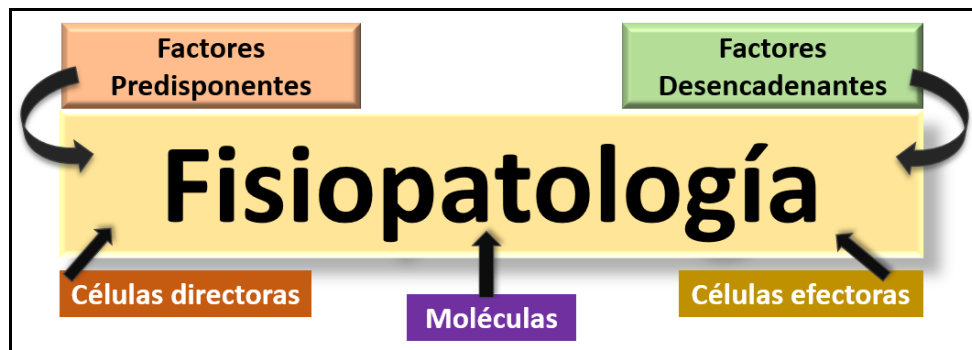


Figura 1. La fisiopatología del asma depende de la interacción entre factores predisponentes, factores desencadenantes, células directoras (como los linfocitos T reguladores, T ayudadores [Th] o las células dendríticas), células efectoras (como mastocitos, eosinófilos y neutrófilos) y moléculas (como citocinas, adhesinas, mediadores químicos y neurotransmisores). Las interacciones entre factores predisponentes y factores desencadenantes con células y moléculas de las vías aéreas, en especial del sistema inmunológico, explican la expresión clínica heterogénea que se puede presentar en cada paciente, lo que se conoce como fenotipo [4].

El asma no alérgico (intrínseco) a menudo se desarrolla más tarde en la vida y, según su definición, no tiene reactividad de IgE. Esta forma de la enfermedad es más común en las mujeres, a menudo se asocia con rinosinusitis crónica y pólipos nasales, así como con la obesidad [7]. El campo del diagnóstico y tratamiento clínico del asma ha experimentado grandes cambios conceptuales a través de la llegada de los estudios de expresión del genoma y los primeros ensayos clínicos que utilizan terapias dirigidas con agentes biológicos. Al igual que con muchas enfermedades inflamatorias crónicas, los médicos ahora se dan cuenta de que la división del asma en solo dos formas clínicas ha sido una simplificación excesiva [7,8].

El mecanismo fisiopatológico implicado en el desarrollo de un fenotipo específico se llama endotipo. Pueden coexistir varios endotipos dentro de un mismo fenotipo (Figura 3), por ejemplo, el asma alérgica es uno de los fenotipos más frecuentes y por lo general aparece

tempranamente en niños, pero al estudiar los mecanismos fisiopatológicos pueden encontrarse varios endotipos: algunos pacientes presentan inflamación eosinofílica dependiente de un patrón linfocitario Th2 predominante, pero otros pueden tener patrones con mayor actividad Th1 o Th17 que también sean específicos para un alérgeno y que causen inflamación de preponderancia neutrofílica (Figura 4) [8].

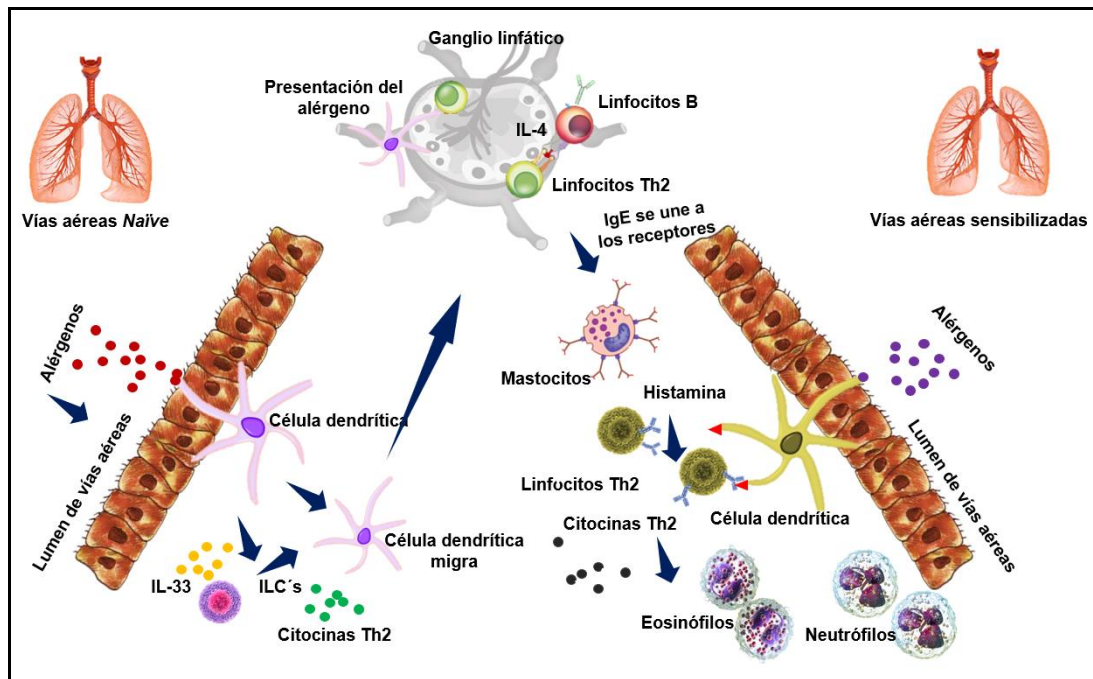


Figura 2. El proceso de sensibilización a IgE respiratoria se inicia por la inhalación de alérgenos en las vías respiratorias *naïve* (izquierda) seguido de la captación de antígenos por las células dendríticas (DC) que recubren el epitelio de las vías respiratorias. Dependiendo del microambiente local, los factores pro/antiinflamatorios son liberados por el epitelio de las vías respiratorias o las células linfoides innatas (ILC) que activan las DC portadoras de alérgenos que migran hacia los ganglios linfáticos de las vías respiratorias. Ahí, las DC presentan el alérgeno al sistema inmune adaptativo. En el caso de la sensibilización a IgE, la presentación de un alérgeno a células T CD4+ inexpertas induce la diferenciación y formación de células efectoras Th2 que migran a las vías respiratorias. Además, la respuesta Th2 también conduce a la producción, por las células B, de IgE específica de alérgeno que se une a los mastocitos y las DC en las vías respiratorias. Tras la nueva exposición al alérgeno (derecha), el entrecruzamiento de la IgE inducida por alérgenos en los receptores de mastocitos conduce a la liberación de histamina y a la infiltración de eosinófilos y neutrófilos. Además, la absorción de antígenos y la presentación local por parte de las DC también dan como resultado la activación de las células Th2, lo que fomenta aún más la infiltración de las células inmunitarias, lo que lleva a la aparición de los síntomas [7,8].

En el fenotipo de inflamación eosinofílica pueden existir diferentes endotipos, pues esta inflamación puede ser mediada por linfocitos Th2 específicos para un alérgeno, pero también por células innatas linfoides tipo 2 (ILC2) no específicas para un alérgeno, en

consecuencia, ambas vías pueden ser activadas por estímulos diferentes [9]. La inflamación en las vías aéreas está presente en diferentes grados durante la evolución de la enfermedad y en las exacerbaciones del asma, aunque en ocasiones puede haber broncoespasmo sin un componente inflamatorio tan notorio.

Además de la inflamación eosinofílica y de la inflamación neutrofílica inducida por linfocitos Th1 o Th17 o por ILCs tipo 1 o tipo 3, pueden existir otros desencadenantes que ocasionen directamente el broncoespasmo [9], entre ellos, las especies reactivas de oxígeno (ROS), que activan la vía del factor nuclear kappa B (NFκ-B), con lo que propician la producción de moléculas proinflamatorias o el incremento del tono colinérgico con liberación excesiva de acetilcolina, favorecida por una falla en los receptores muscarínicos inhibitorios M2; o la activación de canales iónicos TRPA1 (*transient receptor potential cation channel subfamily A, member 1*) por cambios de osmolaridad o temperatura en el epitelio; o por activación de la vía del ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), cortisol endógeno y los receptores de CRH (*corticotropin-releasing hormone*) durante el estrés emocional [10] (Figura 5).



Figura 3. La combinación de variantes genéticas (genotipo) y los mecanismos epigenómicos para expresar o inhibir a estos genes dan como resultado los mecanismos fisiopatogénicos (endotipo) y las manifestaciones clínicas (fenotipo) [5,8].

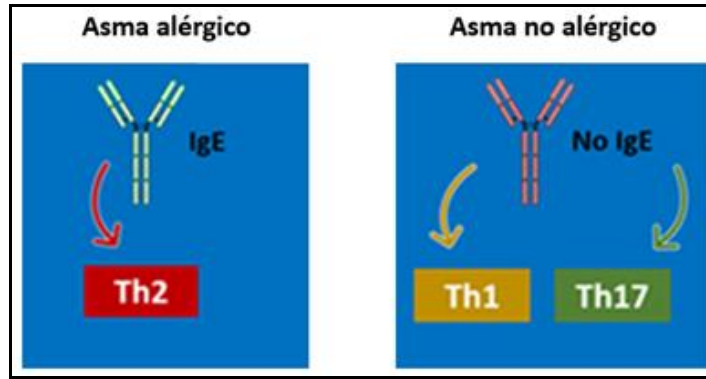


Figura 4. El asma alérgico es ocasionado por una respuesta inmunológica específica hacia un alérgeno. Está coordinada, en la mayoría de las ocasiones, por linfocitos Th2, que activan a los linfocitos B para la síntesis de IgE específica hacia el alérgeno, pero, de igual forma, puede ser ocasionada por mecanismos no dependientes de IgE a través de linfocitos Th1 o Th17 (también con receptores específicos para el alérgeno), pero sin favorecer la síntesis de IgE [8,10].

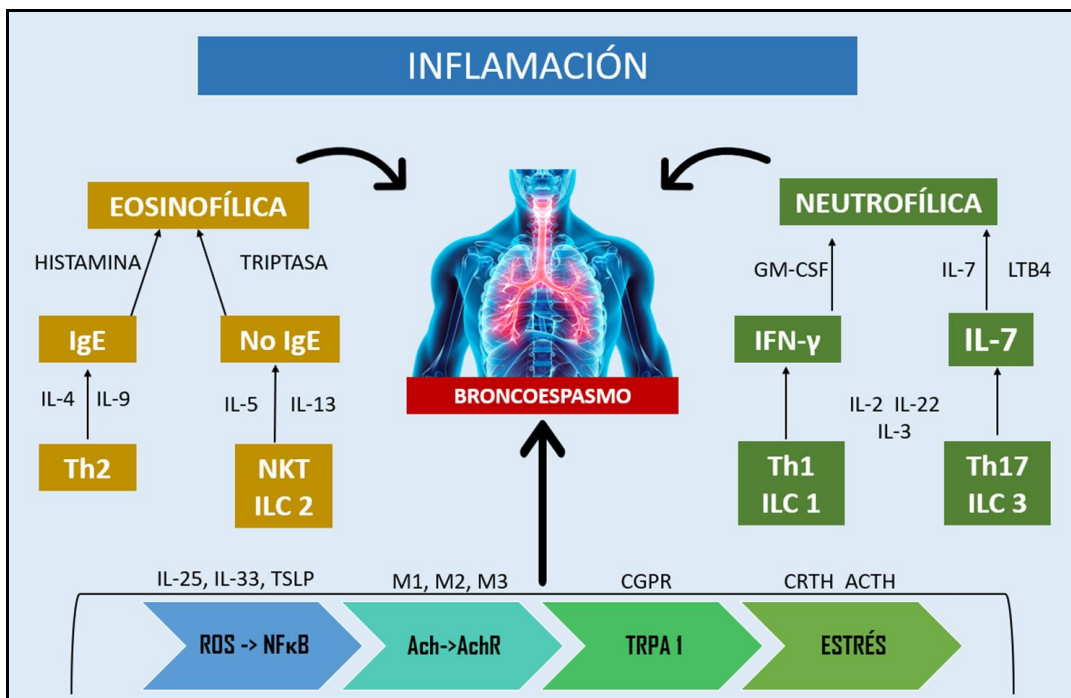


Figura 5. La inflamación en las vías aéreas contribuye al broncoespasmo en las exacerbaciones del asma. La mayoría de las veces esta inflamación es eosinofílica, ocasionada por linfocitos Th2 que favorecen la síntesis de IgE específica, pero también puede ser causada por linfocitos NKT o ILC-2 que, por mecanismos independientes de la IgE y ante estímulos diferentes, causan inflamación. Los linfocitos Th1, Th17, ILC-1 o tipo 3 también pueden causar inflamación, pero por neutrófilos atraídos por IL-17 y activados por IFN- γ . La inflamación y el broncoespasmo también pueden ser favorecidos directamente por radicales libres del oxígeno (ROS), que activan la vía del factor nuclear kappa B (Nf κ B), con la producción de citocinas proinflamatorias, o por un tono colinérgico exagerado, por activación de canales iónicos TRPA1, o por cambios en la vía del cortisol y el estrés. Estos mecanismos pueden combinarse en el paciente. GM-CSF, *granulocyte*

and macrophage colony stimulating factor; LTB, leucotrieno B; Ig, inmunoglobulina; IFN, interferón; IL , interleucina; Th, T *helper*; ILC, *innate lymphoid cell*; ROS, *reactive oxygen species*; NFκ-B, factor nuclear kappa B; NKT, *natural killer T cell*; Ach, acetilcolina; HCHO, aldehídos; TRPA1, *transient receptor potential cation channel subfamily A member 1*; CRH, *corticotropin releasing hormone*; ACTH, *adrenocorticotropic hormone*; TSLP, *thymic stromal lymphopoietin* [10,13].

Asma eosinofílica

El asma se ha considerado como el trastorno de Th2 característico de los pulmones. Esto se vio confirmado por los hallazgos iniciales de la inflamación asmática de las vías respiratorias, a menudo de naturaleza eosinofílica, medida en el lavado broncoalveolar (BAL), las biopsias bronquiales o el esputo, independientemente de si el paciente es alérgico o no [10,11]. En estudios iniciales de personas con asma leve a moderada, se encontró un aumento de células CD4⁺ que producen IL-4 e IL-5, en BAL y en biopsias del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), correlacionando con el grado de eosinofilia de la vía aérea [10]. La presencia de IgE sérica es el sello de la inmunidad Th2 adaptativa, impulsada por el cambio de clase de las inmunoglobulinas sintetizadas por las células B inducida por IL-4[13]. Puede haber mejores biomarcadores sustitutos del endotipo Th2 del asma, como los niveles de IL-25 sérica y periostina, que se correlacionan bien con la eosinofilia tisular. La eosinofilia en el tejido pulmonar es impulsada por la IL-5, que apoya el desarrollo de eosinófilos en la médula ósea y por el reclutamiento de eosinófilos en la mucosa pulmonar y el intersticio a través de la producción de quimiocinas CCL11, CCL24 y CCL26 [13]. Numerosos estudios muestran que el tratamiento del asma con corticosteroides reduce los eosinófilos circulantes y de las vías respiratorias en paralelo con la mejoría clínica. Sin embargo, el papel y la contribución de los eosinófilos al asma se están reevaluando con base a estudios con un tratamiento anti-IL-5 que redujo significativamente los eosinófilos, pero no afectó el control del asma [9,13]. Los productos derivados de eosinófilos como la peroxidasa activan la inmunidad adaptativa a través de los efectos en las DC. Los eosinófilos también pueden presentar el antígeno directamente a las células T efectoras. Los estudios con ratones modificados genéticamente, que carecen de eosinófilos, han demostrado que estas células también contribuyen a la remodelación de la pared de las vías respiratorias y al engrosamiento de la membrana subepitelial a través de la liberación del factor de crecimiento transformante β (TGF-β), aunque esto no se ha observado en todos los modelos de asma [13,14].

Asma neutrofílica

Estudios previos han demostrado que la entrada de neutrófilos en las vías respiratorias se asocia con desencadenantes no alérgicos del asma, como el dióxido de nitrógeno y el ozono [16]. Además, los neutrófilos son el primer tipo de células que ingresan al pulmón después del desafío con alérgenos [13]. A diferencia de los eosinófilos, la entrada de neutrófilos es transitoria después del desafío con alérgenos. El hecho de que los neutrófilos desaparezcan muy rápidamente después de la exposición al alérgeno puede ser crítica en la regulación de los números de neutrófilos en la vía aérea. Aunque el asma está asociada clásicamente con la eosinofilia y las citocinas Th2, algunos pacientes muestran una enfermedad predominante de neutrófilos con una ausencia de citocinas

Th2. En particular, los pacientes con artritis tardía y formas más graves de asma parecen tener una inflamación neutrofílica con una obstrucción de las vías respiratorias menos reversible y un medio mixto de citocinas Th1 y Th17 [14]. Su papel fisiopatológico sigue siendo incierto; pueden ser un factor determinante de la falta de respuesta al tratamiento con corticosteroides. La regulación del reclutamiento, activación y alteración de los neutrófilos en la función pulmonar aún está en estudio, pero el leucotrieno B4 puede contribuir a estos procesos. La IL-17 favorece a veces a los ratones y en ocasiones los protege de la enfermedad. Estas discrepancias pueden explicarse por el momento de la neutralización o administración de IL-17, ya que se ha observado un papel protector con la IL-17A en el asma solo durante la fase de desafío. Los neutrófilos pueden producir una amplia gama de productos que incluyen lípidos (LTB₄, PAF, TXA₂, LTA₄), citocinas (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β), proteasas (elastasa, colagenasa, MMP-9), productos microbicidas (lactoferrina, MPO, lisozima), intermediarios reactivos de oxígeno (superóxido, H₂O₂, OH) y óxido nítrico. La elastasa, en particular, tiene una extensa gama de acciones. Descompone no solo la elastina, sino también el colágeno III, promueve la formación de colágeno IV, proteoliza las proteínas tensioactivas y activa las metaloproteasas de la matriz. En el epitelio, la elastasa aumenta la secreción de moco [13,14]. La elastasa puede inducir al epitelio de las vías respiratorias a liberar IL-8 y posiblemente otras citocinas. La elastasa daña el endotelio al aumentar la permeabilidad y promover la apoptosis, y activa los mastocitos y los eosinófilos [15].

Respuesta inmunológica

Una característica fundamental del asma asociada con la sensibilización alérgica es la capacidad de las vías respiratorias para reconocer los alérgenos ambientales comunes y generar una respuesta de citocinas Th2 [15]. Por lo tanto, una pregunta crucial en el asma es ¿Qué mecanismos explican la expresión específica de la atopía en las vías respiratorias y por qué algunos pacientes, a pesar de ser muy atópicos, no tienen evidencia de asma? Una explicación es la forma en que la respuesta inmunitaria regula a los alérgenos en la superficie de las vías respiratorias.

La sensibilización al alérgeno comprende su captación y procesamiento por las células dendríticas del epitelio y la submucosa de la vía aérea [14,15]. La captación de alérgenos se ve aumentada por los receptores de alta afinidad en DC que facilitan la internalización del alérgeno. Una vez dentro de la DC, el procesamiento de los alérgenos se da por la catepsina S, la posterior selección de péptidos y presentación por las moléculas HLA (MHC clase II), fundamental para servir como activadoras de linfocitos T [16]. Una vez que la DC ha capturado al alérgeno, recibe señales para migrar a los ganglios linfáticos locales donde tiene lugar la presentación del antígeno. Sus receptores de quimiocinas específicos, incluidos CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21 (y en menor medida CXCR4 y su ligando CXCL12), están involucrados en esta migración para permitir el contacto con células T *naïve* [15,16]. La presentación de un péptido antigénico al receptor de células T inicia la sensibilización y la respuesta inmunitaria específica posterior al alérgeno. La activación de células T por el antígeno depende de la interacción de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) de las DC con el CD28 de las células T, lo que conduce a la sensibilización, mientras que la falta de estas moléculas coestimuladoras puede llevar a la anergia. Un

método alternativo para prevenir la sensibilización y hacer que las células T sean anérgicas es el compromiso de una segunda molécula coestimuladora, el antígeno citotóxico de linfocitos T (CTLA) 4, que tiene una afinidad más alta que CD80 o CD86 para CD28 y, por lo tanto puede prevenir la estimulación de CD80/CD86 [18,19]. Bajo estas circunstancias, se piensa que otras vías coestimuladoras están involucradas en la activación de las células T, incluyendo ICOS y sus múltiples posibles ligandos B7-RP1, PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7DC), B7-H3 y B7- H4 (B7-S1) [19], así como OX40 (CD134) y su ligando OX40L (CD252).

La capacidad de la DC para generar IL-12 determina el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, la diferenciación de células T con la producción de IL-12 favorece una respuesta de tipo Th1 [16]. Sin embargo, aunque la IL-12 es capaz de contrarrestar la sensibilización Th2, también puede contribuir a la expresión máxima de la sensibilización de la enfermedad de las vías respiratorias alérgicas [16]. Una vez sensibilizadas, las células T vuelven a migrar (ecotaxia o *homing*) a las vías respiratorias, al sitio de entrada de antígenos, bajo la influencia de las quimiocinas CCL24, CCL7, CCL13, CCL17 y CCL22 (que interactúan con sus receptores recíprocos, incluyendo CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 y CCR8) [16,17], pero estas células también se convierten en potentes productoras de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la mayoría de las cuales se codifican en el brazo largo del cromosoma 5,. La IL-1b producida en grandes cantidades por macrófagos, monocitos, DC y células epiteliales, junto con la IL-2 producida por las células T, contribuye a la proliferación y maduración de estas células (Figura 6) [17].

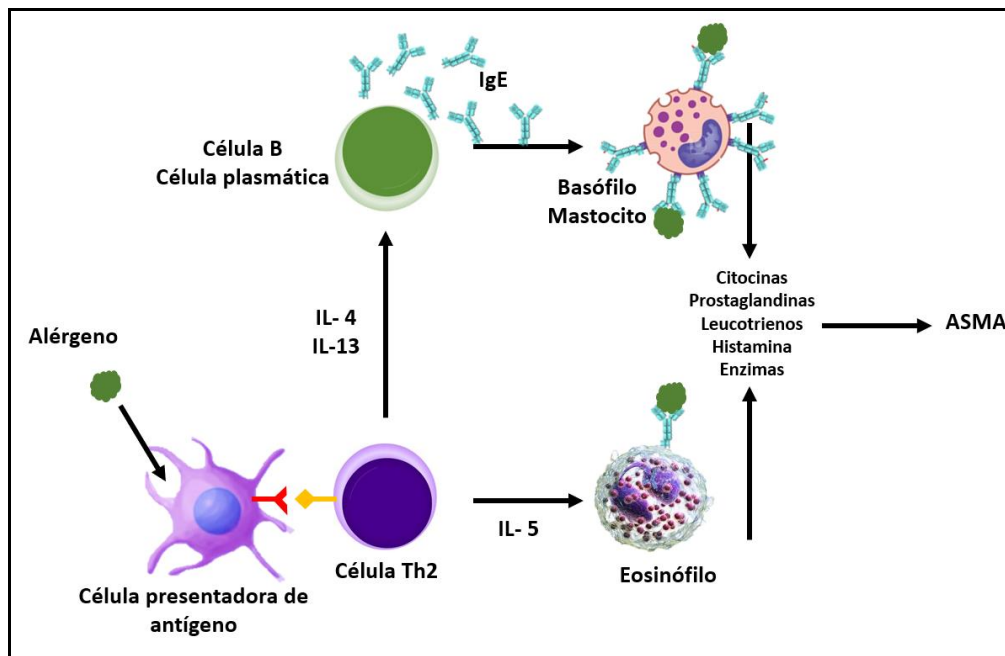


Figura 6. Representación esquemática de la cascada inflamatoria en el asma alérgica. La inflamación alérgica se desarrolla a partir de una interacción entre el epitelio respiratorio y los

leucocitos. Los estímulos ambientales e inflamatorios inducen en el epitelio de las vías respiratorias la producción de mediadores que activan y reclutan células inflamatorias. Las células inflamatorias se infiltran en los pulmones y liberan mediadores que aumentan la respuesta inflamatoria en el epitelio, creando un ciclo de inflamación crónica. Este proceso causa broncoconstricción y daño epitelial, y puede resultar en la remodelación de la vía aérea [18,20].

Interacciones entre células epiteliales y células dendríticas en respuesta a los alérgenos

Independientemente del endotipo del asma, es necesario activar las diversas células T o ILC que controlan la inflamación de las vías respiratorias. Para las respuestas de células T de todo tipo, esto implica la activación de DC que reconocen el alérgeno y lo presentan a las células T en los ganglios linfáticos que drenan los pulmones [17]. Varios estudios han demostrado que las DC son necesarias y suficientes para inducir la inmunidad adaptativa de Th2 y Th17 a los alérgenos inhalados. Existen diferentes subtipos de DC's en los pulmones, ampliamente categorizadas como DC convencionales (CDC) y DC plasmocitoides (CDP). Entre las DC, las moléculas CD11b⁺ CD172 (SIRP1α)⁺, que dependen del factor de transcripción IRF4, son necesarias y suficientes para inducir sensibilización alérgica, mientras que las CD103⁺ XCR1⁺, que dependen de los factores de transcripción IRF8 y BATF3, inducen tolerancia a las alergias respiratorias [17,18].

Tanto las CDC de pulmón como las células epiteliales expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y pueden ser activados directamente por los alérgenos. En respuesta a los alérgenos, las células epiteliales de los pulmones producen citocinas (CCL2 y CCL20) que atraen pre-CDCs inmaduras. Las células epiteliales activadas producen citocinas (por ejemplo, IL-1α, GM-CSF, IL-25, IL-33 y TSLP) y señales de peligro (ATP y ácido úrico), que favorecen la maduración de DC CD11b⁺ (que dependen del factor de transcripción IRF4 para maduración y migración). Las DC CD11b⁺ activadas luego emigran a los ganglios mediastínicos, donde inducen respuestas Th2 y Th17 [16]. La migración es estimulada por la IL-13, derivada de células ILC2. Algunas células T auxiliares comienzan a producir IL-21 y adoptan el destino de las células T ayudantes foliculares (TFH) para inducir el cambio de clase a IgE en los linfocitos B [18]. En los ganglios linfáticos, las DC reciben ayuda de los basófilos para sostener las respuestas Th2. Durante la exposición al alérgeno, las DC y los macrófagos podrían reestimar localmente la función efectora en linfocitos residentes en el pulmón o podrían reclutar células Th2 efectoras mediante la producción de CCL17 y CCL22. El reconocimiento de alérgenos mediado por IgE mejora las respuestas de Th2 a los alérgenos inhalados, al menos en humanos [17,18]. Para poder explicar ¿Cómo penetra el alérgeno la mucosa?, ¿Qué pasa con la exclusión inmune?, ¿Cómo es la respuesta primaria y secundaria?, ¿En qué momento o cuantas exposiciones al alérgeno se necesitan para que el perfil de IgE comience a aumentar? se infiere la necesidad de modelos animales traslacionales que permitan un estudio más detallado de estos mecanismos.

El panorama Th1/Th2

Un gran logro fue cuando se descubrió, inicialmente en ratones, que el tipo de respuesta está muy influenciado por el tipo de células T que se acumula en el sitio local de reconocimiento del antígeno. En el ratón, se han definido varias células T CD4 + distintas en función del perfil de las citocinas que elaboran. Aunque la diferenciación no es tan clara en humanos, se han descrito células igualmente diferenciadas. Los perfiles de células Th1 y Th2 han sido los más estudiados, el primero que secreta IFN- γ , IL-2 y linfotoxina, y el último secretando IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-10. Como se muestra en la (Figura 7), las células Th1 y Th2 se forman a partir de una célula T precursora *naïve* común y se diferencian en poblaciones polarizadas en función de las señales del microambiente local [19]. En presencia de DC CD8 α + y/o IL-12, IL-18 o IFN- γ , se diferencian en células Th1. Esta evolución está mediada por un mecanismo que depende del transductor de señal y el activador de la transcripción 1 (STAT-1) y el factor de transcripción T-bet [18,19]. En presencia de DC CD8 α - y/o IL-4 (que pueden provenir de mastocitos activados por IgE o DC), se forman células Th2. Este es un proceso complejo que involucra la transducción de señales mediada por STAT-6 y la activación de una variedad de factores de transcripción, incluyendo GATA-3, factor nuclear de células T activadas c (NFATc) y c-maf [20]. También se ha descrito la contrarregulación de Th1/Th2, con cada población celular capaz de inhibir y/o regular el desarrollo y/o fenotipo inducido por la otra. Las respuestas polarizadas de Th1 desempeñan un papel clave en la activación de macrófagos en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Son una característica clave en la patogénesis de enfermedades como la artritis reumatoide, la sarcoidosis y la tuberculosis. En contraste, las respuestas dominantes de Th2 estimulan respuestas mediadas por anticuerpos, activan mastocitos y provocan eosinofilia tisular. Juegan un papel clave en la alergia y las respuestas antiparasitarias [20].

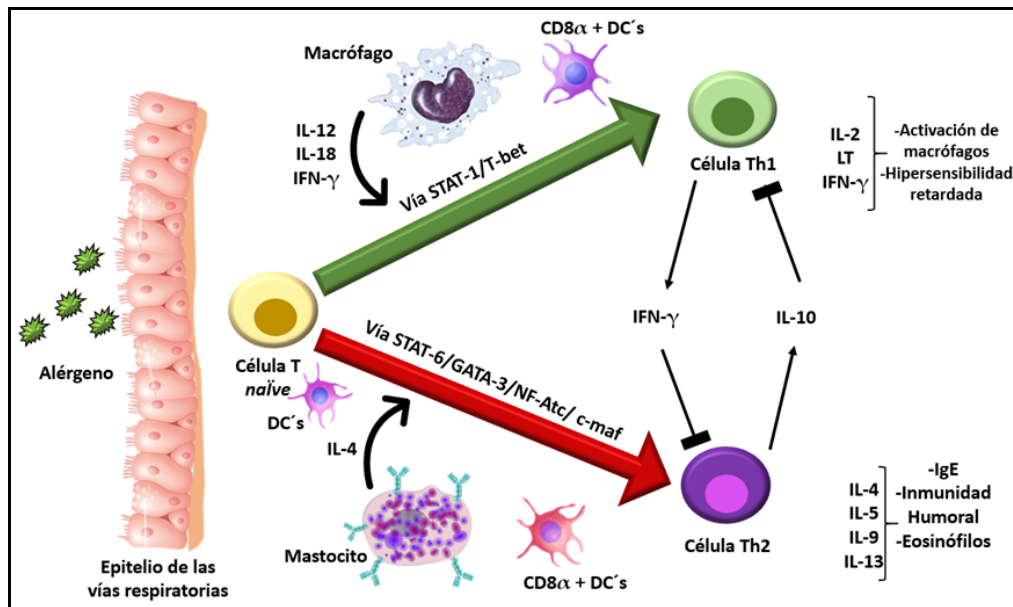


Figura 7. Desarrollo de linfocitos Th1 y Th2. Los antígenos ingresan a través del árbol endobronquial, atraviesan la superficie epitelial e interactúan con las DC y las células Th *naïve*. Como resultado de las señales del microentorno circundante, se diferencian en células Th1, que producen IFN- γ , IL-2 y linfotoxina (LT), o células Th2, que producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, e IL-10. La polarización en células Th1 se produce a través de una ruta dependiente de STAT-1 y T-bet bajo la influencia de DC CD8 α + y citocinas derivadas de macrófagos como IFN- γ , IL-12 e IL-18. La diferenciación en células Th2 se produce a través de una vía que involucra STAT-6, GATA-3, factor nuclear de células T activadas c (NFATc) y c-maf bajo la influencia de DC CD8 α - e IL-4, que puede provenir de mastocitos [18,19,20].

Células implicadas

La cascada inflamatoria incluye las siguientes células: mastocitos, DCs, eosinófilos, basófilos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, plaquetas y las diferentes subpoblaciones de LT y LB. Cuando la inflamación se intensifica, las vías respiratorias se vuelven muy sensibles a estímulos que provocan y desarrollan hiperreactividad; la acción de estas células, la inflamación de las vías respiratorias y la secreción de moco, contribuyen a la broncoconstricción y obstrucción de las vías respiratorias que se observa en los ataques de asma [14,20].

LTCD4⁺

Los T CD4⁺ son células efectoras esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune protectora y la memoria inmunológica de larga duración contra los microorganismos patógenos [28]; pueden diferenciarse en varios tipos dependiendo del antígeno que les sea presentado por las APC, en el contexto del complejo de CMH y de las citocinas presentes en el microambiente creado por la respuesta inmune innata. Estas subpoblaciones son: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 y Treg [20].

Los LTh1 producen altos niveles de interferón gamma (IFN- γ), son responsables de la activación de fagocitos, producción de opsoninas y generación de respuesta inmune celular. Tienen un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares y están implicados en la autoinmunidad órgano-específica y en los desórdenes inflamatorios crónicos. Los LTh2 producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, protegen contra parásitos como los helmintos, pero también son responsables de la patogénesis de las enfermedades alérgicas como el asma atópica [20,21].

Los LTh17 producen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-26, implicadas en la protección frente a bacterias y hongos extracelulares; son responsables de desórdenes autoinmunes y del asma crónica severa. Los LTh9 producen IL-9 e IL10, su papel fisiopatológico está relacionado con el asma alérgica, en la enfermedad inflamatoria del intestino y en la autoinmunidad. Los LTh22 producen IL-22 y parece que están implicados en la patología y en la homeostasis de la piel, pero aún no es claro [21].

Mastocitos

Hoy se sabe que los mastocitos juegan un papel fundamental en el mantenimiento fisiológico del organismo, la curación de heridas, la angiogénesis y la defensa contra toda una serie de agentes patógenos, participando tanto en la inmunidad innata como en la

adaptativa, contribuyen en el proceso inflamatorio, atrayendo diferentes subpoblaciones de leucocitos al sitio de la inflamación en enfermedades alérgicas [20,21].

Los mastocitos de humanos y murinos expresan receptores TLRs y NODs, a través de los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como proteoglicanos, induciendo la liberación de proteasas y secreción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento para reclutar neutrófilos, eosinófilos, células *natural killer* y otras que forman el infiltrado inflamatorio [21]. Los mastocitos expresan TLR4, a través del cual median la respuesta inmune contra bacterias; es un transductor de señal de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), componentes de la pared de bacterias gram negativas [24]. También están involucrados en la fase efectora de la inmunidad adaptativa mediante la generación de células y moléculas efectoras [24].

Los mastocitos modulan la activación y la migración de DCs y células de Langerhans desde la piel a los ganglios linfáticos seguido de la activación dependiente o no de IgE más un alérgeno; estos mastocitos también pueden activar a APC. Los mediadores que producen son: histamina, PGE2 y PGD2 que modulan a las DCs para que induzcan el desarrollo de una respuesta mediada por Th2 [20,21], producen muchos otros factores incluyendo a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, XCL1, IL-16 y leucotrienos B4, los cuales tienen potencial para mejorar el reclutamiento de LT al sitio de inflamación [24].

Estudios realizados *in vitro* han mostrado que estas células pueden procesar antígenos y son capaces de presentarlos restringidos a MHC-I o MHC-II. La expresión del MHC-I está confirmada para todos los subtipos de mastocitos y se ha mostrado que están implicados en la activación de los T CD8⁺ *in vitro*. Sin embargo, la expresión del complejo MHC-II sigue siendo controvertido y parece que depende en gran medida de las condiciones del medio [24]. Existen dos formas de activación de los mastocitos que son: dependiente de IgE y no dependiente de IgE.

Papel de los mastocitos en el asma

Estas células pueden encontrarse adyacentes a los vasos sanguíneos en la lámina propia de la mucosa de la vía aérea. En pacientes con asma, pueden migrar a otras estructuras como el epitelio de la vía aérea, glándulas mucosas y células del músculo liso. La interacción entre mastocitos y células del músculo liso induce que estas últimas expresen TGF-β1 mediado por la vía de liberación de β-triptasa, resultando en la diferenciación de un fenotipo mucho más contráctil [24].

En pacientes con asma alérgica, la inhalación de un aeroalérgeno conduce la unión cruzada del alérgeno con la IgE ligada a FcεRI en la membrana del mastocito, induciendo la liberación rápida de mediadores como: histamina, leucotrienos, proteasas y prostaglandinas que pueden detectarse aumentados en el BAL de estos pacientes retados con alérgenos que inducen vasodilatación, contracción del músculo liso y secreción de moco. Además, conducen a una respuesta de fase tardía caracterizada por infiltración celular inflamatoria como: eosinófilos, T CD4⁺, neutrófilos, mastocitos y basófilos, asociada con edema de la pared bronquial y un incremento no específico de la AHR [21,25].

Eosinófilos

Se encuentran en las mucosas y a nivel pulmonar hay evidencias que sugieren que tienen la capacidad de estimular la eliminación de ciertos organismos virales, bacterianos y hongos. No obstante, su papel está bien caracterizado como células efectoras contra las infecciones por parásitos helmintos, durante las cuales los eosinófilos liberan diferentes citocinas como: TGF- β , factor activador de plaquetas (PAF), leucotrienos C4 (LTC4), proteína básica principal (MBP) y peroxidasa de eosinófilos (EPO) [25].

Sin embargo, la activación de estas células se asocia con efectos perjudiciales en el hospedero, como en el caso del asma alérgica bronquial y la esofagitis eosinofílica. La primera está caracterizada por una AHR, broncoconstricción y un incremento en la producción de moco, resultando en una inflamación crónica y en un remodelamiento de la vía aérea [21]. Los eosinófilos han sido implicados en todos los aspectos de la patogénesis del asma, la MBP y EPO pueden causar destrucción de tejidos y desarrollar AHR. PAF y LTC4⁺ son potentes broncoconstrictores e incrementan la producción de moco y el TGF- β contribuye a la remodelación de la vía aérea, de donde, estas células se han identificado como el primer blanco terapéutico en la intervención del asma bronquial [21,24].

La IL-5 tiene un papel central en la diferenciación de los eosinófilos, como factor hematopoyético y en su supervivencia; por tanto, la sobreexpresión de IL-5 *in vivo* incrementa significativamente su número [25]. Desde una perspectiva clínica, una serie de estudios sobre la eliminación de eosinófilos con anticuerpos monoclonales anti-IL-5 en pacientes ha fortalecido el argumento de que los eosinófilos tienen un papel activo en la enfermedad pulmonar, como células inmunorreguladoras, con una función clave en la orquestación de la inflamación de la vía aérea mediada por Th2 y probablemente desarrollando el papel de APCs, fortaleciendo la hipótesis de las implicaciones de estas células en la enfermedad pulmonar [26].

Basófilos

Los basófilos, al igual que los mastocitos, liberan varios mediadores proinflamatorios como histamina, leucotrienos y citocinas a través de la estimulación por un enlace cruzado de la IgE y del receptor Fc ϵ RI, o a través de mecanismos no dependientes de IgE como C5a. Tienen un papel crítico en la alergia y en las enfermedades inflamatorias, están circulando en sangre periférica y pueden ser reclutados a los sitios de inflamación alérgica por el tejido afectado y de esta forma contribuir al proceso [26]. El descubrimiento de un marcador único de basófilos como la basogranulina, ha permitido su identificación en las vías respiratorias de pacientes con asma. Sin embargo, no está claro cuál es su papel en la enfermedad aguda o crónica, aunque se sabe que comparten muchos de los mecanismos de reclutamiento con los eosinófilos, es probable que sean los acompañantes del infiltrado eosinofílico [25,26].

Impacto del asma

En las últimas décadas, tanto la prevalencia como la incidencia del asma han aumentado en todo el mundo, no solo debido a los antecedentes genéticos, sino principalmente por el efecto de una gran cantidad de factores ambientales y de estilo de vida. En muchos

países, las enfermedades no transmisibles, como el asma, aún no se consideran una prioridad sanitaria. El asma afecta a personas de todas las edades y presenta su incidencia máxima en la infancia. El asma ha demostrado claramente ser una enfermedad global, sin embargo, en las últimas dos décadas se definió como un verdadero problema de salud pública que afecta a países de todo el mundo [14]. Además, existen diferencias entre los países, con tasas significativamente superiores a la media, por ejemplo, en Reino Unido, Australia y Nueva Zelanda y, por el contrario, tasas de prevalencia muy inferiores a la media en otros países [27]. Tras las primeras publicaciones epidemiológicas sobre el asma, se observó que la prevalencia del asma era más alta en las clases sociales con un ingreso anual alto o muy alto y que la gravedad del asma era mayor entre los más desfavorecidos. Sin embargo, los últimos datos epidemiológicos de África, América Latina y Asia mostraron que, en áreas con bajo desarrollo económico, la prevalencia del asma ha aumentado [28,29]. Aunque podría haber varias explicaciones, el desarrollo de las ciudades más grandes, con la consiguiente reducción de las áreas rurales, puede haber jugado un papel. Dado que la mayoría de la población mundial vive en áreas urbanas, las condiciones ambientales, como los cambios en el estilo de vida, ciertamente han influido en el aumento de la tasa de prevalencia del asma [30]. En consecuencia, se puede decir que el asma, en todo el mundo, está "globalizado y afecta a todos los países como un problema de salud pública".

Muchos estudios informaron datos sobre los costos del asma, ya sea en el paciente individual o en la sociedad (regional o nacional), y puede ser un costo anual promedio de aproximadamente \$ 5,000 USD, siendo mucho más alto en los asmáticos graves [31]. Sin embargo, en 2009 se publicó la primera revisión sistemática en la literatura sobre la carga económica del asma. Los autores incluyeron 68 estudios y encontraron que la hospitalización y los medicamentos eran los factores más importantes de los costos directos; la pérdida de trabajo y estudio escolar representó el mayor porcentaje de costos indirectos. A nivel mundial, los costos del asma aumentaron, estrechamente relacionados con las morbilidades, la edad y la gravedad del asma [31]. Una estimación reciente de los costos anuales totales del asma en los EE. UU., declaró que estaban creciendo de manera rápida y constante, de 12 mil millones de USD en 1994 a 56 mil millones de USD en 2011 [14,15,32].

Según la Organización Mundial de la Salud, en 2004, los costos mundiales totales del asma probablemente excedieron los de la tuberculosis y el VIH/SIDA [30]. La relación entre los costos directos e indirectos del asma es variable y depende del país y del tipo de estudio. La mayoría de los estudios de asma realizados en las últimas 2 décadas mostraron que los costos directos contribuyen con 50 a 80% del costo total [31]. Los DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) corresponden a los años de vida ajustados por la discapacidad o AVADs por sus siglas en español. Los DALYs resumen, mediante estudios de carga de la enfermedad, el impacto de la mortalidad y discapacidad asociada a enfermedades específicas, en distintas comunidades; en cambio los QALYs (*Quality Adjusted Life Years*) sintetizan los resultados de salud en un indicador que combina el número de años vividos con la calidad de vida experimentada durante esos años. En el ranking de 50 enfermedades en el 2017, el asma se encontraba en el puesto 16 entre las

principales causas de años de vida ajustados por calidad (QALY) y el puesto 28 de años ajustados por discapacidad (DALY) [31,32].

Prevalencia del asma a nivel mundial

Adultos

La prevalencia de asma es mayor entre los adultos de 18-24 años (10,3%) en comparación con los de 25-34 años (8,7%), 35-44 años (8,1%), 45-54 años (8,5%), 55-64 años (9,4%) y 65 años y más (8,1%). La prevalencia de asma fue más alta entre las mujeres (10,7%) en comparación con los hombres (6,5%). En comparación con los adultos blancos (8,7%), los adultos multirraciales (15,1%) y negros (10,8%) tenían la prevalencia de asma más alta [32].

Niños

La prevalencia de asma fue menor entre los niños de 0 a 4 años (6,3%) en comparación con los de 5 a 9 años (10,0%), 10-14 años (9,4%) y 15-17 años (9,0%). La prevalencia de asma fue mayor entre los niños (10,0%) en comparación con las niñas (7,1%) y fue mayor entre los niños negros (14,0%) y multirraciales (13,2%) en comparación con los blancos (7,4%) [32,33].

Fondo genético

El asma tiene una etiología multifactorial en la que los factores genéticos, las influencias ambientales y su interacción desempeñan un papel importante. En las últimas dos décadas, los antecedentes genéticos del asma se han vuelto cada vez más claros a través de estudios de gemelos y en sujetos con antecedentes familiares de atopia y asma. Alrededor de 30 a 100 genes están involucrados en el asma [30,31]. Aunque se ha avanzado mucho en el campo de la genética del asma, la influencia de muchos genes candidatos en relación con la susceptibilidad al asma en niños pequeños debe definirse con más detalle [32,34]. El polimorfismo genético en las secuencias codificantes de los genes puede afectar la función de una proteína. Los polimorfismos en las secuencias reguladoras y promotoras de los genes pueden influir en las características de expresión de un gen, por lo que los perfiles de expresión génica son un área importante en la investigación del asma. Al vincular los polimorfismos genéticos específicos y los perfiles de expresión génica con los fenotipos de sibilancias en los niños y los niveles inflamatorios en los índices de EBC y función pulmonar, se logra una mejor comprensión de la patogenia temprana del asma en niños pequeños [30,32,36].

Tratamiento para el asma

El tratamiento del asma iniciaría con la prevención primaria en la población de alto riesgo, aunque la imposibilidad actual para la detección temprana de esta población limita esta estrategia. Su manejo propiamente dicho consiste en la prevención secundaria (evitar exposición a factores agravantes como alérgenos), la educación del paciente, la farmacoterapia y, en los que sean alérgicos, se puede considerar la inmunoterapia. La farmacoterapia se divide en tratamiento de rescate para los episodios de síntomas y el tratamiento de mantenimiento para conservar el control [32]. En pacientes con asma leve y síntomas intermitentes por no más de dos veces por semana, sin despertares nocturnos

y sin crisis asmática el último año, sólo se da tratamiento de rescate [33]. En todos los pacientes se instalará algún tratamiento de mantenimiento con antiinflamatorio inhalado y eventualmente otros medicamentos que aumenten el control. Para elegir el tratamiento adecuado se toma en cuenta la gravedad del cuadro crónico y los síntomas en el momento de la consulta, siguiendo cinco niveles del algoritmo que llevará al médico a mantener el control del asma [33]. Nivel 1. Rescate: Broncodilatador. 1ª opción agonista β_2 inhalado; aplica para exacerbaciones en cualquiera de los niveles abajo mencionados. Nivel 2. Mantenimiento: Corticosteroide inhalado (CEInhal) a dosis baja o intermedia. Alternativos: Antileucotrieno, teofilinas de liberación prolongada, β_2 agonistas vía oral. Nivel 3. Mantenimiento: Combinación del CEInhal dosis intermedia con agonista β_2 de acción prolongada. Alternativa: CEInhal con antileucotrieno, teofilinas de liberación prolongada, β_2 agonistas vía oral. Nivel 4. Aumentar a dosis altas - muy altas con esteroides inhalados, más tratamiento combinado. Nivel 5. Inmunosupresión y anti-IgE [33]. La inmunosupresión y la terapia con anti-IgE consiste en la aplicación de anticuerpos dirigidos contra la IgE de los pacientes alérgicos. Es un anticuerpo monoclonal anti-IgE humanizado (proviene del ratón) que se liga a la IgE circulante, formando complejos Ag-Ab, disminuyendo el nivel de la IgE libre. No se liga a la IgE que se encuentra sobre basófilos y mastocitos, por lo tanto, no ocasiona reacciones anafilácticas. Está aprobado para el tratamiento del asma alérgica persistente grave en pacientes mayores de 12 años, la dosis se establece a partir de los niveles de inmunoglobulina E y el peso corporal del paciente [34,35]. En estos ejemplos se evidencia que los tratamientos solo son sintomáticos y ninguno promueve la verdadera cura del paciente.

De lo anterior se deriva la necesidad del diagnóstico temprano de la patología y su tratamiento, con la finalidad de evitar su desarrollo e, incluso, lograr su prevención mediante la detección de biomarcadores. De ahí la necesidad de contar con modelos de la enfermedad que permitan hacer estudios de la fase de sensibilización (asintomática) y su paso a la hipersensibilidad [35,36].

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Igs) son proteínas heterotetraméricas compuestas de dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L). Funcionalmente, tienen dominios variables (V), que se unen directamente a los antígenos y dominios constantes, que especifican las funciones efectoras tales como la activación del complemento o la unión a receptores Fc (Figura 8) [36]. Se producen como respuesta a moléculas que son detectadas como extrañas, las cuales se denominan antígenos (Ags).

Las Igs son producidas por linfocitos B, que una vez activados, se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos (CPA), o bien a linfocitos de memoria que prevalecen a lo largo del tiempo, posibilitando una respuesta más eficiente y rápida en futuras exposiciones a determinado Ag [34,35,36].

Las Igs tienen como función principal impedir la entrada de patógenos o bien el daño que estos pueden causar hacia las células, por lo que pueden tener función neutralizante, también son capaces de favorecer la eliminación de patógenos por medio de los

macrófagos al opsonizar al patógeno, y pueden estimular otras vías de señalización al unirse a receptores celulares [34].

Los anticuerpos presentan diversas variedades denominadas isotipos o clases, existen 5 isotipos de anticuerpos en mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada inmunoglobulina difiere de otra en sus funciones biológicas, localización y capacidad de reconocimiento a los diversos antígenos. Cuando aún no ha existido contacto con antígenos, los linfocitos B *naïve* solo expresan IgM e IgD en su superficie celular, cuando se da lugar a la activación de la célula, tras el encuentro y unión a un antígeno, el linfocito B se activa, se divide y diferencia a APC específicos para dicho antígeno, generando así anticuerpos de tipo IgM, IgA, IgG o IgE, los cuales durante el cambio de clase conservan la región variable que reconoce al antígeno, por lo que son capaces de reconocer al mismo antígeno pese que sean de diferente clase y únicamente cambia su región constante [33]. Por lo tanto, los isotipos dependen de las regiones constantes de las cadenas pesadas. Se han identificado subclases como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en humanos. La diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región constante, tanto de cadenas pesadas como de cadenas ligeras (alotipo), son los que han permitido identificar cada subclase [35,36,37].

Cadena pesada

Hay cinco tipos de cadenas pesadas en mamíferos que se nombran por letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ . El tipo de cadena pesada presente define la clase (isotipo) del anticuerpo. Estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM respectivamente. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición: α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ poseen aproximadamente 550 aminoácidos [35].

Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios estructurales Ig en tándem y una región bisagra para proporcionarle flexibilidad [35]. Las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios inmunoglobulina [36,37,40]. La región variable de la cadena pesada difiere en los anticuerpos producidos en los diferentes linfocitos B, pero es idéntica para todos los anticuerpos producidos por el mismo linfocito B o por su línea clonal. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos y está compuesta por un único dominio inmunoglobulina [35].

Recientemente se ha podido determinar la topología *in vivo* del gen de la cadena pesada, *Igh*, siendo este uno de los primeros estudios en este campo. El resultado es que la cromatina se dispone formando giros sucesivos unidos por "*linkers*", dando lugar a formas similares a una flor. La posición relativa de los distintos segmentos varía drásticamente a lo largo del desarrollo del linfocito B, permitiendo así un mayor rango de interacciones genómicas [36,37].

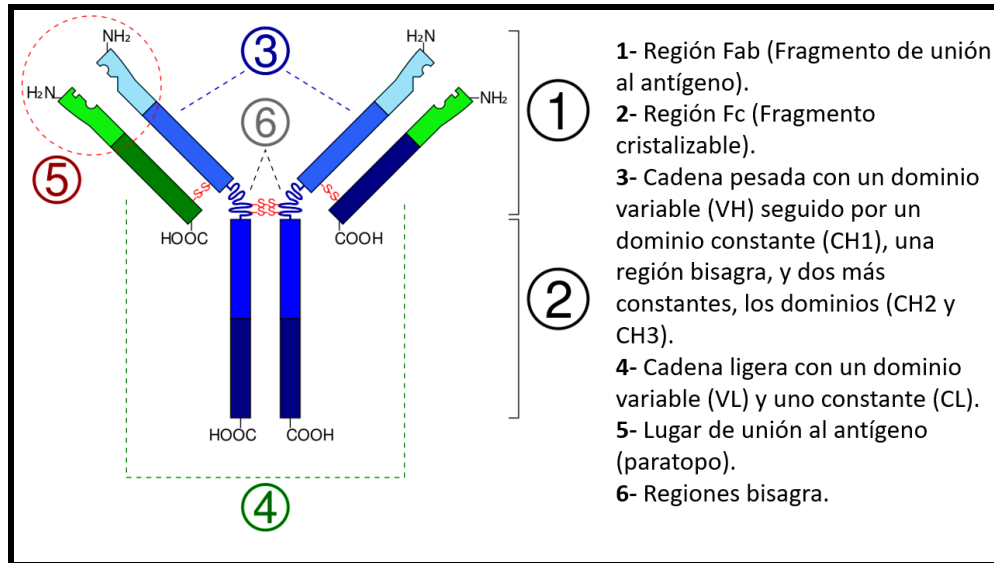


Figura 8. Estructura de un anticuerpo. Inmunoglobulina con su típica forma de Y. En azul se observan las cadenas pesadas con cuatro dominios Ig, mientras que en verde se muestran las cadenas ligeras. Entre el tallo (Fracción constante, Fc) y las ramas (Fab) existe una parte más delgada conocida como "región bisagra" (*hinge*, en inglés) [34,36].

Cadena ligera

En los mamíferos hay dos tipos de cadena ligera, llamadas lambda (λ) y kappa (κ). Una cadena ligera contiene dos dominios sucesivos: un dominio constante y un dominio variable. La longitud aproximada de la cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Cada anticuerpo contiene dos cadenas ligeras que son siempre idénticas. Solo un tipo de cadena ligera, κ o λ , está presente dentro del mismo anticuerpo en mamíferos. Otros tipos de cadenas ligeras como la cadena iota (ι), se encuentran en los vertebrados inferiores como los condriictios y teleósteos [37,40,41].

IgA

Esta inmunoglobulina se caracteriza por encontrarse en niveles más altos que la IgG en las mucosas y en las secreciones, incluyendo la saliva y la leche materna [45], posee la estructura básica de cadenas pesadas y ligeras al igual que las demás inmunoglobulinas, sin embargo no posee únicamente una estructura monomérica, sino que también, por medio de interacciones de la región Fc con la cadena J, da lugar a diversas formas como la IgA dimérica, la cual es la forma predominante de la inmunoglobulina A polimérica y la inmunoglobulina A secretora. Es la segunda más abundante en suero de humano, teniendo un papel tanto proinflamatorio como antiinflamatorio, además de involucrarse en la inmunidad sistémica [52]. Por ejemplo, los niveles elevados de IgA alérgico específica se han visto relacionados con la eosinofilia en procesos como la rinitis alérgica y el asma, así mismo se ha observado que la IgA tiene efecto antiapoptótico sobre los eosinófilos aumentado así la vida media de éstos, favoreciendo su desgranulación y la liberación de citocinas proinflamatorias [52,53].

Dentro de la IgA secretora la subclase predominante es la IgA1 y se encuentra predominantemente en mucosas, glándulas mamaria, salivales, mucosa nasal, mucosa bronquial y en el tracto digestivo [52], en el caso de personas asmáticas, la IgA de mucosas tiene una función importante al neutralizar al alérgeno evitando que pase por el revestimiento mucosal, se ha relacionado la deficiencia de esta inmunoglobulina a la ausencia del bloqueo de la entrada del alérgeno, dando lugar a toda la cascada de eventos involucrados en el asma [52].

La mayoría de las IgA presentes en las secreciones de las mucosas, como las que se recolectan con el lavado broncoalveolar (BAL), están presentes en una forma polimérica, unida a un componente secretor (IgA secretora SIgA) [54]. Los datos disponibles actualmente indican que la IgA desempeña un papel tanto en la defensa del hospedero contra las infecciones como en los procesos inflamatorios [44,45,52]. En el pulmón, su función de defensa para el hospedero se logra en parte por la capacidad de la IgA para inhibir la adherencia de microorganismos a la superficie de la mucosa. Además, la IgA puede facilitar la eliminación de antígenos de la submucosa al transportarlos a través de la capa epitelial [6]. La unión de IgA a partículas facilita su fagocitosis debido a la presencia de receptores de IgA Fc específicos en la superficie de los fagocitos [52,54]. Además de desempeñar un papel en la defensa del hospedero contra la infección, la IgA también puede contribuir a la lesión tisular. Puede causar lesión pulmonar, como lo demuestran algunos estudios sobre la lesión pulmonar aguda mediada por complejos Ag-IgA en ratas [54]. La capacidad de la IgA para desencadenar la liberación de mediadores de las células inflamatorias y para activar el sistema del complemento está involucrada en su papel en la inflamación [54].

Se ha encontrado que varios tipos de células se unen a IgA. El receptor Fc para IgA es el Fc α RI (CD89), que está presente en neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos [54]. CD89 es una proteína transmembranal altamente glicosilada con un peso de 32 kDa, que es un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina y está estrechamente relacionada con los receptores Fc humanos para IgG e IgE. La unión de IgA o SIgA a Fc α RI conduce a la activación de una variedad de funciones efectoras, incluyendo fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno, desgranulación y producción de citocinas. Varios estudios han demostrado que la unión de IgA conlleva a la activación mediada por IgA de los eosinófilos, pero las moléculas de unión de IgA en los eosinófilos se han caracterizado de manera incompleta. Como se indica, los eosinófilos expresan Fc α RI [54]. Se ha demostrado que el grado de glicosilación de Fc α RI en eosinófilos es mayor que en los neutrófilos, pero las consecuencias funcionales de esta diferencia no están claras. Mientras que el patrón completo de las estructuras de unión a IgA en el eosinófilo espera una caracterización adicional, está claro que la IgA tiene efectos marcados en los eosinófilos, como la inducción de la desgranulación y la producción de citocinas. También hay evidencia de que los eosinófilos de pacientes con asma atópica son más propensos a los efectos estimulantes de la IgA, ya que los eosinófilos de individuos alérgicos expresan más Fc α RI [54]. En línea con esta observación, recientemente se informó que las citocinas IL-4 e IL-5 derivadas de T-*helper* (Th2) aumentan la unión de las moléculas recubiertas con IgA a los eosinófilos [54,55].

Estudios *in vitro*, [54] indican que la IgA está involucrada en la desgranulación de los eosinófilos *in vivo*. En primer lugar, los niveles de IgA en el BAL de pacientes con asma son más altos que los de los controles [45,52]. En segundo lugar, existe una marcada correlación entre los niveles totales de IgA o sIgA y la proteína catiónica de eosinófilos (ECP) en el BAL y el esputo de pacientes asmáticos [48,49,51]. Además, se han detectado complejos de IgA e IL-8 en el esputo inducido, y los niveles de estos complejos fueron más altos en los asmáticos atópicos en comparación con los sujetos control sanos no atópicos []. Finalmente, también en pacientes con neumonía eosinofílica crónica se informó una correlación entre los niveles de IgA y ECP en BAL [53]. El aumento de los niveles de IgA en las secreciones pulmonares puede explicarse por varios mecanismos, incluido el aumento en el número o la actividad de las células plasmáticas de la mucosa que secretan IgA, el aumento de la fuga de IgA en la circulación y el aumento del transporte de IgA mediada por los componentes secretores a través del epitelio. Se ha demostrado que la IgA en BAL y el esputo de los asmáticos se deriva principalmente de la síntesis local, y que el aumento de los niveles de IgA en estas secreciones no puede explicarse completamente por el aumento de la fuga vascular. Existe evidencia de estudios *in vitro* de que las citocinas que se han implicado en la patogénesis del asma pueden aumentar el transporte de IgA a través del epitelio. IL-4 e interferón (IFN- γ) mejoran sinérgicamente la expresión del componente secretor y la unión de IgA a las células epiteliales cultivadas [53].

En conclusión, los datos actuales apoyan el papel de la inmunoglobulina A en los procesos inflamatorios mediados por eosinófilos en el pulmón en el proceso fisiopatológico del asma. La contribución de la inmunoglobulina A inducida por la activación de otras células efectoras a la inflamación de las vías respiratorias aún debe investigarse. La función de Fc α RI y otros receptores de inmunoglobulina A debe explorarse más a fondo para comprender el papel putativo de la inmunoglobulina A en el asma [54,55,56].

IgG

La IgG es el isotipo predominante del suero, además de poseer la vida media más larga de todos los isotipos de inmunoglobulinas [49,50]. También es la clase más ampliamente estudiada y se han identificado 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cada subclase posee funciones específicas, que van desde contrarrestar la acción de proteínas como toxinas, hasta unirse con alta afinidad a antígenos capsulares y polisacáridos de bacterias [46,51].

En pacientes asmáticos, así como en modelos de alergia, la IgG antígeno específica puede contribuir a la regulación de linfocitos Th2 en procesos inflamatorios relacionados con alergias, dado a que puede neutralizar al antígeno antes de que este llegue a la IgE específica, sin embargo, también es capaz de situarse en los receptores celulares de mastocitos dando lugar a la desgranulación de éstos [48,52]. Al igual que la IgA, algunos estudios han mostrado que probablemente exista una deficiencia de esta inmunoglobulina en el asma y por lo tanto no es capaz de bloquear por completo al antígeno y dando lugar a todos los eventos involucrados en la patología.

El asma extrínseca causada por la sensibilización a un alérgeno exógeno presenta elevados recuentos de eosinófilos, IgE e IgG específicos circulantes. Cuando se inhala o ingiere un antígeno particular, puede interactuar con su anticuerpo citofílico asociado a mastocitos y desencadenar la liberación de mediadores [46]. Éstos a su vez estimulan la inflamación de la mucosa, las células del músculo liso, las glándulas secretoras que producen moco y los macrófagos que eventualmente conducen a broncoespasmo y secreciones respiratorias excesivas. La IgE es un anticuerpo reagínico específico que puede iniciar un ataque de asma; IgG4 también puede ser un anticuerpo homocitotrópico. Los anticuerpos IgG4 pueden transferir la sensibilización inmediata y hacer que los mastocitos se desgranulen; lo que es más importante, pueden bloquear el efecto de una reacción anafiláctica cutánea pasiva generalmente inducida por IgE [54]. Muchos pacientes con asma alérgica o dermatitis atópica tienen niveles séricos elevados de IgG4 [51,53].

En las fases tempranas de la hipersensibilidad alérgica, por ejemplo, después de algunas picaduras de abejas incidentales en apicultores novatos, los anticuerpos contra la fosfolipasa A2 son IgE e IgG1; con la inmunización prolongada, la proporción de anticuerpos IgG4/IgG1 puede cambiar a una respuesta dominada por IgG4. En segundo lugar, esta respuesta restringida con inmuoestimulación crónica tiene implicaciones para la hiposensibilización de sujetos alérgicos, por lo que se induce un anticuerpo bloqueador (IgG4) que competirá por los receptores de los mastocitos evitando que la IgE nativa se una. La IgG4 no se une a los mismos receptores que la IgE, sino a los estrechamente relacionados, por lo que sí está unida a la superficie celular, esta inmunoglobulina puede bloquear el acceso de la IgE a sus receptores por el impedimento estérico [47]. Finalmente, la medición precisa de la concentración del anticuerpo IgG4 dentro del conjunto de anticuerpos IgG es difícil, ya que actúan como anticuerpo monovalente. Por lo tanto, mientras que la IgG4 constituye solo una pequeña porción de la IgG total, su actividad de anticuerpo puede ser inesperadamente grande [47].

Estas interacciones no se han estudiado a fondo en el pulmón humano, pero varios hallazgos pueden correlacionar algunos conceptos que podrían investigarse más a fondo entre las enfermedades alérgicas y los trastornos pulmonares intersticiales. En ambas categorías de enfermedades, la inmunidad humoral y mediada por células parece exagerada [48]. Tienen otras similitudes que no pueden pasarse por alto, por ejemplo, los antígenos orgánicos generalmente son causales, la exposición nasal o de las vías respiratorias es común, y es necesaria la exposición repetida o crónica. Lo que determina la respuesta del hospedero y la posterior localización de la enfermedad dentro del tracto respiratorio, rinitis o hipersecreción de las vías respiratorias y broncoespasmo *versus* alveolitis e inflamación intersticial, es incierto [55,58]. Sin lugar a duda, la localización espacial del antígeno a lo largo de la superficie de la mucosa es importante para la respuesta inmune *in situ* y para la accesibilidad del antígeno a los ganglios linfáticos regionales y al sistema inmunitario sistémico. Debido a que la deposición de antígenos en aerosol dentro de las vías respiratorias es imprecisa, toda la superficie respiratoria puede presentar algunos de ellos [54].

Los complejos, y la afinidad o la eficacia de unión de los anticuerpos competidores, pueden desempeñar un papel en cómo responden los mastocitos y macrófagos al escalar el siguiente nivel de respuesta del hospedero. Esta respuesta secundaria puede ser en varias direcciones. Los mastocitos (o basófilos) pueden ser más estereotipados en su respuesta, produciendo mediadores que afectan solo las células musculares lisas, los eosinófilos y las glándulas bronquiales [48]. El macrófago alveolar podría tener más opciones, ya que su capacidad para procesar antígenos puede iniciar respuestas de linfocitos T o, a través de su amplia gama de mediadores, puede atraer células inflamatorias con quimiotaxinas o poner en marcha la replicación de fibroblastos y mecanismos fibróticos [50,54].

IgE

Generalidades

En la reacción de hipersensibilidad inmediata clásica, la IgE se une a los mastocitos a través del receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI); por medio de un alérgeno polivalente induce la liberación de mediadores vasoactivos preformados, la transcripción de citocinas y la síntesis de *novo* de prostaglandinas y leucotrienos [51]. En la vía aérea, estos mediadores provocan rápidamente edema de la mucosa bronquial, producción de moco y constricción del músculo liso y eventualmente reclutan un infiltrado inflamatorio. El receptor FcεRI, se expresa en mastocitos, basófilos, células de Langerhans y eosinófilos, aunque en estos últimos su expresión es mínima y no se activan a través del FcεRI, por lo que no se tiene bien claro cuál es su función en estas células [51]. En pacientes asmáticos sometidos a inhalación de alérgenos, estos eventos celulares y moleculares producen una obstrucción aguda del flujo de aire con una disminución del volumen espiratorio forzado el primer segundo (FEV1). En muchos individuos asmáticos sometidos a broncoprovocación de alérgenos, hay una segunda fase retardada de obstrucción del flujo de aire, designada como fase de respuesta tardía (LPR). En modelos animales, los anticuerpos IgE específicos pueden transferir tanto la sensibilidad aguda como la LPR al desafío alérgico. Los individuos asmáticos sometidos a una exposición alérgica ambiental recurrente resultan en LPRs persistentes [51]. Además de asociarse con mastocitos y basófilos, a través de FcεRI, la IgE interactúa con varios otros tipos de células mediante el receptor de IgE de baja afinidad CD23. En humanos, CD23 está presente DC, eosinófilos y en basófilos. Varios investigadores han demostrado ahora que la unión del alérgeno con IgE específica facilita la captación de alérgenos por las células portadoras de CD23 para su procesamiento y presentación a las células T [51,55].

La activación de los linfocitos Th2 y los linfocitos B se lleva a cabo por procesos de sensibilización a alérgenos en individuos que poseen una predisposición genética [36], aunque se desconocen los detalles del inicio de tal reactividad y su cinética de aparición. Dichos antígenos son procesados por las células presentadoras de antígeno y dan lugar a la activación del linfocito T, lo que conlleva una liberación de citocinas como IL-4 e IL-13 por parte del linfocito Th2, lo cual lleva a la producción de IgE por parte del linfocito B que fue estimulado por el antígeno y por esas citocinas. Estos anticuerpos, a su vez, se adhieren a otras células residentes que poseen receptores específicos para la IgE. Un pequeño dominio (Fcε3) de la IgE es la región que se une con alta afinidad a FcεRI de los

mastocitos o basófilos o a los receptores de baja afinidad (FcεRII o CD23) en linfocitos B y eosinófilos [56]. Sin embargo, se desconoce si la reacción primaria al antígeno es de tipo IgG y, con los subsecuentes contactos al Ag, esa reacción se modifica para ser predominantemente de IgE, ignorándose también en qué momento ocurriría dicha sensibilización. En personas con asma crónica es posible encontrar niveles séricos elevados de IgE total y específica, por lo que las pruebas cutáneas como intradermorreacciones y pruebas de anafilaxia pasiva cutánea dan positivas ya que son respuestas mediadas por IgE específicas a determinado Ag [56,57].

Las células B cambian de isotipo para producir IgE específica contra un determinado antígeno principalmente en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) de amígdalas y adenoides. También se producen grandes cantidades de IgE en tejidos periféricos, en donde se encuentra estrechamente unida a células cebadas y basófilos por medio de su receptor de alta afinidad (FcεRI). Los niveles de IgE libre en suero son los más bajos de todas las clases de inmunoglobulinas (5×10^5 mg/mL en sujetos sanos comparados con 9 mg/mL para IgG1 y 3 mg/mL para IgA1) [57]. Otra diferencia con respecto al resto de la familia de las inmunoglobulinas es su vida media corta en suero (alrededor de 2 días) en comparación con IgG1 y IgA1 (alrededor de 21 y 6 días, respectivamente) [58,59].

Una vez que se ha realizado el cambio de isotipo a IgE, la célula B que se encuentra en el centro germinal del folículo linfoide se somete a la maduración de afinidad y se diferencia principalmente en células plasmáticas de corta duración que producen IgE de alta afinidad. Otras células B se diferencian en células plasmáticas de larga duración que migran a la médula ósea y otras se convierten en células B IgE de memoria. No está bien definido cuál es el mecanismo para tal o cual camino, pero reviste importancia para la memoria humoral que todas las clases de células plasmáticas formadas expresan el BCR en su superficie que, al tener un nuevo contacto con el antígeno que le dio origen, reacciona rápidamente secretando IgE específica [60].

Los estudios que demuestran que la IgE puede ser producida fuera de la clásica vía dependiente de células con perfil Th2 describen mecanismos T independientes. Se ha postulado que diversas sustancias pueden actuar como adyuvantes y estimulantes de la producción de IgE [61,62]. Un ejemplo son las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, también conocidas como superantígenos, que parecen ser capaces de estimular la inflamación eosinofílica y también de unirse a las inmunoglobulinas a través de la región constante, fuera del sitio de unión convencional. No se conoce el mecanismo exacto de esta vía ni por qué aumenta solo la producción de IgE, pero esta hipótesis parte de asumir que más de un tercio de la población presenta en la mucosa nasal colonización por *S. aureus* que, junto con ácaros y otros alérgenos en pacientes con rinitis, pueden desencadenar, a través de los superantígenos, una respuesta IgE en la vía aérea [63]. Otros ejemplos de sustancias que pueden ser promotoras de respuesta IgE son el humo de cigarrillo, la infección por citomegalovirus (CMV) y la enfermedad injerto contra hospedero (EICH) [64]. Existen aspectos de la inmunoglobulina E que se desconocen dentro de la patología del asma humano, entre los cuales están: ¿Cuántas exposiciones al alérgeno se necesitan para que comience la producción elevada de IgE?, ¿En que

momento se desgranulan los mastocitos y comienza la exacerbación de los síntomas? entre otros.

Tabla 1. Concentración de inmunoglobulinas en sangre.

Isotipo	Concentración (mg/mL)	Vida media en suero (Días)
IgD	0,03	3
IgM	1,5	10
IgG1	9,0	20
IgG2	3,0	21
IgG3	1,0	7
IgG4	0,5	21
IgA1	3,0	6
IgA2	0,5	--
IgE	5×10^{-5}	2

Modificado de Hans *et al.* 2016

Receptores de la IgE

La IgE es el sello distintivo de la hipersensibilidad de tipo 1, pero los mecanismos que regulan la producción de IgE siguen siendo poco conocidos [64] (Figura 9). Se piensa que la IgE se produce a través de diferentes vías biosintéticas, ya sea por recombinación de cambio de clase "directa" de IgM, en células B del centro germinal, o por medio de un cambio "secuencial" de IgM a IgG1 y luego de IgG1 a IgE que puede ocurrir fuera de los centros germinales. Aunque se piensa que la memoria de IgE (a los alérgenos) se asienta originalmente en la IgG, se demostró que las células B (humanas) de la sangre o de las amígdalas pueden sufrir una recombinación de cambio de clase a IgE tras la reacción con CD40 y la activación por IL-4 o IL-13, producidos por las células Th2, así como también por las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) [65]. Estas células tienen propiedades morfológicas similares con los linfocitos, pero carecen del receptor de células B o T y los marcadores de superficie de las células del linaje. Este grupo de ILC se caracteriza por la producción de IL-5, IL-9 e IL-13 tras la estimulación por IL-33, o por una combinación de IL-2 e IL-25 [64]. IL-33 e IL-25 sirven como alarmas en respuesta a una lesión tisular o en el reconocimiento de receptores de reconocimiento de patrones por el epitelio. Sin embargo, se ha informado que las ILC de tipo 3, recientemente descritas, producen cantidades significativas de IL-17 e IL-22. Las ILC3 parecen tener un papel predominante en la defensa contra la infección por hongos en ratones y contra las bacterias a través de IL-22 [65].

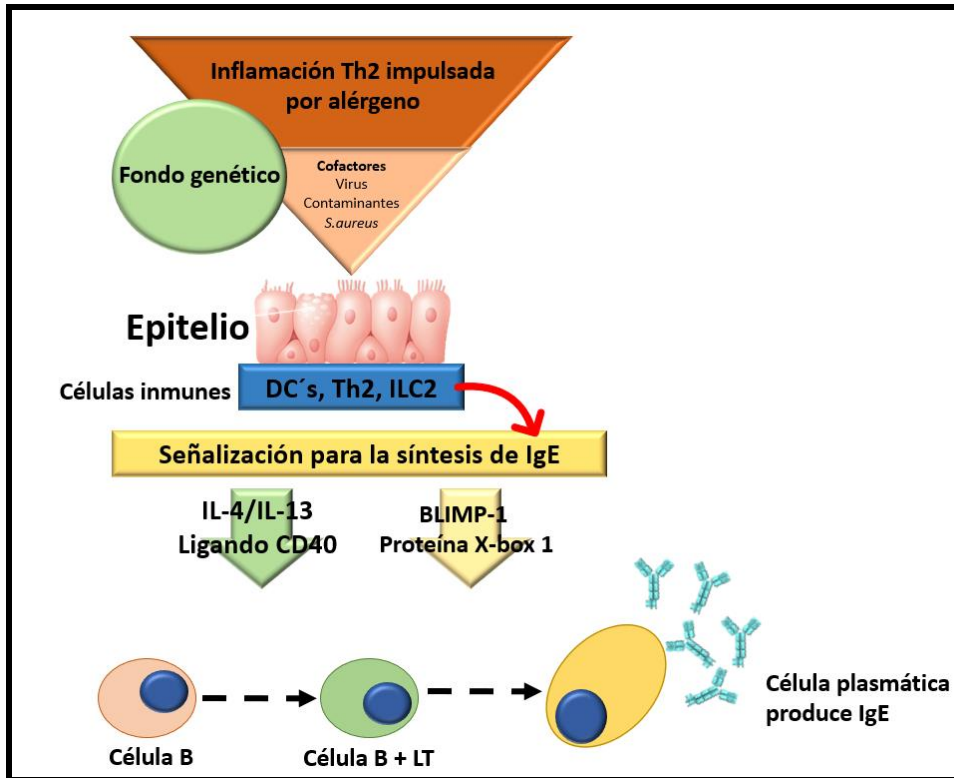


Figura 9. Factores potenciales que promueven la producción de IgE en el asma. Si bien los alérgenos son el principal desencadenante de la inflamación alérgica, los factores ambientales, incluidos los virus y los contaminantes, actúan como cofactores a través de la activación del epitelio y la modificación del alérgeno. Los polimorfismos genéticos subyacentes a la atopia actúan concomitantemente. El reclutamiento de las células inmunes involucradas en la inflamación alérgica, incluidas las células dendríticas (DC's), las células T y las células B, está orquestado por el epitelio activado. La IL-4 y la IL-13, las citocinas obligatorias para la recombinación de cambio de clase a IgE son producidas por las células Th2 pero también por las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) [64,65].

In situ, los estudios en la mucosa nasal mostraron que la expansión de las células B de IgE aumenta dramáticamente con la prueba de alérgenos, con una tasa de síntesis de IgE de ~3.6 millones de moléculas por día por mm, principalmente por el cambio de IgG. Las células B se diferencian en células plasmáticas secretoras de IgE bajo la influencia de los factores de transcripción BLIMP-1 (proteína de maduración de células B 1) y proteína X-box 1 [66]. Una pequeña fracción de las células plasmáticas de IgE de vida larga se encuentra en la médula ósea y también podría proporcionar IgE sérica constante. Se ha observado recientemente que las alteraciones epigenéticas (metilación) que ocurren en los eosinófilos contribuyen al 13 % del nivel de IgE en suero [65,66], lo que sugiere un vínculo entre los eosinófilos y la producción de IgE. El FcεR1, se expresa de forma constitutiva en mastocitos y basófilos como un tetrámero (αβγ2) (Figura 10). Tras la reticulación del receptor, una cascada de eventos intracelulares impulsa a la cinasa Lyn a fosforilar los factores de activación basados en la tirosina inmunorreceptora en las

subunidades β y γ , lo que lleva a la activación de Syk [66], que tiene un papel fundamental en la activación celular y la desgranulación. Fc ϵ RI también se expresa en monocitos y células dendríticas en forma trimérica ($\alpha\gamma_2$). La ausencia de una subunidad β permite la internalización del receptor después de la unión. Esta vía subyace en la presentación de antígenos facilitada, donde la IgE enfoca el alérgeno en la superficie celular a través de Fc ϵ RI. Tras la internalización, el complejo antígeno-receptor de IgE se procesa y finalmente se presenta a través de las moléculas de clase II del complejo MHC, lo que reduce el umbral de activación de las células T [19,67] y desvía la polarización hacia Th2 [67]. Se demostró que el Fc ϵ RI trimérico también contribuye a la eliminación de la IgE sérica, ya que los complejos antígeno-IgE se internalizan y se transfieren a los lisosomas, donde se degradan [66,67].

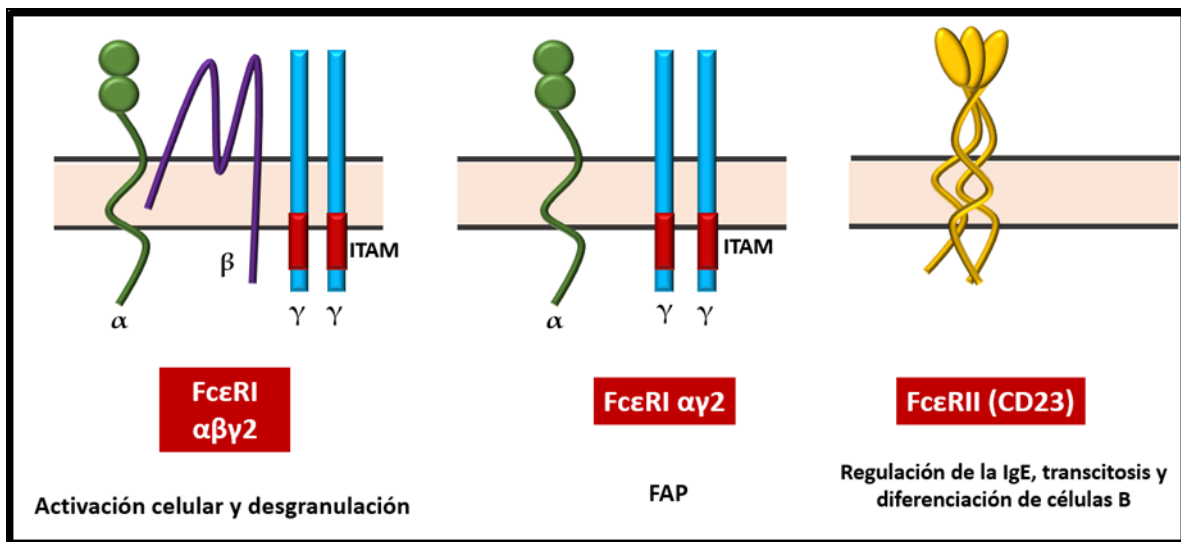


Figura 10. Receptores de IgE y su respectiva señalización río abajo. El Fc ϵ RI tetramérico es responsable de la desgranulación de los mastocitos y basófilos activados por IgE en la exposición al alérgeno, mientras que la forma trimérica, que carece de la cadena β , media la presentación del alérgeno facilitada impulsada por IgE (FAP) en las células dendríticas y las células B. Fc ϵ RII (CD23) representa un receptor de IgE de baja afinidad, que regula la síntesis de IgE y la diferenciación de las células B, así como el transporte de IgE a través de las células epiteliales, que puede ser escindida por la actividad proteolítica de Der p 1 [64,68].

Fc ϵ RII (CD23) se conoce como el receptor de baja afinidad para IgE. Se expresa principalmente en las células B y regula la producción de IgE, así como la diferenciación de las células B, la presentación de antígenos a través de CD23-MHC II [67,68] y las interacciones con las células epiteliales [67]. La IgE solo se une a CD23 cuando se acompleja a un alérgeno mediante la formación de un complejo trimolecular. Además, la IgE puede unirse a otros receptores, como la galectina-3 y el Fc γ RIII. Si bien se ha demostrado que la ligación de IgE-Fc γ RIII en las CD en ratones promueve las respuestas Th2 mediante la inhibición de la producción de IL-12 [27], el papel de estos receptores

alternativos para las respuestas de IgE en el asma humano sigue siendo desconocido [65].

Síntesis de IgE

La producción de anticuerpos IgE por parte de células B se desencadena por una serie compleja de señalización e interacciones de la superficie celular, seguidas de reordenamientos genéticos moleculares en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina. Inicialmente, todas las células B producen anticuerpos IgM. En este punto, un cassette V_H (D) J_H de secuencias que codifican el dominio variable está inmediatamente adyacente a los exones C_{μ} , que codifican las regiones constantes de IgM en el extremo 5' del locus de IgH (locus de la cadena pesada) [62,67]. Más abajo en la IgH se encuentran varios grupos ampliamente separados de exones, C_{γ} , C_{ϵ} y C_{α} , que codifican los dominios de región constante de los isotipos de cadena pesada de IgG, IgE e IgA. Al ser estimulados por las citocinas, junto con las interacciones críticas entre las células y las moléculas accesorias de la superficie de los T CD4 +, las células B pueden cambiar el isotipo de los anticuerpos que producen, al tiempo que conservan su especificidad antigénica original. Este proceso requiere que el DNA genómico se empalme y se vuelva a unir para mover los dominios VDJ desde su ubicación proximal a C_{μ} a una posición de muchas kilobases río abajo junto a los exones de la región C que codifican las cadenas pesadas de otros isotipos [63]. Una gran cantidad de DNA es eliminado y descartado en este proceso irreversible, por lo tanto, el mecanismo se conoce como recombinación de cambio delecional [65,66].

Antes del inicio de estos reordenamientos genómicos, las células B estimuladas con IL-4/IL-13 destinadas a cambiar de IgM a IgE deben primero activar la transcripción del RNA en el locus de la cadena pesada ϵ no reorganizada o de la línea germinal. El RNA producido se denomina de transcripción de la línea germinal ϵ y se dirige desde un promotor 5' del exón I ϵ ubicado justo río arriba de los 4 exones C_{ϵ} [65]. El RNA maduro de la línea germinal ϵ incluye un exón I ϵ de 140 pb y los exones $C_{\epsilon 1}$ a $C_{\epsilon 4}$. I ϵ contiene varios codones de parada y, por lo tanto, estos transcritos no codifican una proteína funcional y se conocen como estériles [64,68]. La transcripción de la línea germinal debe ocurrir antes de que la recombinación de cambio delecional pueda proceder. Las células B en las que se ha mutado el exón I o su promotor no pueden sufrir un cambio de isotipo. A la inversa, la introducción de un promotor activo corriente arriba del exón I no solo promueve la transcripción de la línea germinal sino también el cambio de isotipo [67].

Funciones de la IgE

A pesar de ser la inmunoglobulina que se encuentra en menor concentración en el suero humano, la IgE desempeña la principal defensa contra las enfermedades parasitarias, especialmente las causadas por helmintos y algunos protozoos [60] y también juega un rol clave en la patogenia de las enfermedades alérgicas inmediatas. Se le ha relacionado con la defensa antitumoral y con el desarrollo de enfermedades autoinmunes [61,65]. No se le considera fundamental para la defensa contra microorganismos bacterianos, debido a que carece de capacidad para activar el complemento y de participar en la opsonización bacteriana [60]. La función de la IgE implica interacciones específicas con una variedad

de antígenos capaces de desencadenar una respuesta diferente dependiente del lugar donde se encuentren las células efectoras que las expresan. Dado que tanto la IgE como los mastocitos se concentran en la mucosa de diferentes órganos, se encuentran en la primera línea de defensa frente a moléculas extrañas, por lo que la activación del complejo IgE-FcεRI en los diferentes órganos diana provoca signos y síntomas clínicos característicos: en la piel, dermatitis atópica o eccema; en la nariz, rinitis; en los ojos, prurito e inflamación conjuntival; en los pulmones, broncoconstricción, asma; y en el tracto gastrointestinal, gastroenterocolitis, etc. [61,67].

La interacción de IgE con su receptor en la superficie de los mastocitos conduce, en cuestión de minutos, a la llamada “fase temprana” de la reacción alérgica, mediada por la liberación inmediata de mediadores preformados almacenados en gránulos citoplasmáticos y de mediadores lipídicos, sintetizados a partir de la membrana celular. La activación también condiciona señales para que comiencen a producir citocinas y quimiocinas, las liberadas en esta primera fase llevan a la “fase tardía”, que implica el reclutamiento y la activación de células inflamatorias en los sitios donde se activaron los mastocitos [61]. Los precursores de los mastocitos se generan en la médula ósea y migran a la mucosa antes de expresar FcεRI. Este receptor se expresa en gran cantidad en la superficie celular una vez que llega al tejido, probablemente como resultado de la regulación positiva de IgE mediada por los mismos receptores de alta afinidad [62]. Las concentraciones necesarias de IgE para que se genere esta regulación son superiores a las normalmente presentes en la circulación, y puede acentuarse por la síntesis local de IgE. Existen otras funciones ejercidas tanto por la IgE como por el CD23 cuando interactúa con monocitos y eosinófilos, células efectoras que intervienen en la fase tardía de la inflamación alérgica. Como se mencionó anteriormente, al igual que la regulación positiva para la expresión de los FcεRI ejercida por IgE, IL-4 e IL-13, también estimulan la expresión de CD23, lo que genera la activación para otras funciones útiles, tales como la remoción de complejos antígeno-IgE y la fagocitosis de patógenos parasitarios y tumorales [67]. La regulación positiva de CD23 también conduce a la liberación de fragmentos solubles implicados en la citotoxicidad IgE-independiente mediada por monocitos. Los fragmentos de CD23 al unirse a la αβ2-integrina de la membrana del monocito producen factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas proinflamatorias, tales como IL-1 y IL-6, que probablemente actúen secuencialmente en la muerte celular y la consiguiente eliminación del patógeno. En el desempeño de sus funciones, los monocitos y eosinófilos inevitablemente causan algunos daños en células vecinas del tejido afectado [62,66,67].

Disminución de la IgE total

La mayoría de los ensayos sólo pueden detectar niveles de IgE de 2-5 UI/mL, siendo indetectables niveles más bajos. Debido a esto, la deficiencia de IgE se define como niveles de IgE <2,5 UI/mL [64]. En los seres humanos, los niveles bajos de IgE pueden estar asociados con la disminución de otras inmunoglobulinas y con enfermedad sinopulmonar. También se ha observado que los pacientes con IgE en baja concentración presentan mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes. No está claro si la

deficiencia selectiva de IgE podría considerarse una inmunodeficiencia clínicamente relevante o es simplemente un marcador de desregulación inmune general [64].

Aumento de IgE total

El aumento de la IgE sérica total se observa en enfermedades alérgicas, algunas inmunodeficiencias primarias, infecciones parasitarias y virales, ciertas enfermedades inflamatorias, algunos tumores malignos y en ciertos trastornos específicos [66].

Desencadenantes ambientales de las respuestas de IgE en el asma

Alérgenos

Los alérgenos son antígenos ambientales capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos. El vínculo entre la sensibilización alérgica (atopia) y el asma se ha observado durante mucho tiempo [75,76], pero saber si un individuo sensibilizado se volverá sintomático clínicamente tras la exposición al alérgeno depende de varios factores, como el tipo de alérgeno, la dosis, la ruta y la reactividad de la vía aérea del sujeto en un momento dado. La sensibilización de IgE al ácaro del polvo doméstico (HDM) afecta hasta 25-30% de la población mundial y representa un factor de riesgo importante para el asma [75]. Aunque se han identificado las características comunes de los alérgenos (la gran mayoría son proteínas o glicoproteínas <70 kDa), no existe una característica estructural que pueda discriminar los alérgenos de los antígenos no alérgicos [76]. Algunos autores especularon que la potencia alérgica podría atribuirse al hecho de que la mayoría de los alérgenos no tienen homólogos bacterianos, a diferencia de los antígenos no alérgicos en la misma especie [75]. Sin embargo, este concepto se ve desafiado por el reciente descubrimiento de la IgE específica para *Staphylococcus aureus* en pacientes con asma asociada con poliposis nasal [68,76]. La función biológica del alérgeno es probablemente un factor importante que determina la exacerbación de los síntomas del asma. Por ejemplo, el principal alérgeno Der p 1 es un miembro de la familia de la cisteína proteasa capaz de escindir las proteínas de la unión estrecha epitelial, lo que lleva a su interacción directa con las células inmunes en áreas subepiteliales [75,76]. Al escindir CD23 (FcεRII) en la superficie de las células B, Der p 1 también induce un aumento en el nivel de CD23 soluble. En última instancia, esto favorecerá el reclutamiento de células B *naïve* capaces de presentar péptidos antigénicos a las células T y, en consecuencia, la producción de IgE específica de antígeno (alérgeno) [76,77,79].

Además, cada vez está más claro que los alérgenos proteolíticos son capaces de activar la liberación de citocinas pro-Th2 derivadas del epitelio, como GM-CSF, IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP) [77]. La estructura terciaria del antígeno parece determinar en parte su "alergenicidad" y su capacidad para desencadenar la inmunidad pro-Th2 o contrarrestar las vías Th1 en la mucosa de la vía aérea [77]. El papel de la exposición al alérgeno (dosis, tiempo) en el inicio de una enfermedad alérgica sigue siendo un tema de debate. Inicialmente se consideró que la sensibilización se produce de una manera dependiente de la dosis, al menos para HDM, que se cree que se produce de una manera lineal. Por el contrario, la sensibilización a la caspa de animales parece seguir una relación en forma de campana con efectos protectores que aparecen en la exposición a altas dosis. Esta diferencia se atribuye a las propiedades aerodinámicas de

las partículas portadoras, que son más altas para HDM (> 10 µm) y se encuentran confinadas en un depósito de polvo en ausencia de perturbaciones, mientras que la caspa de animales es de menor tamaño (<5 µm). Estas propiedades aerodinámicas afectan claramente la exposición de un individuo, ya que las dosis de exposición son mucho más bajas para HDM y se cree que no pueden inducir tolerancia [78]. En la actualidad, no se ha alcanzado un consenso con respecto a la edad, la dosis y el mecanismo por el cual la exposición al alérgeno inducirá la sensibilización y/o los resultados clínicos asociados, por lo que se necesita de modelos experimentales para resolver estos aspectos.

***Phleum pratense* (planta timotea)**

La alergia al polen de plantas tiene una alta prevalencia en Europa, América y Australia, donde hasta 70% de los pacientes con alergia muestran reactividad de IgE contra alérgenos de polen de gramíneas. Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado hasta 11 grupos de proteínas alergénicas en una o más de estas especies [76]. Estos grupos están constituidos por proteínas glicosiladas y no glicosiladas, de diferentes tamaños, estructuras y características fisicoquímicas. Se le llama “alérgenos mayores” a aquellos que inducen una respuesta IgE específica en más del 50 % de la población alérgica a esa sustancia o producto [76]. El término “alérgenos mayores” no se refiere, por lo tanto, a la antigenicidad del alérgeno, si sólo consideramos la capacidad de inducir la producción de IgE, sino al porcentaje de personas sensibilizadas frente al mismo. Por el contrario, se llama “alérgenos menores” a aquellos que inducen una respuesta IgE específica en menos del 50 % de la población alérgica a esa sustancia o producto [83]. Adicionalmente, los antígenos alergénicos se han agrupado con base a sus funciones biológicas homólogas y, por lo tanto, homología estructural también. Para el caso de los alérgenos que provienen del polen de plantas, los grupos representativos son:

Grupo 1: Alérgenos mayores. Prevalencia del 90% en los pacientes alérgicos.

Glicoproteínas, es el principal alérgeno del polen, producido por cada especie de polen.

Grupos 2 y 3: Alérgenos menores. Presentan alto grado de homología con los alérgenos del grupo 1.

Grupo 4: Alérgeno mayor. El 10-15% de su estructura la forman carbohidratos. Son glicoproteínas, miembros de la familia de enzimas de Berberina, sistema de respuesta a los patógenos de plantas.

Grupo 5: Alérgeno mayor. Se ha encontrado una prevalencia de sensibilización del 65 al 85 %. Se encuentra en las especies de gramíneas *Pooideae*, asociadas con partículas de almidón citoplásmico submicrónico.

Grupo 6: Alérgeno mayor. Homólogo a las secuencias internas del grupo 5, solo en *Anthoxanthum odoratum*, *Phleum pratense* y *Poa pratensis*.

Grupo 7: Alérgeno menor. Reconocido casi en 10% de los sujetos alérgicos. Se trata de una proteína ácida con dos dominios fijadores de calcio, por lo que se denomina polcalcina. Se considera un panalérgeno, puesto que se encuentra presente en el reino animal y vegetal, aunque en este último es exclusivo de los pólenes.

Grupo 10: Alérgeno menor. Constituido por el citocromo C, una glicoproteína ácida de 12 KDa.

Grupo 11: Alérgeno mayor. Representado por una glicoproteína, relacionado con Ole e 1, que es un inhibidor de la tripsina de soya.

Grupo 12: Alérgeno menor. Pertenecientes a las profilinas: La profilina es una proteína de 12 a 15 KDa presente en todas las células eucariotas y muy conservada a lo largo de la evolución, lo que la convierte en un panalérgeno. Tiene un papel estructural, formando complejos con la actina, regula su polimerización, y participa en la forma y movimientos celulares y en la germinación de los pólenes.

Grupo 13: Alérgeno menor. Es el grupo más recientemente identificado. Pertenecen a la familia de las poligalacturonasas [76,77,78,79].

Los alérgenos del polen de gramíneas del grupo 1, grupo 2/3 y grupo 5 se identificaron como alérgenos principales que están presentes en la mayoría de las especies de gramíneas. Casi 95% de los pacientes alérgicos al polen de pasto producen IgE específica, 80% reaccionan con alérgenos del grupo 5 y 60% a 70% exhiben reactividad IgE para los alérgenos del polen de pasto del grupo 2/3 [75].

La subfamilia *Pooideae* contiene la mayoría de los géneros importantes en producir polinosis. Tienen una alta reactividad cruzada con base en la marcada homología de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, la mayoría de los cuales, son alérgenos mayoritarios. Existe coincidencia en que la reactividad cruzada entre ellas es tan importante que en general es suficiente con una o dos especies para diagnosticar y tratar a los pacientes. En cambio, las subfamilias *Panicoideae* y *Cloridoideae* muestran una mayor diversidad y carecen de los grupos 2 y 5 de alérgenos. Sin embargo, los miembros de la familia *Cloridoideae* parecen tener reactividad cruzada con *Cynodon dactylon*, de elevada alergenidad y que podría ser una elección apropiada para cubrir otros miembros del grupo. Finalmente *Cynodon dactylon* representa eficazmente a la subfamilia *Panicoideae*.

Por el lado de los panalérgenos, el Grupo 12 de alérgenos, conformado por profilinas y el Grupo 7 por proteínas ligadoras de calcio, son los que presentan elevada reactividad cruzada con alérgenos de otras especies vegetales. En especial las profilinas son las responsables de la reactividad cruzada con frutas frescas como apio, manzana y kiwi, entre otras. Clínicamente se manifiestan como síndrome de alergia oral. La prevalencia de sensibilización a profilinas en pacientes alérgicos a gramíneas es baja (alrededor del 20%). La sensibilización inhalatoria a profilinas es un factor de riesgo para el desencadenamiento de gran número de alergias alimentarias.

El polen de pasto es una de las fuentes más importantes de síntomas de alergia, el *Phleum pratense* es uno de los pastos más extendidos en el mundo y se le ha relacionado con procesos alérgicos, asma e incluso fiebre del heno. Este pasto crece en climas que van desde cálidos hasta fríos.

Se han identificado 9 proteínas altamente alérgicas en el polen de esta planta, clasificadas de acuerdo con su función biológica y reacción cruzada. Los alérgenos de

este pasto están denominadas Phl p1, Phl p2, Phl p4, Phl p5, Phl p6 y Phl p13. La reconocida por casi el 95 % de los pacientes alérgicos al polen es la Phl p1 [76,78].

Los granos de polen de *Phleum pratense* son de un tamaño aproximado de 25-26 μm , y dado su tamaño es muy difícil que penetren la mucosa de las vías aéreas, sin embargo, al hidratarse los gránulos de polen que contiene al alérgeno forman un aerosol que es capaz de pasar por el revestimiento de la mucosa de las vías respiratorias y con ello desencadenar una respuesta inmunológica dando lugar a los signos clásicos de la hipersensibilidad de tipo I. A través de ensayos de Western blot, se ha encontrado que Phl p5 es la proteína con mayor inmunogenicidad [76,78]. Los estudios donde los modelos animales han sido sometidos a retos con *Phleum pratense* son escasos y en la mayoría se ha utilizado ratones y ratas. Por otro lado, el extracto de este pasto se ha utilizado en la clínica para realizar pruebas cutáneas con fines de diagnóstico en individuos que se sospecha pueden presentar hipersensibilidad a este pasto o bien en terapias de hiposensibilización donde se utilizan dosis con concentraciones muy bajas del extracto alérgico [76]. Estos procedimientos son empíricos y requieren más estudios con una base científica sólida. Un grupo de investigadores intentaron obtener información sobre las propiedades inmunológicas, la localización y la aparición de Phl p4 y alérgenos relacionados. Phl p4 se caracterizó por ser un alérgeno principal de polen de esta hierba resistente a tripsina.. Phl p4 se localizó en la exina, que es la envoltura gruesa que protege los granos de polen de *Phleum pratense*. Adicionalmente se pudieron encontrar similitudes significativas de 10 aminoácidos de un péptido de Phl p4, con Arab 1, el principal alérgeno de la ambrosía. La similitud inmunológica de Phl p4 y Arab a 1 se confirmó por reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales e IgE de pacientes [76,79].

Modelos animales para el estudio del asma

Por muchas razones, los estudios de asma en humanos no se ajustan a todos los requisitos éticos de experimentación. Por lo tanto, los modelos animales son necesarios para comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos y para evaluar tanto la seguridad como la eficacia de nuevas terapias sobre el asma antes de comenzar ensayos clínicos en humanos [69]. Sin embargo, el uso de animales de experimentación en laboratorios de investigación también requiere el cumplimiento de preceptos éticos. Se han descrito diferentes fenotipos en el asma, pero no existe una forma estándar de distinguirlos [69]. Difieren en cuanto a parámetros clínicos, criterios fisiológicos y desencadenantes ambientales, y se necesitan biomarcadores para identificar distintos endotipos. Los modelos animales están limitados por no ser capaces de imitar todas las características y fenotipos del asma humano [69,70]. Sin embargo, han demostrado que son de gran utilidad para ampliar el conocimiento de muchas características inflamatorias, estructurales y fisiológicas del asma [70]. Los linfocitos Th2 se han estudiado ampliamente, pero desafortunadamente en un tercio de los pacientes con asma la respuesta inmune no está mediada por Th2 [70]. Por lo tanto, se necesitan modelos animales que representen mejor a cada fenotipo de asma. Existen muchos modelos de asma, que usan diferentes especies y métodos para imitar mejor el asma humana. Representan un escenario para comprender la fisiopatología de la enfermedad y probar potenciales terapias con medicamentos.

Los modelos animales siguen siendo la forma más fácil de comprender la fisiopatología del asma alérgica y de ayudar a desarrollar nuevos fármacos y estrategias de inmunoterapia para el tratamiento de esta enfermedad compleja. Sin embargo, existen variaciones importantes entre las especies de animales, los protocolos y los alérgenos utilizados, pero pocos estudios evalúan estas discrepancias para determinar el mejor modelo. Los protocolos más recientes han inducido la sensibilización y el desafío por las mismas rutas en las que se produce la enfermedad humana y el uso de aeroalérgenos que desencadenan la enfermedad clínica [70,71]. Las investigaciones actuales deberían definir cuáles son las mejores estrategias. Luego estarán listas para avanzar, para desarrollar mejor los modelos de los diferentes fenotipos del asma, como la enfermedad no atópica, y para avanzar más en el desarrollo de futuros tratamientos. Parece que los modelos más parecidos al humano serán excelentes opciones a futuro para una mejor comprensión del papel de cada molécula y célula en los diferentes fenotipos y endotipos del asma [71,72,74].

Muchas especies de animales se han utilizado para estudiar los mecanismos implicados en el asma (*Drosophila*, rata, cobayo, gato, perro, bovino, ovejas, caballos y primates no humanos), pero el modelo más común para la representación de la inflamación es el ratón [70,71]. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se utiliza como un prototipo alternativo para la inmunidad innata y las células epiteliales de las vías respiratorias en el asma. Los cobayos han sido la especie animal más ampliamente utilizada como los primeros modelos animales de enfermedad respiratoria alérgica, porque presentan procesos fisiológicos de las vías respiratorias muy similares a los humanos. También responden fuertemente a los alérgenos y tienen control autónomo de las vías respiratorias. Por otro lado, las desventajas del uso de cobayos son la falta de sondas y reactivos específicos para estudiar los resultados alérgicos. Entonces, la comprensión de los mecanismos humorales y celulares resulta muy difícil. Además, hay escasez de modelos transgénicos y pocas cepas de cobayos para estudios comparativos [72]. Otra desventaja del cobayo es el mayor tiempo de gestación (60-75 días) en comparación con los ratones (20-30 días), y el menor número de descendientes. Además de que el principal anticuerpo anafiláctico en el cobayo es IgG1 [72].

Los cerdos son más similares a los humanos en términos de anatomía, inmunología, bioquímica, fisiología, tamaño y genética [73]. En efecto, el cerdo se ha usado como un modelo animal para la fibrosis quística, dada la semejanza de los pulmones porcinos con los humanos en cuanto a la estructura del árbol traqueobronquial, la fisiología pulmonar, la morfología de las vías respiratorias, la abundancia de las glándulas submucosas de la vía aérea, y los patrones de síntesis de glicoproteínas, permitiendo que estos modelos sean traslacionales para varias patologías presentes en el humano [73,74].

Tabla 2. Ventajas y desventajas de varios modelos animales de asma.

Ventajas	Desventajas
Ratón: Pequeño, barato, reproducción rápida, disponibilidad de reactivos específicos, IgE es la mayor clase de anticuerpo anafiláctico y muestra de hiperreactividad de las vías aéreas a carbacol.	Vasculatura es el objetivo de la anafilaxia, malas respuestas de histamina, desarrollo del músculo liso de las vías aéreas.
Rata: Pequeño, barato, IgE es el anticuerpo anafiláctico, respuesta a cromolina y metacolina, respuesta tardía y temprana de las vías aéreas.	Requiere la inyección del antígeno para causar sensibilización y de adyuvantes, mala respuesta de histamina, músculo liso de la tráquea tiene mala respuesta con leucotrienos.
Cobayo: Pequeño, dócil, relativamente barato, posible vía nasal para la inmunización, respuesta en las vías aéreas a histamina, repuesta temprana y tardía de las vías aéreas, inflamación eosinofílica en la respuesta tardía, infiltración de neutrófilos durante la respuesta tardía de las vías aéreas, hiperreactividad de las vías aéreas, respuesta de músculo liso de la tráquea a histamina.	Pocos reactivos específicos de la especie, IgG es el principal anticuerpo anafiláctico, no es sensible a cromolina y pocas cepas endogámicas.
Conejo: Pulmón es el principal órgano anafiláctico, IgE es el anticuerpo anafiláctico, muestra respuesta tardía y temprana en las vías aéreas.	La inmunización en neonatos requiere de una respuesta tardía en las vías respiratorias
Perro: Pulmón es el órgano anafiláctico, IgE es la mayor clase de anticuerpo y muestra hiperreactividad en las vías respiratorias.	No muestra respuesta tardía en las vías aéreas y muestra variabilidad individual en respuestas a <i>A. suum</i> .
Caballo: Sensibilización nativa al ambiente de granja, desarrolla hiperreactividad (solamente durante la enfermedad clínica), exacerbaciones recurrentes de la enfermedad clínica.	Costo y grande
Oveja: Sensibilización nativa a <i>A. suum</i> , demuestra respuesta temprana y tardía en las vías respiratorias, recurrencias de exacerbación en la enfermedad clínica.	Costo y grande
Primate no humano: Respuesta consistente al antígeno, sensibilización nativa a <i>A. suum</i> , respuesta alérgica persistente por años, IgE es la mayor clase de anticuerpo.	Costo de la especie. Aspectos éticos para emplearlos en experimentación

Modificado de Karol,1994.

El cerdo como modelo experimental traslacional en medicina respiratoria

El modelo porcino ha contribuido significativamente a la investigación biomédica durante muchas décadas. El tamaño y la anatomía similares de los órganos porcinos y humanos hacen que este modelo sea particularmente beneficioso para la investigación traslacional en áreas como el desarrollo de dispositivos médicos, la terapéutica y el xenotransplante. En los últimos años, se superó una limitación importante con el modelo porcino con la exitosa publicación del genoma del cerdo. Como resultado, es probable que el papel de este modelo sea aún más importante [78]. Para el campo de la medicina respiratoria, las similitudes entre los pulmones de los cerdos y los humanos le dan al modelo porcino un potencial particular para el avance de la medicina traslacional. Se han generado modelos porcinos modificados genéticamente de la fibrosis quística que, a diferencia de los modelos convencionales, desarrollan una enfermedad similar a la fibrosis quística humana [60,78].

Anatomía pulmonar

El modelo experimental porcino semeja fielmente el aparato respiratorio humano tanto desde el punto de vista fisiológico y anatómico, en tamaño y valores de presión arterial e índice respiratorio. Además, los alvéolos porcinos se multiplican rápidamente en las primeras 2 a 4 semanas de vida, similar a lo que ocurre durante los primeros 3 años de vida humana [78], lo que permite hacer estudios traslacionales de desarrollo temprano en tiempos relativamente cortos. La estructura morfológica y la distribución de las vías aéreas porcinas son muy similares al pulmón humano [60,78]. Las vías aéreas porcinas tienen una estructura más cartilaginosa, pero se ha identificado un número similar de ramificaciones bronquiales en humanos y cerdos. La disminución general del diámetro y la longitud observada en las bifurcaciones del árbol bronquial humano también se observa en las vías respiratorias porcinas [60] y los pulmones de los cerdos y los humanos tienen lóbulos bien definidos demarcados por septos interlobulares.

Histología

La estructura histológica es similar entre el tracto respiratorio humano y porcino. El tipo de epitelio que recubre la luz de las vías respiratorias de los cerdos depende del nivel del tracto respiratorio [78]. A diferencia de otros animales (por ejemplo, perros), se encuentran grandes cantidades de glándulas submucosas en los bronquios de los cerdos [60], lo que es importante para el estudio de enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias. Las glándulas submucosas están asociadas con la capa de músculo liso en todos los niveles bronquiales en los lados luminal y cartilaginoso. Toda la capa no cartilaginosa que recubre el lumen bronquial tiene glándulas submucosas [12,13]. Por ello, la evaluación de la remodelación pulmonar que ocurre en el asma humano podría replicarse mejor en el modelo porcino.

Se ha informado que la diferenciación y desarrollo de epitelios bronquiales y glándulas submucosas primordiales porcinas en la gestación y hasta el período postnatal es comparable a la regulación del desarrollo observada para las glándulas submucosas humanas [60]. Los cultivos primarios de epitelios de las vías respiratorias porcinas y humanas también muestran un transporte de electrolitos cuantitativamente similar. Estos factores son significativos, particularmente en el contexto de los modelos pulmonares

porcinos de fibrosis quística [60], permitiendo también que los datos obtenidos sean traslacionales para varias patologías presentes en el humano [78].

El sistema inmunitario de los cerdos es similar al de los humanos, además, los cerdos consanguíneos, como los *minipigs* de *Clawn*, tienen un complejo principal de histocompatibilidad genéticamente definido, lo que hace posibles estudios reproducibles de los mecanismos inmunológicos [60,74]. El fácil acceso a poblaciones de cerdos comerciales y diversas razas (naturales o seleccionadas) ofrece la oportunidad de utilizar diferentes fenotipos (y genotipos asociados) para fines de investigación específicos. Diferentes razas de producción comercial (*Large White*, *Landrace*, *Iberian* y *Duroc*) podrían ser utilizadas para estudios generales debido a su facilidad de reproducción y a que una gran variedad de líneas de cerdos transgénicos o naturalmente seleccionadas están disponibles comercialmente. En particular, los minicerdos son ampliamente utilizados como modelos biomédicos [78].

Por lo tanto, el cerdo ha llamado la atención como un valioso modelo preclínico para la investigación médica. Aunque ha habido pocos informes de las ventajas científicas de usar al cerdo como modelo, en comparación con perros y primates no humanos, éstos últimos ya están prohibidos o son demasiado costosos para la experimentación continua. Los modelos biomédicos tradicionales (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *zebra fish* y diferentes roedores) no siempre representan adecuadamente la complejidad de la fisiología humana [63]. Recientemente ha habido una creciente conciencia de las limitaciones de algunos modelos animales. La medicina traslacional exige modelos seleccionados en función de la especificidad de la enfermedad humana que se investiga [60]. El utilizar al cerdo como modelo de estudio podría aclarar más sobre la patogénesis del asma, por ejemplo, lo que condiciona que se tenga una inflamación neutrofílica o eosinofílica, en qué momento cambia el perfil de la respuesta de anticuerpos IgM o IgG a uno de IgE, y cuál es la cinética de sensibilización de la mucosa. Por otra parte, probar tratamientos nuevos para el asma, buscar elementos para el diagnóstico temprano que permitan la prevención y el control del desarrollo de la patología o incluso probar tratamientos para revertir (desensibilización) o prevenir el problema, son metas altamente deseadas que podrían investigarse en un modelo traslacional semejante en tamaño, fisiología y desarrollo al humano, como lo es el cerdo.

Antecedentes

Como se mencionó, el ratón y el cobayo han sido los modelos más utilizados para el estudio del asma, por lo que se han establecido diversas estrategias experimentales que, según el tipo de enfoque, han permitido obtener hallazgos sobre esta patología. En una investigación establecieron, en ratón, una metodología para inducir el asma, llevando a cabo un protocolo de inmunizaciones con ovoalbúmina (OVA), administrada por vía intraperitoneal e intratraqueal, con hidróxido de aluminio como inductor de la respuesta Th2 y con esto producir la hipersensibilidad tipo I. Los autores observaron infiltrados de eosinófilos en el tejido pulmonar, así como aumentos considerables de IgE alérgeno específica [73].

Otros investigadores han realizado protocolos de inmunización en otros modelos animales encontrando respuestas positivas para una hipersensibilidad de tipo I. Sensibilizaron cobayos con OVA seguidos de retos intranasales, encontrando un incremento de eosinófilos en lavado broncoalveolar de estos animales a las 24 horas, después de que se realizó el reto intranasal y esta respuesta se mantuvo hasta las 72 horas, lo cual permitió estudiar con mayor detalle la función de estas células en el asma alérgica [73,108]. En otra investigación desarrollaron un protocolo de inmunización en gatos utilizando un extracto comercial del pasto Bermuda, realizando inmunizaciones subcutáneas y retos intranasales e intratraqueales, lo que les permitió evaluar en suero y lavado broncoalveolar la presencia de anticuerpos (IgA e IgG) antígeno específicos y determinar si los niveles corresponden con el desarrollo del fenotipo de asma, además de dar en este modelo animal respuestas positivas para las pruebas de intradermorreacción, hiperreactividad bronquial y porcentajes de eosinófilos elevados [34]. Y en el 2012 otro grupo investigó la producción de IgG específica contra alérgenos individuales, proteínas y sus isoformas, en conejos inmunizados con alérgenos despigmentados de polen de *P.pratense* en donde los conejos produjeron títulos elevados y similares de IgG específica contra el extracto natural, despigmentado y despigmentado-polimerizado, así como contra los alérgenos individuales. Así mismo, reconocieron los alérgenos individuales y sus isoformas del extracto natural. Un alérgeno es una proteína modificada con el objetivo de ser utilizada en protocolos terapéuticos de desensibilización, o de inducción de tolerancia oral/sublingual [9].

En el cerdo no hay trabajos equivalentes, sin embargo, otras investigaciones [12], han estudiado alergias alimentarias en el cerdo convencional, empleando extracto crudo del maní por vía intraperitoneal y desafiando por vía gástrica. Los cerdos presentaron signos típicos de este tipo de hipersensibilidad, pruebas de intradermorreacción y de anafilaxia cutánea pasiva positivas, lo cual es característico de una hipersensibilidad tipo I. En esta investigación se purificó la IgE del cerdo para la elaboración de un antisuero de conejo anti-IgE de cerdo. Esta purificación se llevó a cabo por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad con proteína G, cromatografía de intercambio aniónico con DEAE celulosa y electroforesis con gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) para obtener la cadena pesada de IgE [11]. En otro trabajo, para obtener el anticuerpo reagínico se inmunizaron cerdos con el parásito *Ascaris summ* [11], purificando la IgE de suero por técnicas inmunoquímicas convencionales, y se aisló la cadena epsilon

usando escisión de gel SDS-PAGE y electroelución [12]. En ambos casos se obtuvieron antisueros de conejo específicos contra la IgE porcina.

En el grupo de investigación del Dr. Marco Antonio Vega López, en colaboración con el grupo del Dr. César Augusto Sandino Reyes, se ha sensibilizado a minicerdos vietnamita utilizando como antígeno un extracto alergénico del polen de *Phleum pratense* y como adyuvante el hidróxido de aluminio [23]. Las vías de administración fueron intraperitoneal y subcutánea y se realizaron retos intranasales e intratraqueales, con el objetivo de inducir una hipersensibilidad respiratoria en los cerdos. Al finalizar los retos se observaron cambios histológicos en el pulmón, así como aumentos de celularidad en BAL, con un incremento significativo en el número de eosinófilos y células cebadas activadas [26]. Adicionalmente, los cerdos sensibilizados mostraron pruebas cutáneas positivas a antígenos del polen de *Phleum pratense*, así como pruebas de anafilaxia pasiva cutánea y signos clínicos sugestivos de la patología asmática. Estos resultados sugieren que el protocolo de sensibilización empleado, así como el antígeno administrado, indujeron una respuesta de hipersensibilidad de tipo I en los cerdos [22,23], faltando la determinación de IgE alérgeno específica para corroborar esos hallazgos.

Dado que no hay una disponibilidad comercial de IgE y anticuerpos anti-IgE de cerdo, una de las tareas fue obtenerla y producir antisueros anti-IgE porcina. Uno de los inconvenientes en el aislamiento de IgE son los niveles séricos que raramente exceden 1 µg/mL, incluso en individuos alérgicos y/o parasitados. La anafilaxia de cerdos se informó por primera vez en 1963; en cerdos sensibilizados experimentalmente con OVA. La investigación de alergias en cerdos se vio comprometida por la falta de disponibilidad de IgE de cerdo y anti-IgE [37].

Utilizar al cerdo como modelo de estudio ayudaría a dilucidar algunas de las incógnitas principales del asma, por ejemplo, en la patogénesis cual es punto que define que la inflamación sea neutrofílica o eosinofílica, cual es la cinética de la respuesta humoral desde el primer contacto con el antígeno hasta el desarrollo de la sensibilización donde la respuesta de anticuerpos cambia a un perfil de IgE, como se genera la remodelación tisular, etc. Con este modelo también se podrían ensayar tratamientos nuevos para el asma y probar nuevos protocolos de desensibilización, haciendo la extrapolación posológica más sencilla porque el cerdo tiene una talla similar a la humana. Se exploraría la inducción de la patología en etapas tempranas de la vida, como ocurre en el humano, se podrían buscar moléculas para el diagnóstico temprano, etc. En conclusión, el cerdo puede ser un buen modelo debido a su similitud anatómica y fisiológica con el ser humano.

Por ello, en esta investigación se pretende continuar con la validación del modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria al *Phleum pratense*, analizando el desarrollo de la respuesta de IgE sérica y mucosal al alérgeno y comparar el patrón de reconocimiento a los alérgenos de *Phleum pratense* con la de pacientes humanos alérgicos para dilucidar la idoneidad del modelo para el estudio del asma.

Justificación

El asma alérgica es una hipersensibilidad mediada por IgE, es de importancia en salud pública porque no tiene cura y, hasta el momento, no se puede prevenir ya que se desconocen sus mecanismos desencadenantes. Los modelos animales que se han utilizado para el estudio del asma tienen limitantes que incluyen diferencias anatómicas, inmunológicas y fisiológicas entre ellos y el humano.

Con ese objeto, hemos desarrollado un modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria al polen de *Phleum pratense*, donde se han replicado algunas de las características del asma humano. Para poder evaluar el desarrollo de la producción de IgE sérica y mucosal, ante la sensibilización y la reactividad de este anticuerpo contra los antígenos de este alérgeno, fue necesario, en un primer paso, la purificación y caracterización de la IgE porcina para producir anticuerpos policlonales que permitan esa evaluación por ELISA cuantitativa y, en una segunda etapa, hacer un comparativo de reactividad de respuesta humoral porcina y la humana a los antígenos del *Phleum pratense*. Con esos resultados se validará el modelo porcino de asma para estudios traslacionales al humano.

Hipótesis

La sensibilización al polen de *Phleum pratense* en un modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria, incrementa la respuesta sérica y mucosal de IgE alérgeno específica.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la producción de IgE sérica y mucosal en respuesta al polen de *Phleum pratense* en un modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria.

Objetivos particulares

- 1.-Obtener IgE sérica de cerdos sensibilizados con un extracto proteico parasitario.
- 2.-Producir un antisuero anti-IgE de cerdo mediante la inmunización de ratones con la cadena pesada de IgE porcina.
- 3.-Establecer un ensayo cuantitativo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con la anti-IgE de cerdo.
- 4.-Evaluar el desarrollo de la respuesta de IgA, IgG e IgE sérica y mucosal contra el alérgeno *Phleum pratense* en cerdos sensibilizados y desafiados experimentalmente.
- 5.-Comparar el patrón de inmunorreactividad de la IgE alérgeno-específica del modelo porcino con la de sueros de pacientes asmáticos contra las proteínas inmunodominantes de un extracto comercial de *Phleum pratense*.

Material y Métodos

Modelo experimental

Se utilizaron 12 cerdos vietnamita (*Sus scrofa*) destetados (28 días), libres de patógenos específicos (SPF), se les proporcionó acceso *ad libitum* a alimentos y agua, manteniéndose en condiciones de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, dichos cerdos provinieron de la Unidad de Producción de Animales de Experimentación (UPEAL-CINVESTAV) y el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV-IPN.

Tratamiento con polen

Los antígenos alergénicos empleados provienen de un extracto proteico estandarizado de polen de *Phleum pratense* (*Standardized Timothy Grass*, Alk Abello Pharm 100,000 BAU/mL, Lote 0001638321), éste se administró en conjunto con hidróxido de aluminio (Alergel, suspensión, 431M98 SSA, ARLEX México, S.A. de C.V.) [22,23].

Purificación de IgE

Inducción del anticuerpo reagínico porcino con extracto de *Taenia hydatigena*

Se inmunizaron 2 cerdos vietnamita de 9 meses de edad, con un extracto proteico parasitario de *Taenia hydatigena* (proporcionado por el Dr. Fernando Alba Hurtado de la FES-Cuautitlán-UNAM, campo 4), el cual tenía una concentración de 746 µg/mL y como adyuvante hidróxido de aluminio (Alergel, suspensión, 431M98 SSA, ARLEX México, S.A. de C.V.).

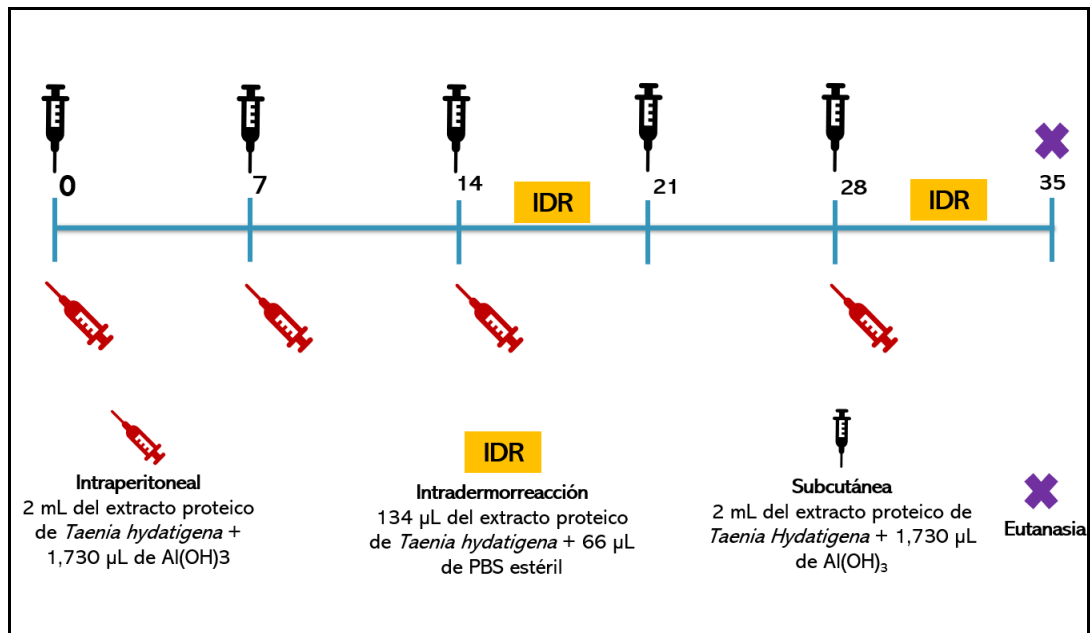


Figura 11. Esquema de inmunización para obtener nivel alto sérico de IgE porcina. El esquema constaba de 6 etapas; en las cuales se realizaron inmunizaciones subcutáneas/intraperitoneales

cada 7 días. Este esquema de inmunización tuvo como objetivo aumentar la presencia de IgE sérica y así poder purificar/obtener la inmunoglobulina porcina. IDR (intradermorreacción). PBS (*Buffer* fosfato salino).

El esquema de inmunización (Figura 11) constaba de inoculaciones por vía intraperitoneal (2 mL del extracto proteico de *Taenia hydatigena* + 1730 µL de hidróxido de aluminio) y subcutánea con la misma dosis una vez por semana. Se realizaron intradermorreacciones (ver adelante) con el extracto proteico parasitario los días 18 y 32 del protocolo de inmunización, con 134 µL del extracto proteico + 66 µL de PBS estéril, hasta verificar que los cerdos estuvieran ya sensibilizados. El experimento terminó en el día 35 con la eutanasia de los cerdos, obteniendo la sangre por una punción intracardiaca utilizando el equipo de venoclisis (Normogotero, corporativo DL, S.A. de C.V) para su recolección en tubos cónicos de 50 mL estériles.

Precipitación con sulfato de amonio

Después de obtener el suero de los cerdos inmunizados con el extracto proteico parasitario, se realizó una precipitación con sulfato de amonio con el fin de eliminar la mayor cantidad de albumina [18,20]. Se ajustó el pH a 7.8 de una solución saturada de sulfato de amonio (J.T. Baker, Lote M-37246, México), justo antes de la precipitación del suero. Con agitación constante y en baño de hielo, se agregó gota a gota un total de 25 mL de solución saturada de sulfato de amonio a una muestra de 50 mL de suero, hasta conseguir una saturación de 33% del sulfato. Una vez completada la adición del sulfato de amonio, se continuó agitando la suspensión durante 2 horas para evitar el atrapamiento mecánico de otros componentes del suero en el precipitado. Se centrifugó la solución a 4 °C durante 10 min a 1400 g (aprox 3000 rpm). El primer precipitado contiene toda la gamaglobulinas y trazas de albúmina. Se resuspendió el precipitado en suficiente agua Milli-Q para restaurar el volumen original de la muestra de suero. Se precipitó la fracción de gamaglobulinas por segunda y tercera ocasión. Se disolvió el tercer precipitado con solución amortiguadora de boratos (ver apéndice 1) hasta un volumen final de la mitad o menos de la muestra de suero original. Se eliminó el sulfato de amonio del precipitado mediante diálisis en una membrana de diálisis (Spectra/Por® 3. Spectrum™ RC Dialysis. Membrane Tubing 12,000 to 14,000 Dalton, MWCO, USA), con agua bidestilada y solución amortiguadora de boratos durante varios días a 4 °C. La diálisis se realizó en un pH ligeramente alcalino; porque la desnaturalización de las proteínas tiende a producirse en un pH < 7. Se verificó que el precipitado ya no tenía sulfato de amonio mediante la adición de cloruro de bario al 10 %, la diálisis estaba terminada si ya no existía la formación de una turbidez blanca.

Después de completar la diálisis, se retiró la solución de la membrana de diálisis. Algunos materiales insolubles se formaron durante la diálisis. La solución final fue ligeramente opalescente. Se centrifugó la solución a 4 °C durante 10 minutos a 1400 g. Se verificó la pureza del producto mediante una electroforesis de un gel de poliacrilamida al 12 %.

Columnas de afinidad

Se acoplaron anticuerpos monoclonales anti-IgM (Clona 5C9) y anti-IgA (Clona F9) porcinos a sefarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr-Activated Sepharose 4 Fast Flow GE Healthcare, Alemania.) para la elaboración de las columnas de afinidad anti-IgM y anti-IgA. Para eliminar IgG se usó una columna de proteína G (Protein G Sepharose®, Fast Flow, Alemania) acoplada a sefarosa. El precipitado de gammaglobulinas primero se pasó por la columna anti-IgG 5 veces en 5 repeticiones. Después de corroborar por ELISA y electroforesis SDS-PAGE que el precipitado ya no estaba contaminado con IgG, se pasó por las columnas de anti-IgA y anti-IgM con el mismo procedimiento (ver apéndice). El eluido final, ya sin IgG, IgA e IgM, se guardó en microtubos de centrifuga de 1.5 mL a -70 °C. Una vez evaluada la concentración de IgE se liofilizó (Liofilizador VirTis BenchTop Pro SP Scientific, Reino Unido) y se almacenó a -20 °C. Las inmunoglobulinas G, A y M retenidas en las columnas, se eluyeron después con ácido cítrico 1mM (2 mL) y se recuperaron en un *buffer* de neutralización (NaHCO₃, pH 8.3, NaCl) y se guardaron a -20C.

ELISA para evaluar la reactividad de cada isotipo (IgG, IgA e IgM)

Para verificar que ya no hubiese contaminación con las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, se evaluó el eluido obtenido después de las columnas de afinidad por medio de ensayos de ELISA isotipo específicos. Se realizó ELISA cuantitativo de tipo sándwich para cada uno de los isotipos. Se colocaron los anticuerpos de captura para IgM, IgG o IgA (Goat anti-Pig IgM Antibody Affinity Purified, # A100-117, Goat anti-Pig IgG-Fc Fragment Antibody Affinity Purified, # A100-104 y Goat anti-Pig IgA Antibody Affinity Purified, #A100-102; respectivamente, Bethyl, USA), por separado en microplacas de 96 pozos (Corning Incorporated, Non-sterile, Polystyrene, Lote 03011001, USA), con una dilución 1/500 para los tres anticuerpos, se incubó durante toda la noche con *buffer* de carbonatos. Se realizaron 5 lavados con solución general de lavado (Tris base 50 nM y NaCl 0.14 M) más tween al 0.075 %. Se bloqueó con agitación durante 2 horas a 37 °C con *buffer* de bloqueo (solución general + BSA 1 %). Se realizaron 5 lavados. Se colocó el eluido por triplicado al igual que el precipitado de gammaglobulinas (control positivo) y la curva para cada isotipo con *buffer* de dilución (solución general + tween 0.075% + BSA 1 %). La curva consta de un anticuerpo de referencia (Pig Reference Serum, # 900-338-9578, Bethyl, USA) en diluciones dobles seriadas, comenzado con el punto más concentrado para IgA de 5 ng/mL, 10 ng/mL para IgM y 100 ng/mL para IgG. Se incubaron los pozos durante toda la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos acoplados a HRP (Pig IgG-Fc Fragment Antibody, # A100-104P, Goat anti-Pig IgA Antibody HRP Conjugated #A100-102P y Goat anti-Pig IgM Antibody HRP Conjugated # A100-117P, Bethyl, USA) con diluciones 1:10,000 para IgG e IgA y 1:200,000 para IgM, durante 1 hora a 37 °C. Se adicionaron 100 µL del *buffer* de citratos pH 5.0 + TMB + 2 µL de agua oxigenada por pozo. Se detuvo la reacción adicionando 100 µL de ácido sulfúrico (2N) por pozo.

Caracterización de IgE

Western blot (anti-IgM porcina)

Dado que la IgM posee una cadena pesada del mismo peso molecular que la IgE (70 KDa), se realizó una inmunoelectrotransferencia (WB) para corroborar que no hubiera contaminación con IgM en la IgE purificada. Se realizó un gel de poliacrilamida (10 %) en donde se colocaron controles positivos (IgM recuperada de la columna de afinidad, precipitado de las gammaglobulinas y el eluido antes de la columna anti-IgM) y la IgE purificada como control negativo. El gel se tiñó con plata. Se repitió el mismo procedimiento en otro gel de poliacrilamida (10 %) que se transfirió durante dos horas a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membrane for WB |0.45 mm Pore Size # N8395 BioRad, USA). Se bloqueó la membrana durante una hora con *buffer* de bloqueo (TBST + leche de bloqueo para WB al 3 %). Se realizaron 5 lavados con TBS + tween al 0.050 % y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo anti-IgM acoplado a HRP (Goat anti-Pig IgM Antibody HRP Conjugated # A100-117P, Bethyl, USA) a 4 °C. Al siguiente día se lavó, se colocó el luminol para la quimioluminiscencia (Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific. No. Cat. 32109) y se reveló en placas de radiografía (Kodak GBX developer and replenisher Kodak. No. Cat. 190 0943, México).

SDS-PAGE nativo

Se realizó un gel de poliacrilamida al 5 % para evaluar el peso molecular de la inmunoglobulina E purificada sin desnaturalizar. En un gel de poliacrilamida se migró la IgE sin desnaturalizar durante 2 horas aproximadamente a 80 volts en una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio Rad. No de Cat. 1658001, USA). Una vez que terminó la electroforesis el gel se tiñó con nitrato de plata.

Anafilaxia pasiva cutánea

La anafilaxia pasiva cutánea se realizó para determinar si la inmunoglobulina E se mantenía funcional después de la purificación y por ende si era capaz de dar una reacción de IgE alérgeno-específica.

Se utilizaron 2 cerdos que no fueron inmunizados (cerdos blancos), los cerdos se inmovilizaron para su rasurado en la zona ventral con el fin de permitir la aplicación de las muestras a probar. Para dicha prueba se utilizó el eluido de IgE purificada, proveniente de los cerdos que fueron inmunizados con el extracto proteico parasitario de *Taenia hydatigena*. Una alícuota de cada muestra se inactivó a 56°C durante 4 horas, condición que permite saber si la respuesta está mediada por IgE, por ser un anticuerpo termosensible. Por otra parte, y bajo las mismas condiciones, se utilizó como control positivo: Suero de cerdo inmunizado con *Taenia hydatigena* y como controles negativos: PBS, muestras inactivadas por calor y un suero de un cerdo no relacionado. Después del rasurado de cada animal se procedió a aplicar con aguja hipodérmica 200 µL de cada muestra problema y controles, en diferentes puntos bien identificados y distribuidos a lo largo de la zona ventral del animal. Veinticuatro horas postaplicación se administró, vía intradérmica, en cada uno de esos sitios, 200 µL del extracto proteico parasitario, en

alrededor de 15 minutos se evaluó la respuesta, la cual se consideró positiva si se formaba un eritema y una respuesta inflamatoria evidente.

Inmunización de ratones con la IgE porcina

Después de la caracterización de la IgE porcina se procedió a la inmunización de ratones para la obtención del antisuero de ratón anti-IgE de cerdo. Se utilizaron 3 ratones, hembra, de la cepa BALB/c, de entre 6 y 8 semanas de edad. Para la inmunización se utilizaron las bandas de IgE purificada evidenciadas en geles de poliacrilamida al 10 % y teñidas con nitrato de plata (banda de 70 kDa), que se cortaron se congelaron en nitrógeno líquido y se maceraron en un mortero. El macerado se resuspendió en PBS 1x estéril y se hizo pasar por agujas de calibre descendente (18 G, 21 G, 23 G y 27 G). La dosis fue de aproximadamente 6 a 8 µg de IgE + 300 µL de PBS estéril. El protocolo de inmunización (Figura 12) consistió en 2 inmunizaciones subcutáneas seguidas de una inmunización intraperitoneal con la dosis antes mencionada y se realizó un tercer refuerzo con 3 µg de IgE + 50 µL de TiterMax (Gold Adjuvant, Sigma-Aldrich, #T2684, Alemania).

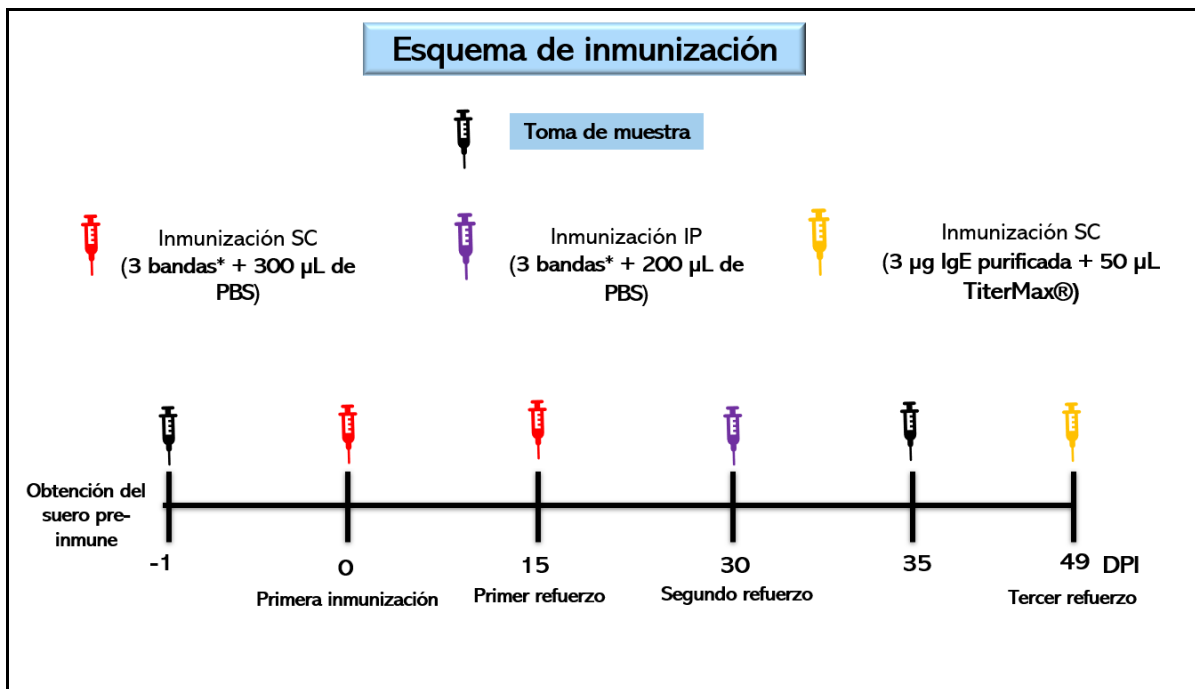


Figura 12. Esquema de inmunización para la obtención del antisuero de ratón anti-IgE de cerdo. Se hicieron inmunizaciones subcutáneas en el día 0 y 15 del protocolo y una inmunización intraperitoneal en el día 30 del protocolo. El último refuerzo fue en el día 49 con TiterMax como adyuvante. En el día -1 se tomó muestra de sangre (suero pre inmune) del protocolo de inmunización. Y en los días 35 y 54 del protocolo se tomó sangre para ver la concentración del antisuero. Para evaluar los niveles de anticuerpos específicos contra la IgE, se realizó un ensayo de ELISA con diluciones cuádruples seriadas de los sueros provenientes de los tres ratones inmunizados, así como los sueros pre-inmunes obtenidos al inicio del protocolo de inmunización.

Western blot para verificar la especificidad del suero murino anti-IgE de cerdo

Se realizó un gel de poliacrilamida (10 %) donde se migraron las inmunoglobulinas recuperadas de las columnas de afinidad (IgA, IgM e IgG) y también la IgE purificada, y el gel se tiñó con nitrato de plata. Se hicieron tres geles con las mismas características y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membrane for WB |0.45 mm Pore Size # N8395, BioRad, USA) durante dos horas en un equipo de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio Rad. No de Cat. 1658001, USA). Se bloquearon las membranas durante 1 hora con agitación. Se dejaron incubando durante toda la noche a 4 °C con los diferentes antisueros de los ratones. El ratón 1 a una dilución de 1/500 y los ratones 2 y 3 con una dilución 1/1500. Posteriormente se realizaron lavados con TBS + Tween al 0.075%. Se incubaron con un anticuerpo acoplado a HRP (HRP Goat anti-mouse IgG minimal x-reactivity BioLegend Cat 405306) a una dilución 1/1500 durante una hora y media.

Se realizaron 5 lavados de 1 minuto cada uno con TBS + Tween al 0.075%, y se procedió a revelar por quimioluminiscencia con luminol (Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific. No. Cat. 32109, USA) y exponiendo en placas de radiografías (Kodak GBX developer and replenisher Kodak. No. Cat. 190 0943, México).

Estandarización del ELISA cuantitativo anti-IgE de cerdo

Para la estandarización se realizó el siguiente esquema para las muestras problema y las curvas de concentración (Figura 13). Se determinaron las condiciones óptimas del ensayo las cuales fueron: Evaluar la concentración óptima de recubrimiento del polen de *Phleum pratense* desde 5 µg/pozo, 2 µg/pozo, 1 µg/pozo, 500 ng/pozo, 200 ng/pozo y 100 ng/pozo y se evaluaron las diferencias significativas entre ellas (Graphpad prism version 8.0.1) para poder seleccionar la concentración de Ag adecuada mediante la diferencia significativa. También se evaluó la dilución óptima de la muestra problema, donde se hicieron diluciones dobles seriadas de los sueros de los cerdos sensibilizados con *Phleum pratense*, comenzando en 1/150 con dos sueros positivos al polen de *Phelum pratense* y uno negativo de los días 49 y 56 del protocolo de inmunización de los cerdos con el extracto del polen de *Phleum pratense*, se graficaron las densidades ópticas y se observó en donde había mayor diferencia entre los sueros positivos y el negativo. Se realizó el mismo procedimiento para las muestras de suero de los cerdos sensibilizados de los días 0 y 14 comenzando con una dilución 1/5 y para el día 28 en 1/50. Para la precisión intra e interensayo se hicieron 3 réplicas de cada uno de los cerdos y se obtuvieron los coeficientes de variación con la desviación estándar entre el promedio por 100 (Microsoft® Office Excel versión 2018). Para las pruebas de precisión intraensayo se realizaron el mismo día y para las interensayo fueron en días diferentes [91,92,96].

Para la curva del ELISA se realizó un análisis de correlación (Microsoft® Office Excel versión 2018) entre la IgE del laboratorio y la IgE comercial, también se evaluó la linealidad de la curva con el coeficiente de correlación y el rango de densidades ópticas (Microsoft® Office Excel versión 2018). El límite de cuantificación se obtuvo con el promedio del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco entre la pendiente obtenida del análisis de regresión. Y el límite de detección se determinó con el promedio

del blanco más 3 veces la desviación estándar del blanco entre la pendiente obtenida del análisis de regresión de acuerdo con los protocolos de estandarización de ELISA ya reportados [62,85,86].

Para la curva de concentración se realizaron diluciones dobles seriadas de la IgE purificada comenzado con una concentración de 10 ng/mL.

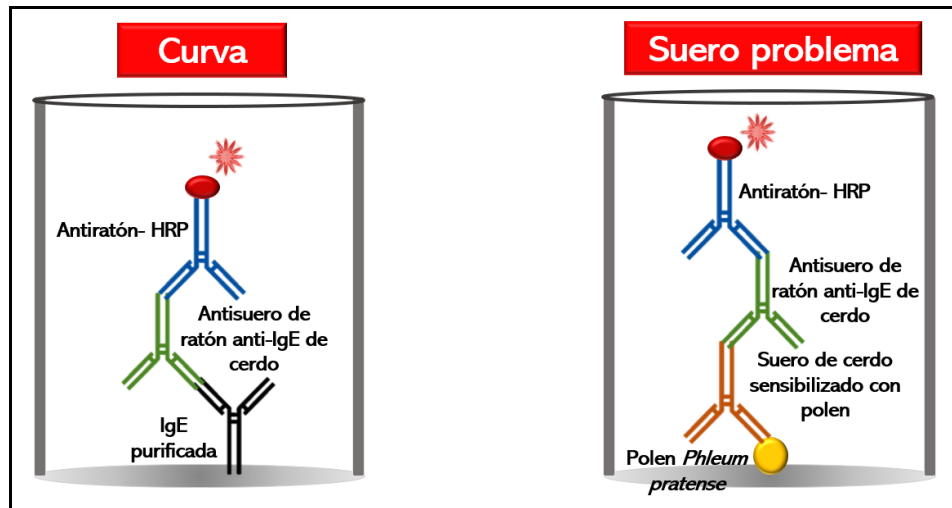


Figura 13. Esquema representativo de la curva y la muestra problema utilizadas en la estandarización del ELISA anti-IgE de cerdo. En la curva se cubrió el pozo con la IgE purificada en diluciones seriadas donde el punto más concentrado fue 10 ng/mL. Y para las muestras los pozos se cubrieron con la concentración de 100 ng del polen de *Phleum pratense*.

ELISA IgE alérgeno- específica

Para evaluar la respuesta de IgE sérica se utilizaron las muestras de suero de los cerdos control (número de arete 33,34,35,39 y 40) y experimentales (30,31,32,36 y 37) de los días 0,14, 28, 49 y 56 del protocolo de sensibilización. Y para evaluar la respuesta de IgE en mucosa fueron las muestras de saliva y moco nasal de los días 49 y 56 del protocolo.

Se utilizaron microplacas de 96 pozos donde se colocaron las muestras individuales de cada cerdo, los blancos (curva y muestra) y la curva (Figura 14). Se recubrieron los pozos para las muestras y el blanco de la muestra con el extracto proteico del polen de *Phleum pratense* (*Standardized Timothy Grass*, Alk Abello Pharm 100,000 BAU/mL, Lote 0001638321) a una concentración de 100 ng/pozo con *buffer* de carbonatos pH 9.6. También se recubrió la curva y el blanco de ésta con la IgE purificada con diluciones dobles seriadas (8 diluciones), comenzando a una concentración de 10 ng/mL y se incubó la placa durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día se realizaron 20 lavados con solución general (Tris base 50 mM y NaCl 0.14 M) más tween al 0.075%. Se bloquearon las placas con *buffer* de bloqueo (solución general + BSA 1 %) durante 2 horas a 37 °C en agitación. Después de lavar la placa se colocaron las muestras de mucosa y/o suero con

diluciones dobles seriadas para las muestras de los días 49 y 56 del protocolo de inmunización con el polen de *Phleum pratense* comenzando con una dilución 1/500; para el día 28 del protocolo con una dilución 1/50 y para los días 0 y 14 con una dilución 1/5. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas y se incubó con el antisuero del ratón anti-IgE de cerdo en una dilución 1/500 durante 2 horas a 37 °C con agitación. Se hicieron lavados y se dejó incubar con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP a una dilución 1/1500 (HRP Goat anti-mouse IgG minimal x-reactivity BioLegend Cat 405306, USA) durante una hora y media a 37 °C con agitación. Después de lavar las placas se adicionaron 100 µL del *buffer* de citratos pH 5.0 + TMB + 2 µL de agua oxigenada por pozo. Se detuvo la reacción cuando el punto más concentrado de la curva alcanzó una absorbancia de 0.400 o 0.500 nm a 620 nm adicionando 100 µL por pozo de ácido sulfúrico (2N).

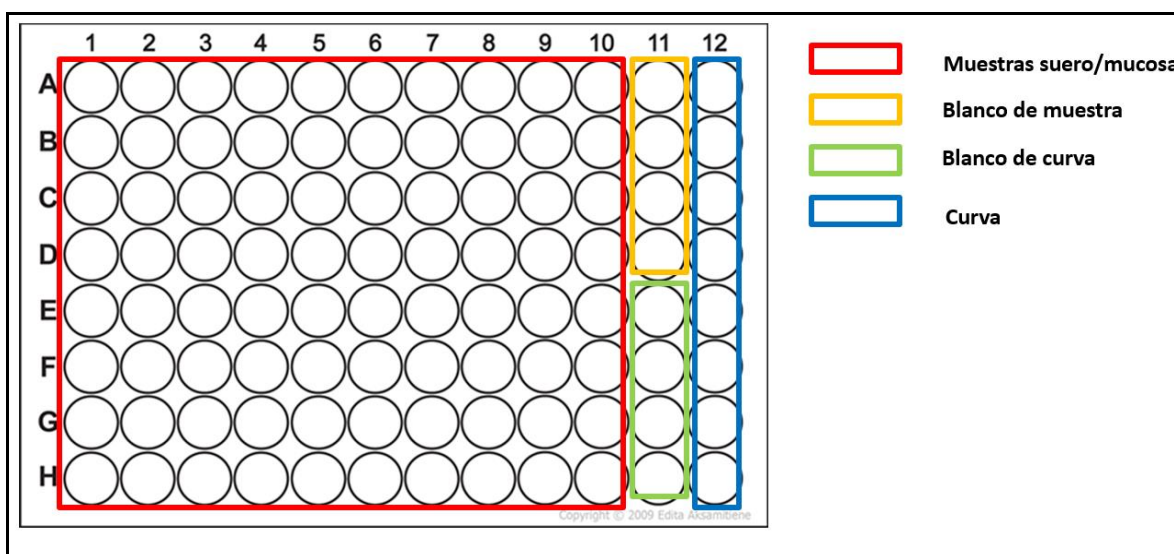


Figura 14. Esquema representativo del diseño para el ELISA IgE alérgeno-específica. Se realizaron 4 repeticiones de los blancos (curva y muestra). Para la curva se hicieron diluciones dobles seriadas, el punto más concentrado fue de 10 ng/mL y el más bajo fue de 0.078 ng/mL.

Comparación de la reactividad de anticuerpo IgE, obtenida del suero porcino y pacientes asmáticos, frente a proteínas inmunogénicas de *Phleum pratense* por el método de *Western blot*

Se fraccionaron 10 µg del extracto proteico comercial del polen de *Phleum pratense* en un gel de poliacrilamida al 10% y se tiñó con azul de coomassie. Se realizó otro gel usando el peine sin divisiones y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membrane for WB, 0.45 mm Pore Size # N8395, BioRad, USA) durante dos horas. Se incubó la membrana durante toda la noche a 4 °C con los diferentes sueros del día 56 de los cerdos sensibilizados y los sueros de los pacientes asmáticos provenientes de un protocolo de prevalencia multicéntrico, INER, Hospital Juárez y Centro Médico SXXI a una

dilución de 1/20. (Ver tabla del anexo) Posteriormente se realizaron lavados con TBS + tween al 0.075%. Se incubaron con el anticuerpo de ratón anti-IgE de cerdo en una dilución 1/500 para las membranas de los sueros porcinos y con el anticuerpo de ratón anti-IgE de humano en una dilución 1/4000 para las membranas de pacientes asmáticos (monoclonal Anti-Human IgE antibody produced in mouse, SIGMA I6510) durante dos horas a 37 °C con agitación. Se realizaron 5 lavados de 1 minuto cada uno con TBS + tween al 0.075% y se incubaron todas las membranas con anticuerpo anti- IgG de ratón acoplado a HRP (HRP Goat anti-mouse IgG minimal x-reactivity BioLegend Cat 405306) a una dilución 1/1500 durante una hora y media.

Se realizaron 5 lavados de 1 minuto cada uno con TBS + Tween al 0.075%, y se reveló por quimioluminiscencia con luminol (Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific. No. Cat. 32109) en placas para radiografía (Kodak GBX developer and replenisher Kodak. No. Cat. 190 0943, México).

Resultados

Columnas de afinidad

Se evaluó la eliminación de cada isotipo (IgG, IgM e IgA) de anticuerpos del precipitado de gammaglobulinas cualitativa (SDS-PAGE) y cuantitativamente (ELISA). Al pasar el precipitado 3 veces (cada vez constaba de 5 repeticiones) por la columna de proteína G se logró eliminar la IgG del precipitado ya que no se observó la banda de la cadena pesada de IgG de 55 kDa (Figura 15A) en el PAGE y eso se corroboró por ELISA (Figura 15B), donde se evaluaron el precipitado de gammaglobulinas y los eluidos de la columna. Después de comprobar que el eluido no tuviera IgG se pasó por la columna de anti-IgA; evaluando por PAGE (Figura 16A) y por el ELISA (Figura 16B). Por último, el eluido se pasó por la columna de anti-IgM, evaluando de la misma manera la reactividad de la inmunoglobulina (Figuras 17A y 17B).

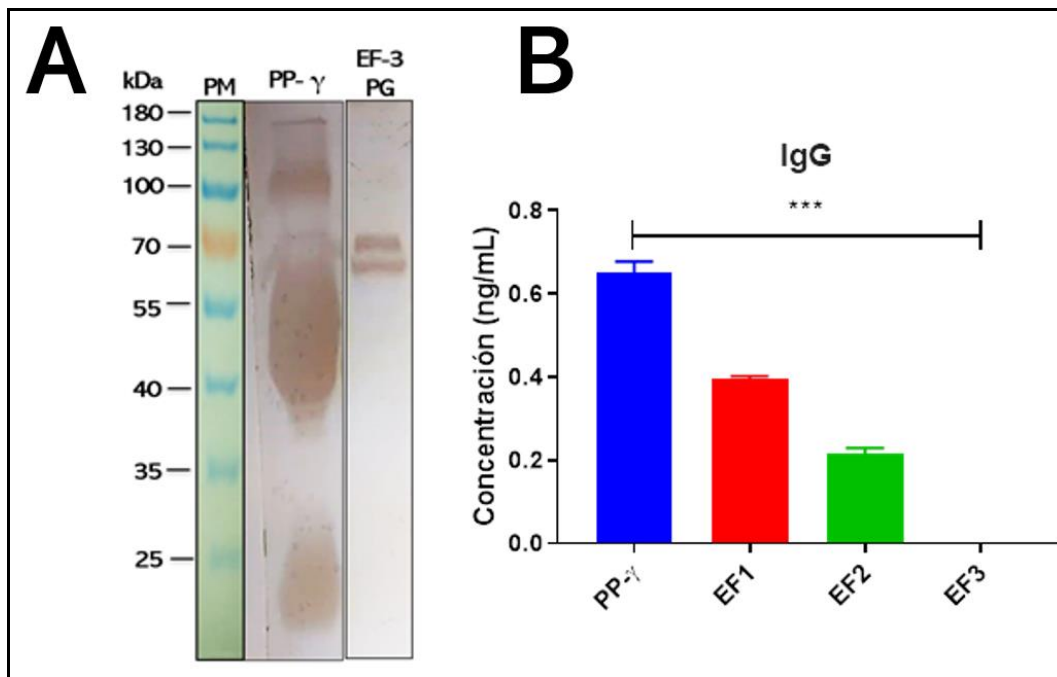


Figura 15. Inmunorreactividad de IgG después del paso por la columna de proteína G. A) Se realizó un gel de poliacrilamida (10 %) para la evaluación de la presencia de IgG después de pasar el precipitado de gammaglobulinas por de la columna de proteína G. Se migró el precipitado de gammaglobulinas original (PP-γ) y el eluido después del paso por la columna (EF-3 PG). Solamente se observó la banda que corresponde a IgA (60 kDa) y en este ensayo todavía había la presencia de IgM e IgE (70 kDa). B) Se realizó un ELISA para el isotipo IgG en el precipitado de gammaglobulinas (PP-γ), la primera vez después del paso por la columna (EF1) de proteína G, la segunda vez (EF2) y la tercera vez (EF3). Después de la tercera vez ya no se presentó contaminación con la inmunoglobulina G. Prueba t de Student, ***P<0.001.

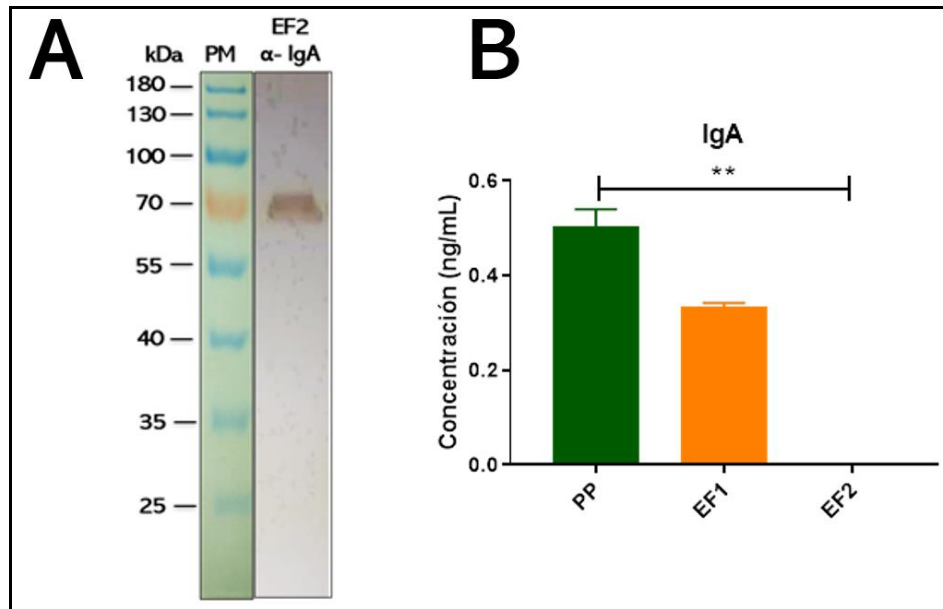


Figura 16. Inmunorreactividad de IgA después del paso por la columna de afinidad anti-IgA.

A) Se realizó un gel de poliacrilamida (10 %) para la evaluación de la presencia de IgA después de pasar el precipitado de gamaglobulinas por la columna de afinidad. Se migró el segundo eluido (EF2 α -IgA) después de la columna. Solamente se observó la banda que corresponde a IgM e IgE (70 kDa). B) Se realizó un ELISA para el isotipo IgA para el precipitado de gammablobulinas (PP- γ), la primera vez por la columna (EF1), la segunda vez (EF2). Después de la segunda vez por la columna ya no se presentó contaminación con la inmunoglobulina A. Prueba t de Student, ** $P < 0.01$.

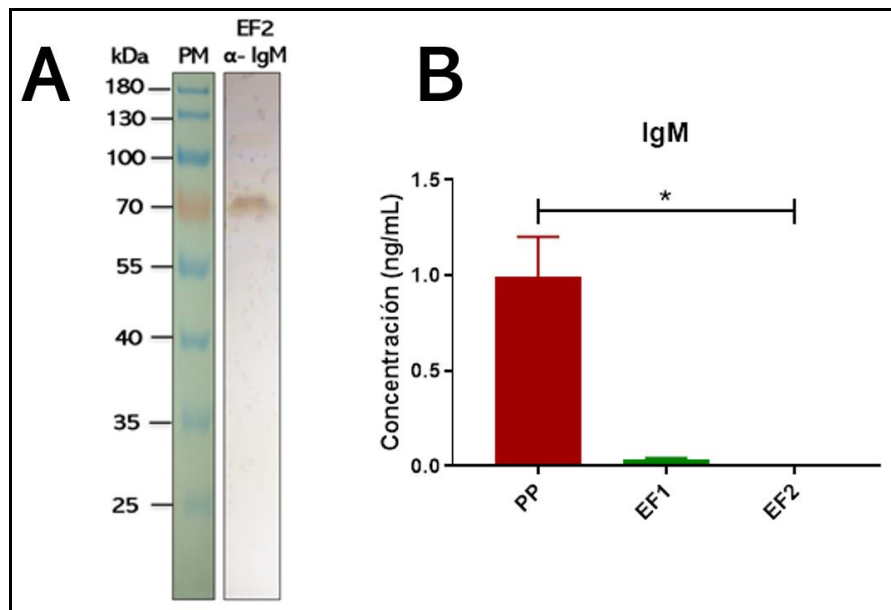


Figura 17. Inmunorreactividad de IgM después del paso por la columna de afinidad anti-IgM.

A) Se realizó un gel de poliacrilamida (10 %) para la evaluación de la presencia de IgM después de

pasar el precipitado de gammaglobulinas por la columna de afinidad. Se migró el segundo eluido (EF α -IgM) después de la columna. Solamente se observó la banda que corresponde a IgE (70 kDa). B) Se realizó ELISA para el isotipo IgM para el precipitado de gammablobulinas (PP- γ), el primero (EF1) y el segundo paso por la columna (EF2). Después de la segunda vez por la columna ya no se presentó contaminación con la inmunoglobulina M. Prueba t de Student, *P<0.05.

Western blot para la reactividad de IgM

En un gel de poliacrilamida (10 %) se migró la IgM recuperada de la columna, el precipitado de gammablobulinas y un eluido antes de la columna de anti-IgM y la IgE purificada. El gel se tiñó con plata (Figura 18A) y otro gel paralelo se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Figura 18B). En el gel teñido con nitrato de plata se observó la banda de 70 kDa en el carril de IgM, en el eluido antes de la columna de anti-IgM (EF2-PG) y la IgE purificada. En el *Western blot* se observó la misma banda (70 kDa) en la IgM, en el eluido antes de la columna y en el precipitado de gammaglobulinas, excepto en la IgE purificada, lo que indicó que la banda que se observó en el gel teñido (Figura 18A) en el carril de la IgE, efectivamente era la inmunoglobulina E.

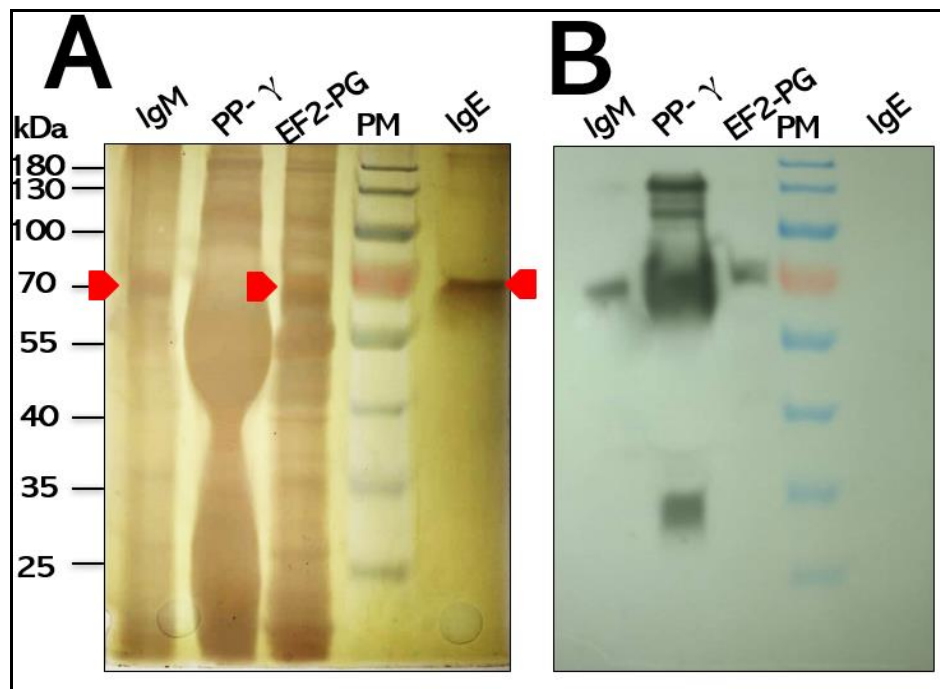


Figura 18. SDS-PAGE y *Western blot* para caracterización de IgE. A) En el gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata se observó la banda de 70 kDa en la IgE purificada mientras que en el *Western blot* (B), en el carril de la IgE no se observó ninguna inmunorreactividad con el anticuerpo anti-IgM.

Gel nativo de la IgE

Se realizó un gel de poliacrilamida (5 %) donde se migró la IgE sin desnaturalizar (Figura 19), se observó la banda que corresponde al peso total de la inmunoglobulina (190 kDa).

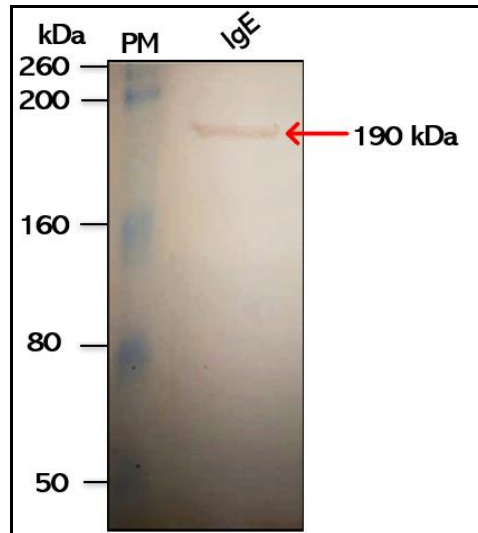


Figura 19. Gel nativo de la IgE. SDS-PAGE teñido con plata donde se migró la IgE sin desnaturalizar (190 kDa).

Anafilaxia pasiva cutánea

Se realizó una prueba de anafilaxia pasiva cutánea con la IgE purificada, dando una respuesta positiva por la presencia del eritema e inflamación en la IgE purificada y en el suero anti *Taenia hydatigena*, lo que indicó que la IgE seguía activa y que se trató de una respuesta de IgE alérgeno-específica (Figura 20A). Se observaron respuestas negativas en las muestras inactivadas por calor, en el PBS y en el suero no relacionado (Figura 20B).

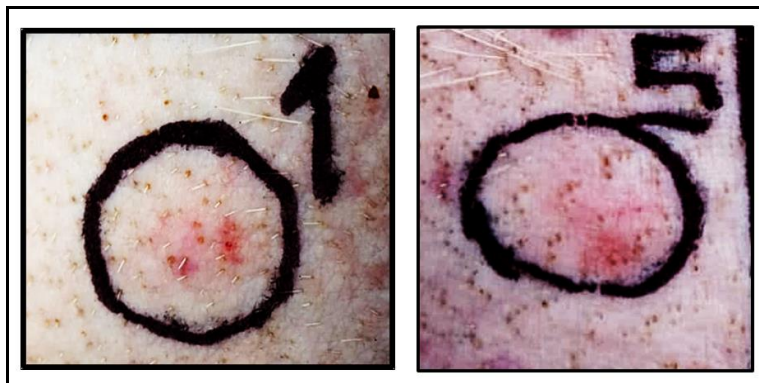


Figura 20A. Anafilaxia pasiva cutánea. Se colocaron las muestras del suero de un cerdo sensibilizado con el extracto proteico de *Taenia hydatigena* (1) y la IgE sin inactivar (5). Después

de 24 horas de haber inoculado las muestras por vía intradérmica, se colocó el extracto parasitario de *Taenia hydatigena*. Después de 15 minutos se observó una respuesta positiva en ambos.



Figura 20B. Anafilaxia pasiva cutánea. Se colocaron las muestras del suero de *Taenia hydatigena* (2), PBS estéril (3), la IgE inactivada por calor (4) y un suero no relacionado (6). Después de 24 horas de haber inoculado las muestras por vía intradérmica, se colocó el extracto parasitario de *Taenia hydatigena*. Después de 15 minutos se observó una respuesta negativa en los cuatro sitios.

Determinación de la dilución óptima del antisuero de ratón anti-IgE de cerdo

Se hicieron diluciones cuádruples seriadas de los antisueros de los tres ratones anti-IgE de cerdo y del suero preinmune en una prueba de ELISA semicuantitativa. Los sueros de los ratones 2 y 3 presentaron una absorbancia ligeramente menor a 2.0 a una dilución de 1/6400 y el ratón 3 una absorbancia de uno a la dilución 1/400. Ambas diluciones fueron mayores que la absorbancia del suero preinmune (Figura 21).

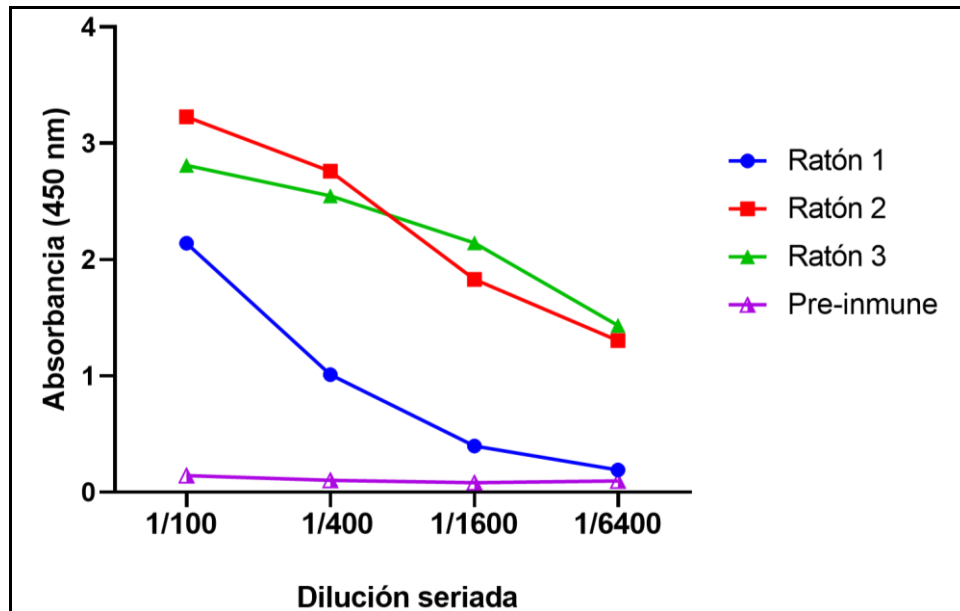


Figura 21. Diluciones de los antisueros de ratón anti-IgE porcina. Los antisueros de los ratones 2 y 3 (líneas roja y verde, respectivamente) fueron los que dieron una positividad, mientras que el ratón 1 una dilución menor (línea azul). Suero preinmune (línea morada).

Western blot especificidad del antisuero de ratón anti-IgE de cerdo

Se realizaron inmunoelectrotransferencias (WB) para evaluar la especificidad de cada uno de los antisueros de los ratones anti-IgE porcina. En un gel de poliácridamida (10 %) se migraron las inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG e IgE) porcinas y se tiñó con nitrato de plata (Figura 22A). Se transfirieron otros geles espejo de policarilamida al 10 % con esas inmunoglobulinas a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con cada uno de los antisueros de los ratones (ratón 1, 2 y 3), donde los ratones 1 y 3 reconocieron únicamente la banda de 70 kDa de la IgE, que corresponde a su cadena pesada (Figura 22B). El ratón número 2 reconoció a la cadena pesada de IgA (60 kDa), la cadena pesada de IgM (70 kDa) y la cadena pesada de IgE (70 kDa).

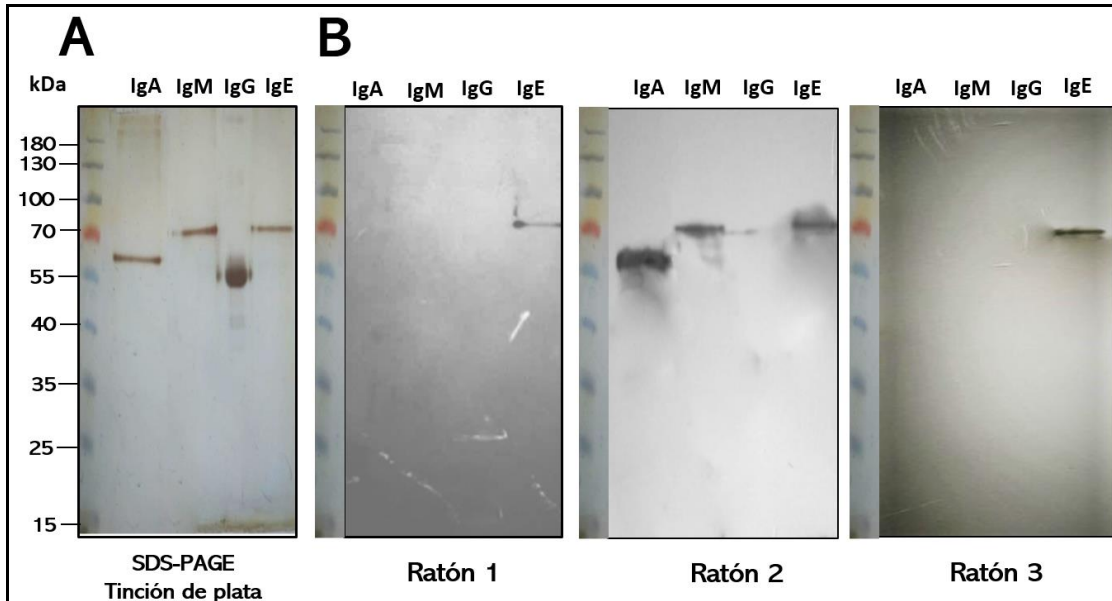


Figura 22. Western blot de la especificidad de los antisueros de ratón anti-IgE porcina. SDS-PAGE teñido con plata (A) y los *Western blot* correspondientes a cada uno de los ratones (B). Los ratones 1 y 3 reconocieron únicamente la banda de 70 kDa de la IgE.

Estandarización del ELISA anti-IgE porcina

Se realizó un análisis de regresión lineal entre la IgE purificada y la IgE comercial (Figura 23) el cual dio un coeficiente de correlación (R^2) de 0.96, muy cercano a 1. Lo que indicó que las absorbancias de la IgE purificada se interpolaron bien con las de la IgE comercial.

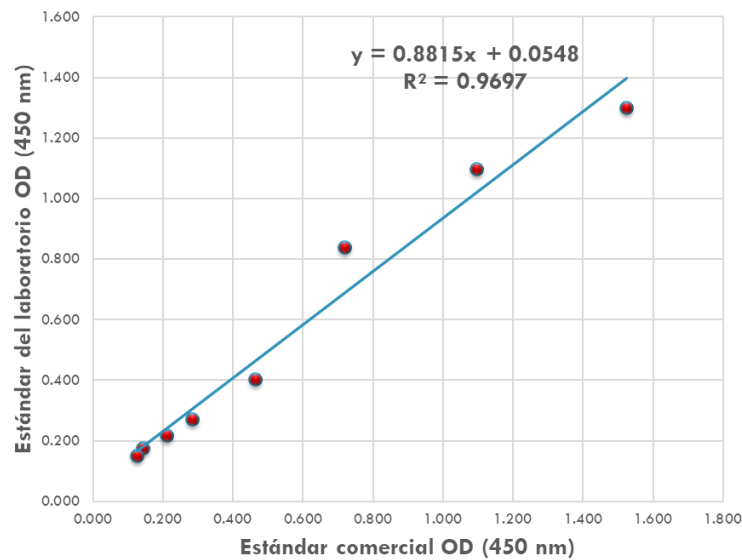


Figura 23. Análisis de regresión lineal del estándar comercial vs estándar del laboratorio. Se utilizaron concentraciones de 10 ng/mL (punto más concentrado de la curva), 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.312 ng/mL, 0.156 ng/mL, 0.078 ng/mL y 0.039 ng/mL.

También se evaluó la linealidad de las curvas de calibración del ELISA para IgE (Tabla 4) donde todas tuvieron una R^2 superior a 0.92. El rango de densidades ópticas estuvo entre 0.048 y 1.485, a un tiempo de lectura no mayor a 7 minutos. Y por último se evaluó el límite de detección el cual fue 0.0441 ng/mL y el límite de cuantificación 0.1469 ng/mL.

Tabla 3. Linealidad de la curva

Ensayo (curva)	R^2	Rango de OD del estándar del laboratorio
1	0.95	0.088-1.354
2	0.96	0.050-1.198
3	0.98	0.048-1.311
4	0.95	0.148-1.288
5	0.97	0.071-1.052
6	0.96	0.151-1.299
7	0.92	0.195-1.293
8	0.95	0.117-1.485
10	0.97	0.054-1.202
11	0.96	0.146-1.412

Se evaluó la concentración óptima de recubrimiento de los pozos con el extracto de polen de *Phleum pratense* y se optó por utilizar la de 100 ng/pozo, ya que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de 5000 ng/pozo, 2000 ng/pozo, 1000 ng/pozo, 500 ng/pozo, 200 ng/pozo y 100 ng/pozo con el suero positivo. Con esa concentración se utilizó menos reactivo; además, al utilizar menos reactivo para el recubrimiento, da menos fondo (Figura 24), según lo reportado en la literatura [62].

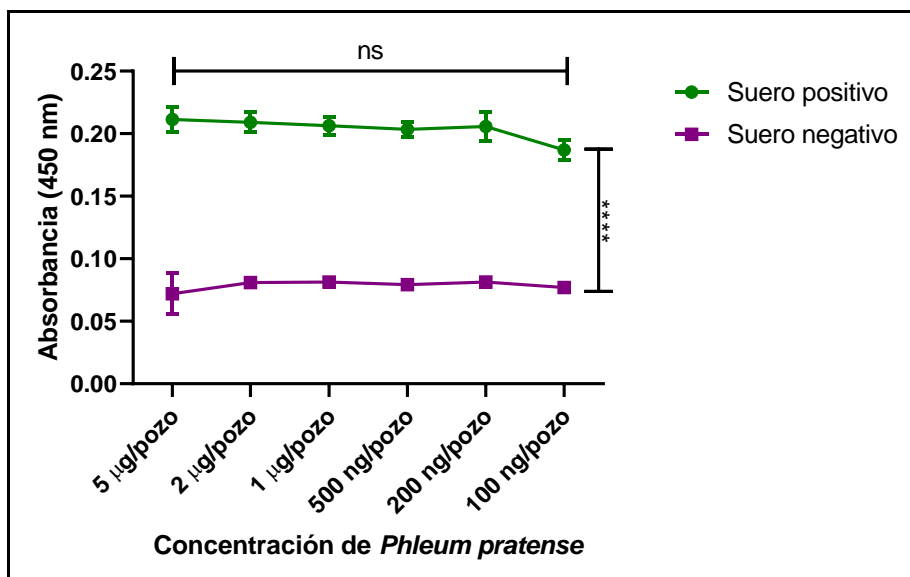


Figura 24. Concentración óptima de recubrimiento de los pozos con el alérgeno. Se utilizó un suero positivo y uno negativo para evaluar la concentración para el recubrimiento. Se emplearon varias concentraciones del polen de *Phleum pratense* desde 5 µg/pozo hasta 100 ng/pozo. Cada símbolo representa la media (\pm SEM) de las absorbancias (450 nm) en sueros positivos de 3 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros. No se observó una diferencia significativa entre las concentraciones (ns) pero si entre el suero positivo y el negativo. **** P< 0.0001.

También se evaluó la precisión intraensayo e interensayo. El mayor coeficiente de variación para la precisión intraensayo (Tabla 5) fue de 7.40 % y la literatura [85,86] menciona que debe ser menor al 10 % y para el interensayo (Tabla 5) fue de 9.30 % y debe ser menor al 15 % [86].

Tabla 4. Precisión intraensayo

Cerdo (#)	Réplica 1 (ng/mL)	Réplica 2 (ng/mL)	Réplica 3 (ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Desviación estándar	Coficiente de variación
32	8547.59	8016.46	7895.13	8153.06	347.019757	4.26%
37	4567.77	3946.86	4184.14	4232.92	313.313536	7.40%
39	1324.32	1427.11	1358.20	1369.87	52.3790779	3.82%
40	1529.89	1449.75	1408.64	1462.76	61.6649273	4.22%

Tabla 5. Precisión interensayo.

Cerdo (#)	Placa 1 (ng/mL)	Placa 2 (ng/mL)	Placa 3 (ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
30	2301.80	2310.13	2258.56	2290.16	27.684	1.21%
31	2914.45	2897.47	2798.16	2870.03	62.814	2.19%
36	2362.32	2274.84	2347.18	2328.12	46.752	2.01%
33	1402.59	1188.72	1209.90	1267.07	117.841	9.30%
35	1384.06	1416.08	1324.32	1374.82	46.572	3.39%

Por último, se evaluó la dilución adecuada para la muestra de suero; donde se utilizaron dos sueros positivos y uno negativo en diluciones dobles seriadas y se observó donde existía mayor diferencia a entre los sueros positivos y el negativo. La dilución que se utilizó fue la de 1/500 para los sueros de los días 49 y 56 del protocolo (Figura 25). Para los sueros de los días 0 y 14 una dilución 1/5 y para el día 28 una de 1/50.

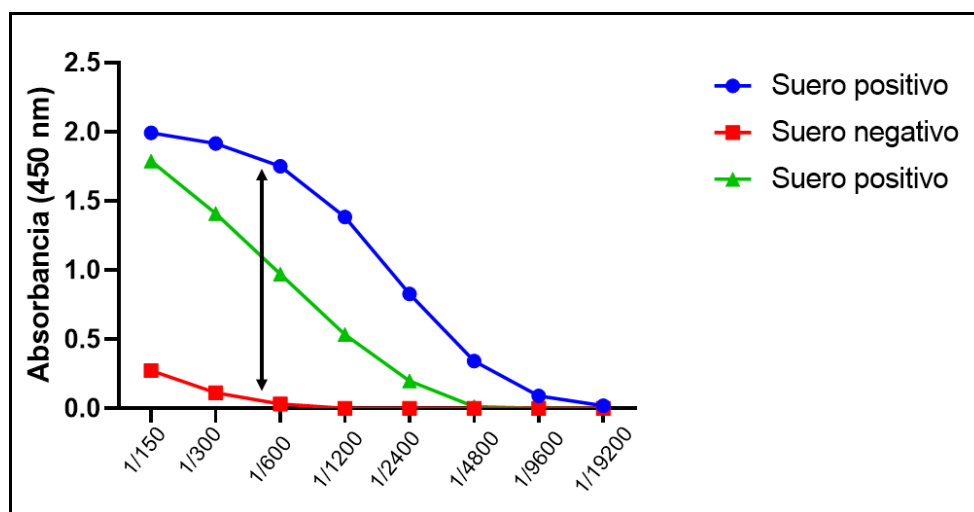


Figura 25. Dilución óptima para las muestras séricas. Se realizaron diluciones dobles seriadas entre los sueros positivos y el negativo; donde se observó la mayor discrepancia entes las absorbancias en la dilución 1:500 para los días 49 y 54 del protocolo de sensibilización.

ELISA IgE alérgeno - específica

Se realizo un ELISA cuantitativo indirecto con las muestras de suero de los cerdos sensibilizados y cerdos control (Figura 26). La respuesta de IgE alérgeno–específica se

detectó a partir del día 28 del protocolo de inmunización, dando una diferencia significativa en entre el día 49 y 56 del protocolo de inmunización, lo que sugiere que la producción de la inmunoglobulina E iba en aumento con una concentración de 7 µg/mL. El grupo control, que solamente se inmunizó con el adyuvante (hidróxido de aluminio), dio una respuesta de IgE específica, pero esto ocurrió después de las intradermorreacciones de los días 43 y 50 del protocolo de sensibilización.

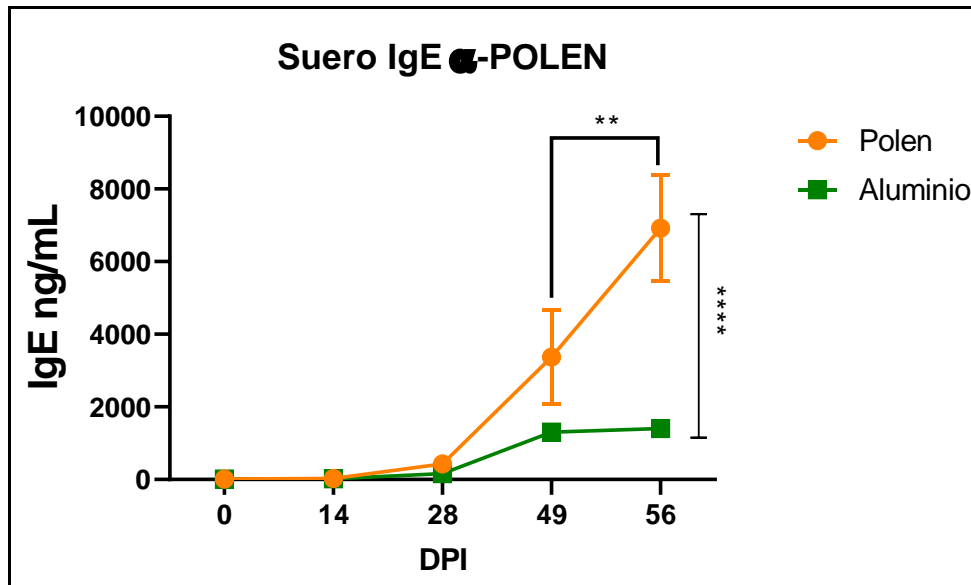


Figura 26. ELISA IgE alérgeno – específica de *Phleum pratense* en suero. Se utilizaron las muestras de los días 0, 14, 28, 49 y 56 del protocolo de inmunización para evaluar la respuesta de IgE específica en el suero. Se encontró una diferencia significativa entre los días 49 y 56 del protocolo de inmunización en el grupo experimental, y entre el grupo experimental y el grupo control. Cada símbolo representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros, ** $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

En las muestras de mucosas (saliva y moco nasal), no se encontró producción de IgE específica, ya que no hubo una diferencia significativa entre el grupo experimental y el grupo control en los días 49 y 56 del protocolo de inmunización (Figuras 27 y 28).

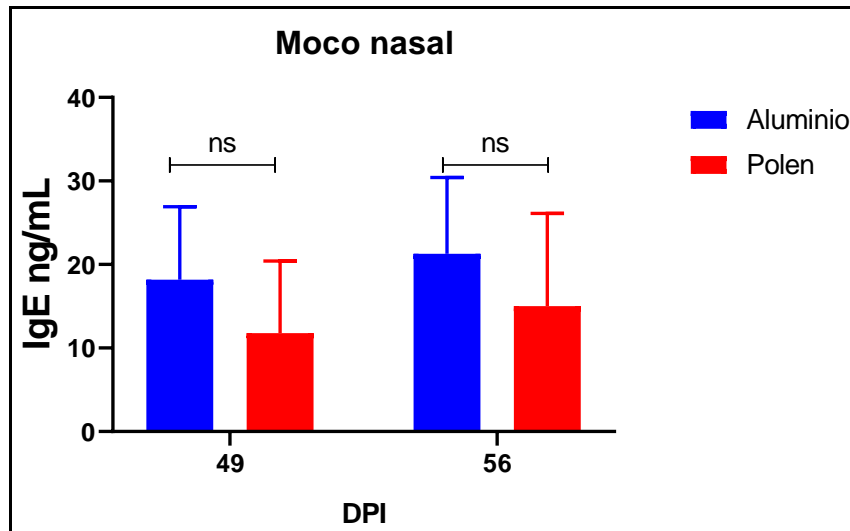


Figura 27. ELISA IgE alérgeno – específica de *Phleum pratense* en moco nasal. No se observó diferencia significativa (ns) entre el grupo experimental y el grupo control ni en el día 49 ni en el 56 del protocolo de inmunización. Cada barra representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de 5 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, cuantificado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros.

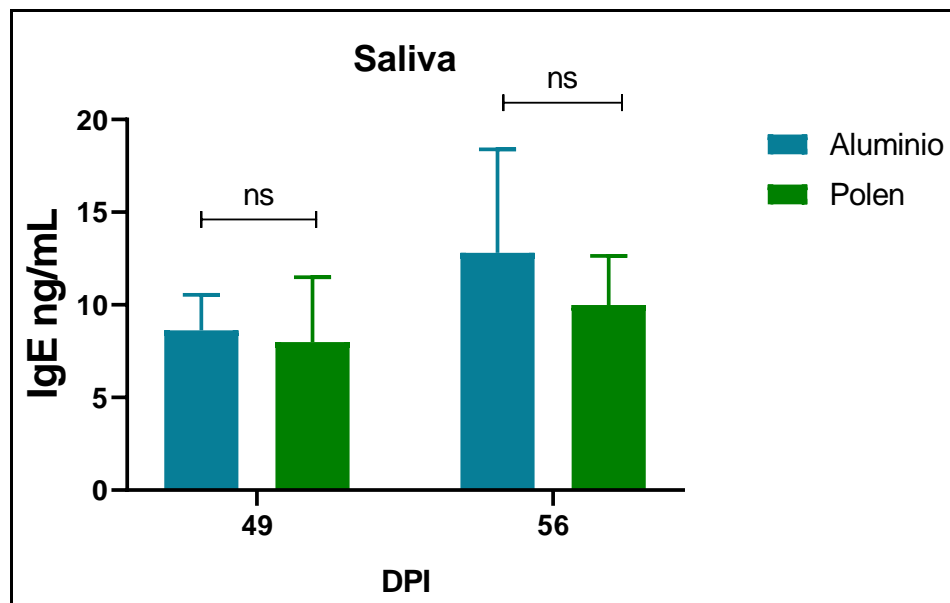


Figura 28. ELISA IgE alérgeno – específica *Phleum pratense* en saliva. No se observó una diferencia significativa (ns) entre el grupo experimental y el grupo control ni en el día 49 ni en el 56 del protocolo de inmunización. Cada barra representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen *Phleum pratense*, cuantificado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros.

Se realizó la evaluación de IgG e IgA alérgeno - específicas en suero; donde se observó que la producción comenzó en el día 28 del protocolo de inmunización, pero la concentración llegó a una meseta del día 49 al 56. Mientras que la IgE específica siguió en aumento.

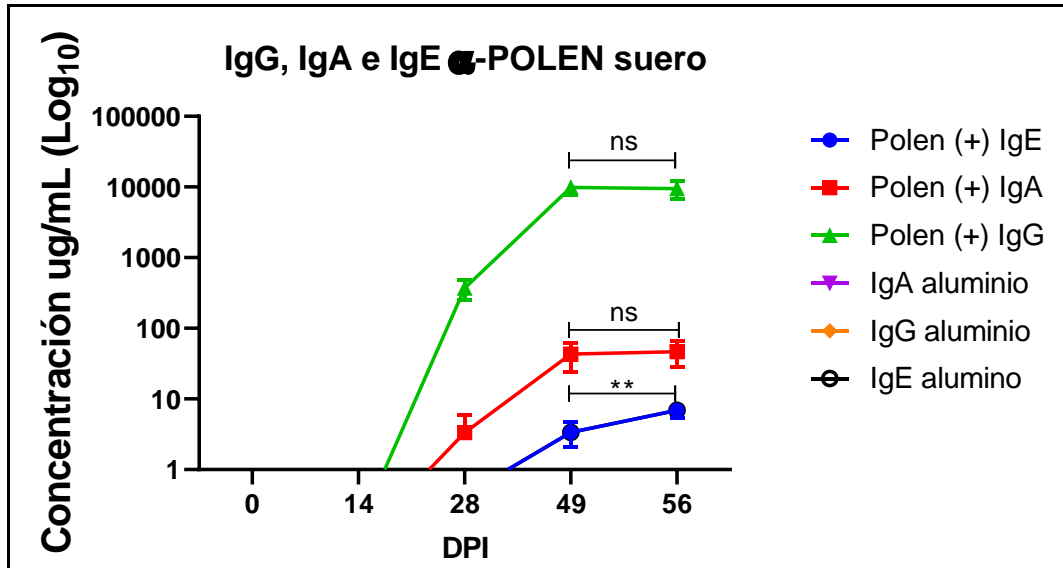


Figura 29. IgG, IgA e IgE alérgeno - específica de *Phleum pratense* en suero. No hubo diferencia significativa (ns) entre los días 49 y 56 del protocolo de inmunización para IgA e IgG específicas. Pero existió una diferencia significativa para IgE específica entre los días 49 y 56 del protocolo. Cada símbolo representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros, ** P < 0.01.

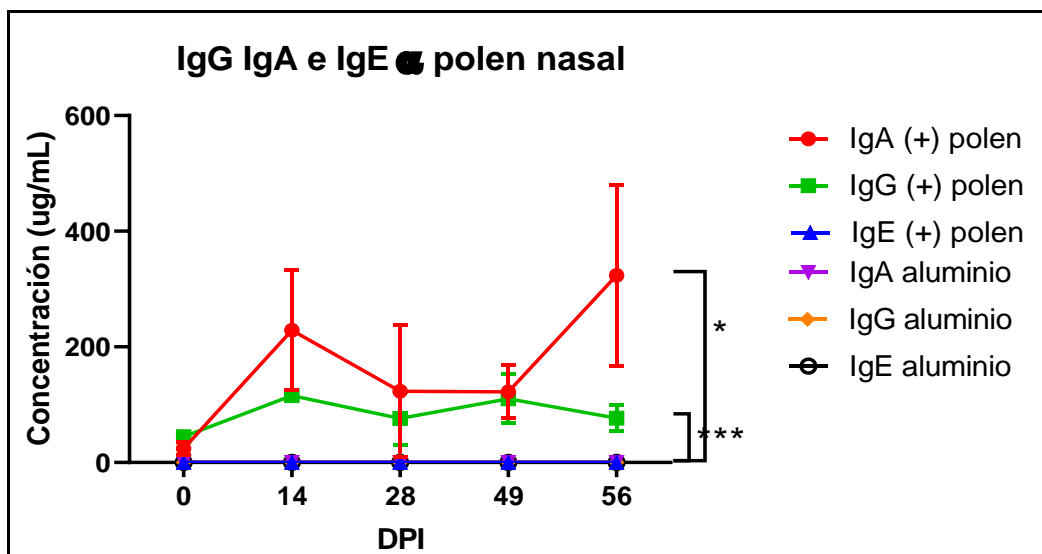


Figura 30. IgG, IgA e IgE alérgeno – específica de *Phleum pratense* en moco nasal. Existió una diferencia significativa entre el grupo control y el experimental para IgA e IgG específicas, pero no entre IgA e IgG experimentales. La IgE no se detectó en las muestras a ninguno de los tiempos. Cada símbolo representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba de ANOVA de dos factores para detectar diferencias en los sueros, * P< 0.05, *** P< 0.001.

Se evaluó la producción de IgG e IgA específicas en mucosas. Siendo la predominante IgA tanto en moco nasal como en saliva con una concentración promedio de 164 μ g/mL (Figura 30) para moco nasal y de 129 μ g/mL para saliva (Figura 31). Mientras que la IgG específica en moco nasal tuvo una concentración de 85 μ g/mL (Figura 30) y en saliva 112 μ g/mL (Figura 31).

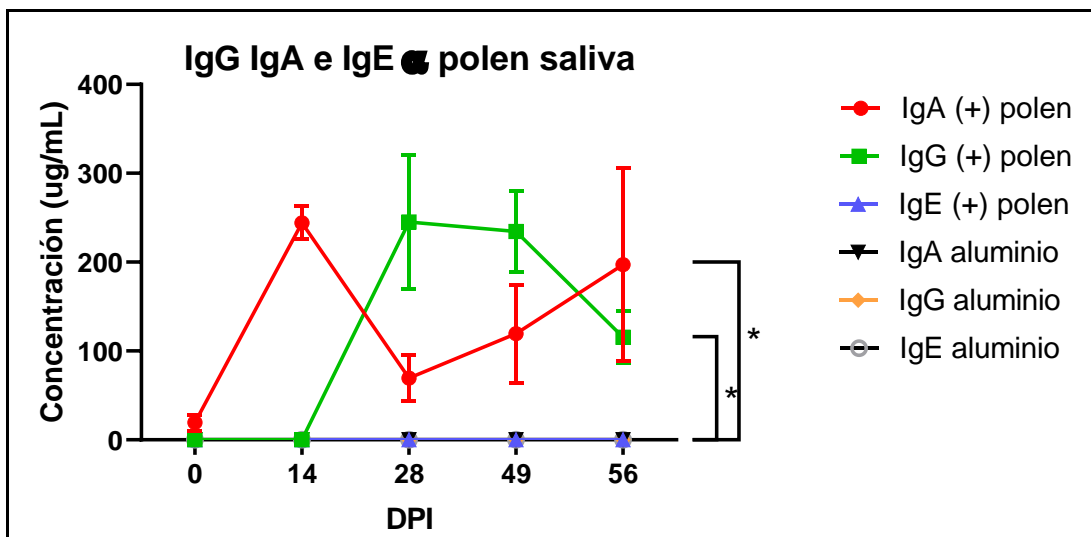


Figura 31. IgG, IgA e IgE alérgeno – específica *Phleum pratense* en saliva. Existió una diferencia significativa entre IgA e IgG específicas entre el grupo control y el experimental, pero no entre IgA e IgG experimentales. La IgE no se detectó en las muestras a ninguno de los tiempos. Cada símbolo representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba de ANOVA de dos factores para detectar diferencias en los sueros, * P< 0.05.

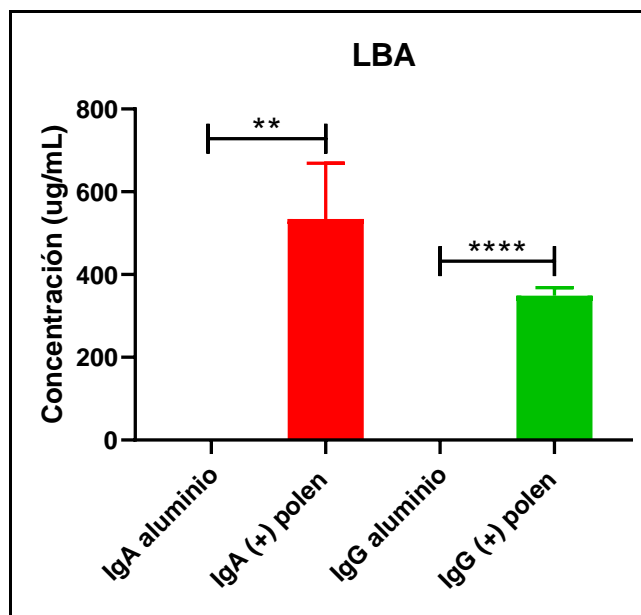


Figura 32. IgG e IgA alérgeno–específica de *Phleum pratense* en lavado broncoalveolar. Existió una diferencia significativa entre el grupo control y el experimental para IgA e IgG específicas. Cada barra representa la media (\pm SEM) de la concentración de anticuerpo (μ g/mL) en suero de los 5 cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*, detectado por ELISA. Se usó una prueba t de Student para detectar diferencias en los sueros, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

7.9 Comparación de inmunorreactividad de IgE específica entre los sueros porcinos experimentales y de pacientes asmáticos frente a las proteínas del polen de *Phleum pratense*

Por medio de *Western blot* fue posible identificar varias de las proteínas inmunogénicas de *Phleum pratense* con los 5 sueros de cerdos sensibilizados con polen del último muestreo y 4 sueros de pacientes asmáticos en fase crónica de asma (ver anexo) en una membrana de nitrocelulosa con las proteínas del extracto del pasto ya transferidas. Hubo una respuesta heterogénea a las proteínas inmunogénicas de *Phleum pratense* en los cerdos, al igual que en los pacientes asmáticos humanos, provenientes de un protocolo de prevalencia multicéntrico, INER, Hospital Juárez y Centro Médico SXXI proporcionados por el Dr. César Augusto Sandino Reyes. En el caso del reconocimiento de proteínas inmunogénicas de *Phleum* por parte de los sueros de los cerdos experimentales se identificaron bandas de 27 kDa, que corresponden a la proteína 1 (Phl p1) beta-expansina y de 55 kDa, la cual se ha reportado como la enzima berberina (Phl p 4) o poligalacturonasa (Phl p 13). La proteína Phl p 1 fue reconocida por 4 de los 5 cerdos que se evaluaron en este experimento (Figura 33). La identificación de estas proteínas por parte de IgE específica en humanos fue reportada con anterioridad. En este experimento fue posible observar el reconocimiento de otras proteínas inmunogénicas predominantes, incluso en los 5 cerdos. Tres de los cuatro pacientes asmáticos humanos reconocieron la misma proteína (Phl p1) (Figura 34). Solamente uno de los pacientes reconoció una sola proteína del polen (Phl p1). Mientras que otros dos reconocieron también una banda de

11 kDa (Phl p6) y una de 20 kDa (Phl p11). También hubo un reconocimiento heterogéneo a las proteínas del polen como sucedió con los cerdos sensibilizados.

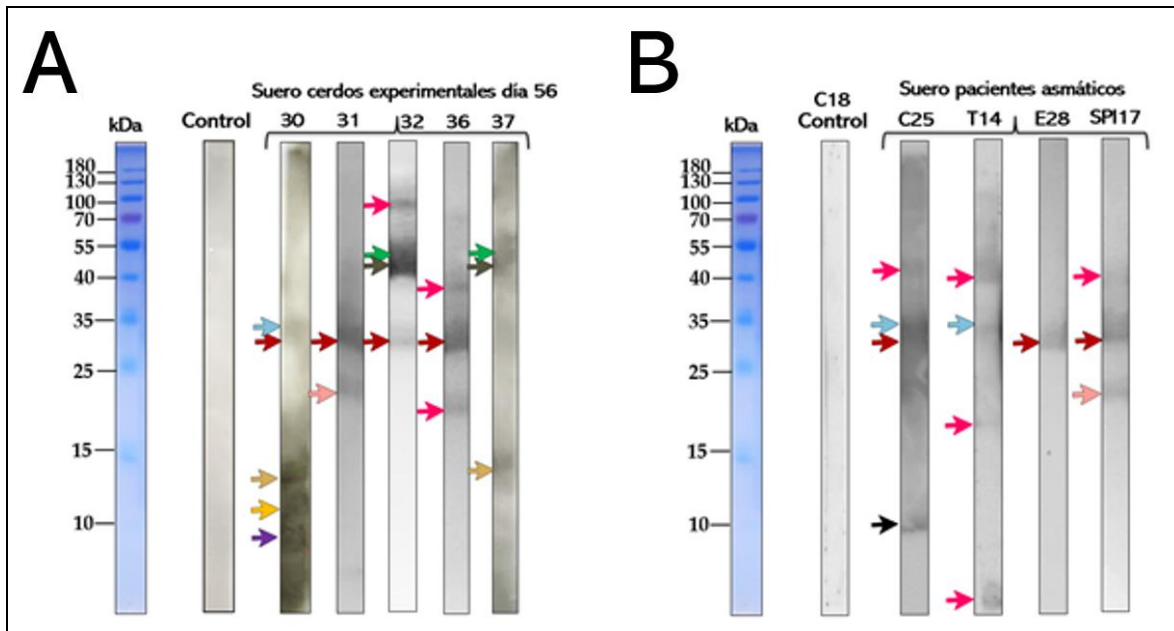


Figura 33. Reactividad de anticuerpos IgE antígeno específicos provenientes de los sueros porcinos y pacientes asmáticos, frente a las proteínas inmunológicas de *Phleum pratense*. (A) Inmunorreactividad de los sueros porcinos experimentales del día 56 del protocolo de inmunización frente a las proteínas del polen *P. pratense*. (B) Inmunorreactividad de los sueros de pacientes asmáticos en estado crónico del asma frente a las proteínas del polen *P. pratense*.

Proteínas polen <i>Phleum pratense</i>			
Nomenclatura		Proteína	Peso (kDa)
Php p1	➔	Beta-expansina	27
Php p2	➔	Desconocida	10-12
Php p4	➔	Enzima berberina	55
Php p5	➔	Ribonucleasa	32
Php p6	➔	Desconocida	11
Php p7	➔	Polcalcina	6
Php p11	➔	Proteína Ole e 1	20
Php p12	➔	Profilina	14
Php p13	➔	Poligalacturonasa	55
Otras	➔	Isoformas de profilina	Diferente peso

Figura 34. Proteínas del polen *Phleum pratense* ya reconocidas de IgE específica en humanos. La tabla corresponde a las proteínas ya identificadas en humanos por IgE específicas (fuente: Allergome.com).

Discusión

Los cerdos alcanzan la madurez sexual a los 6 meses, se reproducen durante todo el año y tienen de 10 a 12 lechones en una sola camada. Son lo suficientemente grandes y robustos como para tolerar protocolos experimentales complejos que requieren múltiples intervenciones y muestras repetidas de tejido o fluidos, durante un período prolongado de tiempo. Adicionalmente, se han analizado las características anatómicas, histológicas y microbiológicas del pulmón porcino y se han descrito las similitudes entre éste y el pulmón humano lo que lo hacen un modelo animal adecuado para la investigación respiratoria traslacional.

En este estudio se evaluó de la producción de inmunoglobulina E en cerdos vietnamita, en un protocolo de sensibilización utilizando el extracto de polen de *Phleum pratense*, es decir, se utilizó un alérgeno típico para simular un estado agudo del asma humano con el objetivo de desarrollar un modelo para profundizar a futuro sobre la patogénesis del asma, cuestiones como el surgimiento de la inflamación neutrofílica o eosinofílica, el cambio de perfil de la respuesta de anticuerpos IgM o IgG a uno de IgE, y la cinética de sensibilización de la mucosa. Además, para probar tratamientos nuevos contra el asma, buscar elementos para el diagnóstico temprano que permitan el control del desarrollo de la patología o incluso probar tratamientos para revertir (desensibilización) o prevenir el problema, todas son metas altamente deseadas que podrían investigarse en un modelo traslacional semejante en tamaño, fisiología y desarrollo al humano, como lo es el cerdo.

Para el primer objetivo de este trabajo, de purificar IgE porcina, se generó una respuesta reagínica persistente en dos cerdos, mediante un protocolo de sensibilización con un extracto proteico de *Taenia hydatigena* (Figura 11). La combinación de la inmunización subcutánea e intraperitoneal permitió el incremento de los niveles de IgE Ag específica en suero, como ya se ha reportado en la literatura [11,12].

La purificación de IgE a partir de suero fue un reto debido a su baja concentración. Para lograrlo se hicieron modificaciones a la metodología descrita en la literatura [11,12,84]. La purificación por precipitación con sulfato de amonio, seguida de paso por columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales contra inmunoglobulinas porcinas y usando proteína G demostró ser un método eficaz para obtener una muestra enriquecida de IgE porcina de suero. La precipitación con sulfato de amonio aumentó el contenido relativo de IgE en el precipitado de gammaglobulinas, en donde los principales contaminantes eran las inmunoglobulinas A, G y M (Figuras 15,16 y 17), lo cual ya está reportado en otros estudios [11,12]. La metodología para la caracterización de la inmunoglobulina E porcina también ya fue reportada [12], donde en un SDS-PAGE, se observó una banda de aproximadamente 70 kDa en la fracción de la IgE purificada al igual que en un ensayo de *Western blot* (Figura 19). Se ha demostrado el mismo resultado de un gel de poliacrilamida del peso nativo de la inmunoglobulina E [81,83,84].

Los resultados mostrados en la anafilaxia pasiva cutánea indicaron que la IgE seguía activa después del proceso de purificación, además de que la reacción fue de tipo I (hipersensibilidad inmediata), es decir; que la respuesta fue de IgE alérgeno-específica. Ya que al inactivar la IgE con calor (56 °C) durante 4 horas ya no se produjo el eritema ni

la induración que son signos característicos de una respuesta positiva anafiláctica. Este resultado se podría explicar por la formación de polímeros de IgE biológicamente **inactivos** (**inactivos** (Figura 20A y B) [80]. Las características físicas en cuanto al peso de la Ig completan y de la cadena pesada de la IgE porcina se correlacionaron bien con las descritas para la IgE humana [11,12,80,84,100].

Aunque las otras inmunoglobulinas y la albúmina se eliminaron con éxito, el rendimiento que se obtuvo de IgE fue muy bajo. En consecuencia, para la producción del antisuero de ratón anti-IgE porcina, se usaron las bandas de los geles de poliacrilamida donde se evidenció la cadena pesada de IgE porcina, cortándolas directamente del gel y siguiendo el protocolo de inmunización reportado en la literatura [86,87]. El inmunizar con geles en lugar de la proteína purificada tiene la ventaja de utilizar menos cantidad de proteína, además de que la poliacrilamida actúa como un adyuvante durante la inmunización; pero hay que destacar los inconvenientes de utilizar los geles los cuales son: que se provoca un absceso en la mayoría de los animales a la inoculación, además de que se produce daño renal y hepático lo que puede conducir a la muerte del animal antes de obtener satisfactoriamente el antisuero [86].

La migración de la cadena ϵ porcina se determinó por el peso molecular. Estos resultados fueron consistentes con la literatura [11,12,81]. El reconocimiento de IgE porcina por el antisuero obtenido en los ratones y el protocolo de inmunización coincide con lo ya reportado [12,84,102]. Cada anticuerpo individual es capaz de unirse específicamente con un único epítipo, gracias al idiotipo ubicado en la punta de la región variable del anticuerpo. Esta especificidad permite la detección precisa de un antígeno objetivo, como una proteína, a la vez que evita la detección de proteínas no relacionadas que no son de interés [88]. Pero todos los anticuerpos reaccionan de forma cruzada en cierta medida [88,89]. En cualquier situación particular, la proporción de la unión específica a la no específica al epítipo se determina por la abundancia relativa de cada uno de los reactivos en una preparación particular, la afinidad del anticuerpo por cada reactivo, la concentración de anticuerpo utilizada en el ensayo, y el método de preparación de la muestra [90]. Esto podría explicar por qué el ratón 2 reconoció otros isotipos de inmunoglobulinas (Figura 22). Además, es importante reconocer que un epítipo en particular podría aparecer en más de un antígeno proteico. Por lo tanto, un anticuerpo podría reconocer dos o más proteínas si estas proteínas son altamente homólogas y contienen el mismo epítipo. Y que se debe reconocer que se generarán múltiples anticuerpos contra un antígeno proteico típico y, por lo tanto, cualquiera de estos anticuerpos podría potencialmente reaccionar de forma cruzada con otra proteína que contiene el mismo epítipo [88,89,90]. Además, la inespecificidad con el ratón 2 podría explicarse de que el antígeno con el que se inmunizó no estaba bien purificado, lo recomendable para no tener inespecificidad en un anticuerpo policlonal es la purificación de éste [89,90].

La inmunoglobulina E es una molécula clave en la patogénesis del asma alérgica humana, por lo que era necesario demostrar que el modelo porcino producía esta inmunoglobulina al ser retado con el polen de *Phleum pratense*. Para ello era necesario contar con una técnica analítica capaz de detectar si se inducían niveles importantes de

anticuerpos en suero y en mucosas. Al no existir un kit de ELISA comercial confiable para la cuantificación de la inmunoglobulina fue necesaria la estandarización del ensayo.

El indicador de precisión intra e interensayo evaluó la capacidad del método de dar los mismos resultados en momentos diferentes y en condiciones distintas, ya sea de analista, reactivos e instrumentos de acuerdo con algunos autores [91,93,96]. Los resultados de la prueba intraensayo del ELISA cuantitativo de IgE porcina cumplieron con lo establecido, ya que el mayor coeficiente de variación fue 7.4 % [Tabla 4] siendo 10 % el máximo permitido para este tipo de ensayo. En la precisión interensayo fue de 9.3 % (Tabla 5), siendo 15 % el máximo tolerable para esta prueba de acuerdo con la literatura [93,94,95,96].

El análisis de regresión lineal entre la IgE comercial vs la IgE purificada en el laboratorio indica la relación entre las dos variables cuantitativas. La correlación fue de $R^2 = 0.96$, que indica que existe una fuerte asociación entre las dos variables (Figura 23), y que las absorbancias de la IgE purificada se correlacionaron casi exactamente con las de la IgE comercial.

Para que los resultados de cualquier método analítico sean válidos, es esencial que el analito en el suero estándar y en las muestras presente un comportamiento similar [93]. Al estudiar el indicador de linealidad se observó que todas las diluciones mostraron, una vez corregidas con el factor de dilución, sólo pequeñas desviaciones del valor observado ($CV < 10\%$), que no afectaron el paralelismo con la curva estándar (Tabla 3).

Para determinar la concentración óptima de recubrimiento de la placa con el Ag, se evaluaron varias concentraciones de extracto de *Phleum pratense*. La concentración de recubrimiento óptima para la ELISA de IgE porcina resultó de 100 ng/pozo. Según Ochoa [91,96], concentraciones entre 100 ng/pozo y 5 µg/pozo de recubrimiento suelen ser suficientes, aunque deben estimarse en cada caso (Figura 24). Elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto “gancho”). Este efecto gancho se da por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes, inhibiendo los inmunorreagentes en la fase líquida. Además, entre menor sea la concentración de recubrimiento, el fondo de la prueba disminuiría [96]. Al evaluar la dilución óptima de la muestra, se observó que la mayor discrepancia entre los sueros positivos y el negativo fue en 1/500 (Figura 25) [91,93,96,97].

Respecto a la determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas IgG e IgA específicas en suero y en mucosas, se obtuvieron diferencias significativas, y que correlacionaron con lo ya reportado en otros modelos animales, en donde también se hallaron títulos altos de estos anticuerpos [52], tras llevar a cabo un protocolo de sensibilización. Los niveles elevados de estas inmunoglobulinas en padecimientos como el asma están relacionados a la capacidad que tienen para neutralizar al antígeno y evitar que lleguen a las células ya sensibilizadas. En el caso de la IgA, que se encuentra en secreciones como el moco, evita que el antígeno pase por el revestimiento mucosal [53], sin embargo, así como la IgA puede tener un papel bloqueador también se ha observado que tiene efecto antiapoptótico sobre los eosinófilos, aumentando así su vida media, favoreciendo su desgranulación y la

liberación de citocinas proinflamatorias [54], esto podría explicar por qué la IgE apareció en menor concentración en relación con esta inmunoglobulina en suero de los cerdos sensibilizados y el infiltrado que se encontró en los pulmones de los cerdos inmunizados con el polen de *Phleum pratense*. También hay evidencia de que los eosinófilos de pacientes con asma atópica son más propensos a los efectos estimulantes de la IgA, ya que los eosinófilos de individuos alérgicos expresan más Fc α RI [51]. En línea con esta observación, recientemente se informó que las citocinas IL-4 e IL-5 derivadas de T (Th2), aumentan la unión de las moléculas antigénicas recubiertas con IgA a los eosinófilos [54]. Existe evidencia *in vitro* de que las citocinas que se han implicado en la patogénesis del asma pueden aumentar el transporte de IgA a través del epitelio. IL-4 e IFN- γ mejoran sinérgicamente la expresión del componente secretor y la unión de IgA a las células epiteliales cultivadas [10], esto también ocurrió en el modelo porcino, ya que se encontraron diferencias significativas del IFN- γ entre el grupo experimental y el grupo control [27].

La IgG, en pacientes asmáticos, así como en modelos de alergia, puede contribuir a la regulación de linfocitos Th2 en procesos inflamatorios relacionados con alergias, ya que es capaz de neutralizar al antígeno antes de que este llegue a la IgE específica, sin embargo, también puede situarse en los receptores celulares de mastocitos dando lugar a la desgranulación de éstos a través de su receptor Fc γ RIIIB [14,61]. Al igual que la IgA, algunos estudios han mostrado que probablemente exista una deficiencia de esta inmunoglobulina en el asma y por lo tanto no sea capaz de bloquear por completo al antígeno, dando lugar a todos los eventos involucrados en la patología.

Cuando se inhala o ingiere un alérgeno particular, éste puede interactuar con su anticuerpo citofílico asociado a mastocitos y desencadenar la liberación de mediadores. Estos a su vez, estimulan la inflamación de la mucosa, las células del músculo liso, las glándulas secretoras que producen moco y los macrófagos, que eventualmente conducen a broncoespasmo y secreciones respiratorias excesivas, toda esta sintomatología se encontró y reportó en el modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria, los cuales presentaron sibilancias bilaterales, congestión pulmonar a la necropsia, tiraje intercostal e incluso el broncoespasmo que condujo a la muerte a uno de los cerdos [22,23].

Aunque los mecanismos por los cuales la IgG contribuye a la patogénesis o la tolerancia de las respuestas alérgicas siguen siendo controvertidos, los estudios clínicos han demostrado que, además de los niveles elevados de IgE específica para alérgenos, los individuos alérgicos también tienen niveles elevados de IgG específica para alérgenos, lo que correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo [Figura 29]. Se ha mostrado que el receptor activador Fc γ RIII es necesario para la inducción potente de respuestas Th2 [35,68,95]. Además, se ha encontrado que Fc γ RIII es capaz de modular la señalización de TLR en DC's para impulsar las respuestas Th2 [52,53]. IgG1 se puede encontrar presente en los pulmones de individuos sensibilizados y puede formar complejos con alérgenos inhalados durante la respuesta secundaria, esta inmunoglobulina encontrada en el modelo porcino indicaría que también se sitúa, al igual que IgE, en las células cebadas y al entrar en contacto con el alérgeno da lugar a la

desgranulación, lo cual se correlaciona con la inflamación, daño al pulmón y la sensibilización en los cerdos frente al polen de *Phleum pratense* [22,23].

Estas DC's respiratorias migratorias pueden facilitar un medio de apoyo a las respuestas alérgicas en las vías respiratorias, proporcionando un circuito de retroalimentación positiva entre el desarrollo de células B que producen IgG específica de alérgenos y la respuesta innata de las DC's respiratorias en los pulmones. La presencia de FcγR y diferentes tipos de células innatas, en individuos normales *versus* atópicos podría determinar si la IgG específica de antígeno contribuye al desarrollo de alergia o tolerancia. Por lo tanto, para comprender a fondo la importancia de la respuesta de IgG en la alergia, quedan preguntas como la expresión diferencial de los subtipos de IgG, las diferencias en la afinidad de IgG y los niveles de expresión de FcγR en células innatas entre individuos alérgicos y no alérgicos, de ahí la importancia de desarrollar modelos animales donde analizar esos puntos [75,88,96]. Además, con el modelo se podría saber si en la fase crónica de la enfermedad los niveles de IgG e IgA específica [Figura 29] comienzan a disminuir y hasta qué punto la concentración de IgE específica se estabiliza.

En cuanto a los resultados para la producción IgE específica contra el polen de *Phleum pratense*, los niveles fueron superiores a los reportados en otros modelos para el estudio del asma. Los otros modelos animales reportan una concentración en suero de 1 µg/mL mientras que el cerdo tiene una media de 7 µg/mL, e incluso es superior a los niveles séricos en pacientes asmáticos humanos [98]. En mucosas los niveles fueron indetectables, como se ha encontrado en pacientes asmáticos humanos, los cuales, en la fase crónica tienen una concentración entre 10 y 20 ng/mL; por lo que la concentración de IgE alérgeno-específica es indetectable y concuerda con lo reportado [108]. Solamente la IgE específica se detecta de forma local y cuando ocurre la exposición al alérgeno, después, los niveles son indetectables.

Al confirmarse la producción IgE específica en suero del modelo, se pueden explicar mejor los resultados obtenidos por Salazar en 2016 [23], al igual que el infiltrado de eosinófilos y mastocitos en las histologías de tejido pulmonar de los cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense*. —Además, estos anticuerpos se unen a los receptores específicos en la superficie de los mastocitos que se encuentran en mucosa y en piel. Los alérgenos se unen a estas células efectoras, lo que da como resultado el entrecruzamiento de los receptores [20,98]. Esta reticulación y agregación causa la liberación inmediata de mediadores preformados como la histamina y, poco después, la liberación de recién formados, como los productos del ácido araquidónico (por ejemplo, leucotrienos, prostaglandina D2) y citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-4 e IL-5 [84,85,98]. Este proceso de desgranulación en los mastocitos se correlaciona con las de las intradermoreacciones y anafilaxia pasiva cutánea positivas reportadas en este trabajo; al igual que con otros resultados [22,23].

Los signos clínicos encontrados en los cerdos sensibilizados fueron broncoespasmos, sibilancias bilaterales, tiraje intercostal, cianosis periférica e incluso uno de los 6 cerdos sensibilizados tuvo un choque anafiláctico mortal [22]. Los signos, al igual que en una población abierta de humanos, fueron muy variables en el modelo porcino. Estos signos

son clásicos de una anafilaxia ocasionada por la inmunoglobulina E según lo descrito en la literatura [108] y que, al comprobarse en este trabajo que se produce IgE alérgeno-específica ante la sensibilización con el polen, el modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria replica las características principales del asma humano.

El grupo control también produjo IgE específica después del día 49, después de que se habían aplicado las intradermorreacciones (Figura 26); esto pudo ser ocasionado por la alta dosis (100 µg) de *Phleum pratense* que se administró que pudo ocasionar una sensibilización sistémica [106]. Este resultado concuerda con los de otros autores [104,106] que hicieron intradermorreacciones con el extracto proteico de *Phleum pratense* en humanos, utilizando una dosis de 7 ng en 50 µL del solvente y en perros con una dosis de 5 µg en 200 µL del solvente, encontrando que aumentó la respuesta de tipo Th2 e IgE y los síntomas alérgicos respiratorios empeoraron. Las inoculaciones subcutáneas/intradérmicas con polen de gramíneas se asocia con un riesgo de reacciones alérgicas sistémicas y, por lo tanto, las inyecciones requieren la supervisión de un especialista [99,102,105]. En otro estudio [101,102] se planteó la posibilidad de que la exposición intracutánea a aeroalérgenos, por [ejemploejemplo](#), en pacientes con dermatitis atópica con función de barrera de la piel alterada, puede tener potencial para promover o exacerbar la enfermedad alérgica respiratoria. Este vínculo se ha planteado como la base de la llamada "marcha atópica", desde la dermatitis atópica hasta el desarrollo posterior de alergias respiratorias. Una diferencia inmunológica potencialmente importante en las inoculaciones con alérgenos epicutáneos e intradérmicos está en los tipos de las APCs, particularmente las poblaciones de DC's, que pueden ser encontradas por los alérgenos [101]. Se ha reportado [101,102,103,107] que, al colocar tres dosis intradérmicas del ácaro del polvo, los pacientes crearon una sensibilización ocasionando linfagitis. En la epidermis predominan las células de Langerhans, aunque las pruebas de parches de atopia también inducen la infiltración por células epidérmicas dendríticas inflamatorias, mientras que en la dermis se han identificado 3 subtipos principales de DC's y esto explicaría el por qué hay el reconocimiento y presentación del alérgeno en los cerdos del grupo control [101].

En diversos estudios se han identificado varias proteínas inmunogénicas de *Phleum pratense* que reaccionan con la IgE antígeno-específica de suero de pacientes con asma o alergia (Figuras 35 y 36). En nuestro estudio se comparó la inmunorreactividad de la IgE proveniente de suero de los cerdos sensibilizados y de pacientes asmáticos humanos, contra proteínas de este pasto, donde la IgE porcina reconoció varias proteínas ya identificadas por IgE específica en humanos,.

El reconocimiento fue heterogéneo entre los pacientes asmáticos y los cerdos, pero en ambos la proteína más reconocida fue la beta-expansina (Phl p1), que es la más reconocida por pacientes asmáticos humanos [109]. En el polen de gramíneas, los alérgenos principales (alérgenos del grupo 1, principales agentes causantes de la fiebre del heno y del asma estacional) están relacionados estructuralmente con un subgrupo de las β-expansinas [110]. Las expansinas comparten un módulo de unión a carbohidratos (CBM), que podría ser responsable de la unión al anticuerpo IgE. El dominio de expansina II es el causante de los efectos alérgicos [92]. Con estos resultados se dedujo que la

población de pacientes asmáticos y la de cerdos experimentales reconocieron los antígenos de los grupos de alta prevalencia (Grupos 1, 2, 3, 4 y 5) y también de los grupos con alta antigenicidad para IgE específica (Grupos 1 y 5). Esto concuerda con lo reportado ya en humanos [112,113], lo que indicaría que el modelo porcino es adecuado para estudiar la sensibilización y reconocimiento de las proteínas del polen de *Phleum pratense* para la patología del asma. Sin embargo, también se encontraron algunas diferencias en el reconocimiento de proteínas entre los sueros porcinos y de pacientes asmáticos, donde, el patrón de reconocimiento fue mayor por los sueros de los cerdos que por los pacientes asmáticos, esto puede deberse a que los cerdos se sensibilizaron más, ya que es una sensibilización inducida con el polen y en el caso de los humanos es una sensibilización natural. Esto podría ser una limitante en cuanto al modelo para el estudio del asma humano. Además de que el modelo animal parecía estar en un estado agudo de la enfermedad, mientras que los pacientes asmáticos estaban en un estado crónico, lo que podría afectar el patrón de reconocimiento de las proteínas del extracto.

En resumen, en el modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria hubo una sensibilización al polen de *Phleum pratense*, que incrementó la respuesta sérica pero no la mucosal de IgE alérgeno específica. Con este modelo podría evaluarse la cinética de aparición de los distintos isotipos de anticuerpos anti-alérgeno, permitiendo analizar las fases de sensibilización aguda y crónica del padecimiento, así como el patrón de respuesta a los diferentes componentes de los alérgenos, reconociendo los antígenos inmunodominantes, de reacción aguda y de efecto crónico. Estos datos permitirían estudiar la producción de anticuerpos bloqueadores y la detección de puntos clave de la patología, donde podría ser posible el diagnóstico temprano, y el diseño de tratamientos terapéuticos (desensibilización) e incluso profilácticos (vacunas) [113]. Por lo anterior, se cumplió con los objetivos de esta investigación.

Conclusiones

1. Se consiguió purificar IgE sérica porcina.
2. Se logró producir antisuero de ratón anti-IgE de cerdo para montar la prueba de ELISA cuantitativa.
3. Se validó una prueba de ELISA cuantitativa para la detección de IgE porcina alérgeno específico.
4. Se evaluó la producción de anticuerpos alérgeno-específicos, inducidos por el protocolo de sensibilización respiratoria de *Phleum pratense* en el modelo porcino.
5. Existió una producción IgA e IgG alérgeno-específica contra el polen de *Phleum pratense* en suero y en mucosas, lo que confirmó la eficacia del protocolo de sensibilización. Además de que la aparición en suero de estas dos inmunoglobulinas comenzó en el día 28 del protocolo de inmunización en los cerdos experimentales.
6. Hubo una producción de IgE alérgeno-específica contra el polen de *Phleum pratense* en suero y su aparición comenzó hasta el día 49 del protocolo de inmunización, lo que constata la eficiencia del protocolo y en las mucosas no se observó dicha producción de IgE específica.
7. El protocolo de inmunización con el polen de *Phleum pratense*, empleado en este trabajo, es representativo de una fase aguda de la enfermedad en el modelo porcino, ya que apenas comienza la producción de IgE específica y continua en aumento, pero se deberá analizar si esa producción continúa en aumento o se estabiliza en fases posteriores del modelo.
8. Se comparó la reactividad de los anticuerpos IgE específicos porcinos y de asmáticos humanos contra las proteínas del polen de *Phleum pratense*, evidenciándose una inmunorreactividad heterogénea en ambos casos. Cuatro de los cinco cerdos sensibilizados con el polen de *Phleum pratense* reconocieron a la proteína Php p1, como sucede con los pacientes asmáticos humanos. Pero se necesitan estudios en una población más grande para confirmar estos resultados.
9. El modelo porcino de hipersensibilidad respiratoria podría ser empleado como traslacional para un estado agudo de la patología asmática.
10. La limitante para seguir evaluando la respuesta alérgica es la disponibilidad de inmunoglobulina E purificada y de un antisuero o anticuerpo monoclonal anti-IgE porcina.
11. Para estudiar la enfermedad en un estado crónico se necesita implementar un protocolo de evaluación más prolongado.

Perspectivas

Para poder explicar algunas de las hipótesis existentes en el asma humano, con el modelo porcino, se necesita un protocolo de sensibilización más largo para establecer un estado crónico de la enfermedad.

Optimizar una metodología más corta y rápida para la obtención de IgE porcina mediante la elaboración de una columna de afinidad de anti-IgE con antisueros específicos o anticuerpos monoclonales.

Resulta necesaria la elaboración de un anticuerpo monoclonal de anti-IgE porcino para poder facilitar las pruebas de laboratorio.

Se requiere profundizar en el análisis histológico de células productoras de anticuerpos y células encargadas de la remodelación del tejido pulmonar (mastocitos, neutrófilos y caliciforme).

Evaluar la cinética de reconocimiento a las proteínas del polen de *Phleum pratense* en los cerdos experimentales de los días 0,7,14,28 y 49 del protocolo de sensibilización.

Con este modelo se podrá investigar el desarrollo de la patología desde sus fases más tempranas, analizando aspectos como:

- a. Manejo del alérgeno por los órganos linfoides y APCs.
- b. Desarrollo de la respuesta humoral (IgM, IgG, IgA, IgE) y anamnésica.
- c. Papel de las citocinas locales y sistémicas.
- d. Papel bloqueador de los anticuerpos.
- e. Perfil de reconocimiento de proteínas alergénicas en las fases prealérgica, alérgica aguda y alérgica crónica.
- f. Evaluación de parámetros de diagnóstico temprano de la patología en la fase asintomática.
- g. Tratamientos terapéuticos para la fase preclínica, aguda y crónica de la enfermedad.
- h. Evaluación de procedimientos desensibilizantes.
- i. Desarrollo de terapias profilácticas (vacunas).

Bibliografía

1. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. (2008). Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol*. Vol 121(4):847-877.
2. Alphonse M.P., Saffar A., Shan L., HayGlass K., F. Simons, E., Abdelilah S. & Gounni. (2008). Regulation of the High Affinity IgE Receptor (FceRI) in Human Neutrophils: Role of Seasonal Allergen Exposure and Th-2 Cytokine. *Plos One*. Vol. 3. 1-8.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Asthma Facts—CDC's National Asthma Control Program Grantees. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2013.
4. Corbridge, S. & Corbridge T. (2010). ASTHMA in Adolescents and Adults. Guideline-based diagnosis and management. *American Journal of Nursing*. Vol. 110, No. 5, 28-38.
5. Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, McVay WP. (1999) Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet*. Vol 353:1930–1933.
6. Akdis CA. Allergy and hypersensitivity. Mechanism of allergic disease. *Current Opinion in Immunology*. 2006; 18: 718-726.
7. Nunes C., Pereira M. A., & Almeida M. (2017). Asthma costs and social impact. *Asthma Research and Practice*. Vol 3. 2-11.
9. Schonberger HJ, Dompeling E, Knottnerus JA, Maas T, Muris JW, van Weel C, van Schayck CP. The PREVASC study: the clinical effect of a multifaceted educational intervention to prevent childhood asthma. *Eur Respir J*. 2005; 25:660–670.
10. Platts-mills T. (2001). The Role of Immunoglobulin E in Allergy and Asthma. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE*. Vol. 164. S1–S5.
11. Roe, J.M., Patel, D. and Morgan, K.L., (1993). Isolation of porcine IgE, and preparation of polyclonal antisera. *Ver Immunol. Immunopathol.*, Vol 37: 83-97.
12. Rupa P., Hamilton K., Cirinna M. & Wilkie B. (2008). Porcine IgE in the context of experimental food allergy: Purification and isotype-specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* Vol 125. 303–314.
13. Ras RM, Riera P. Alergia al látex. *Semergen*. 2006;32(10):494-8.
14. Larché M., Cezmi A. & Valenta R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *nature reviews-immunology*. Vol 6. 761-778.
15. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. National Heart, Lung and Blood

- 16.Kay AB. Allergy and Allergic Diseases. First of two parts. N Engl J Med 2001; 344 (1): 30-37. 2.
- 17.Kay AB. Allergy and Allergic Diseases. Second of two parts. N Engl J Med 2001; 344 (2): 1091-13
- 18.Lewis DM, Lewis JC, Loegering DA, Gleich GJ: Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. J Cell Biol 1978, 77:702– 713.
- 19.Vrtala S., Wolfgang R., Reimitzer I., Ree V., Laffer S., Muller W.D, Lechner K, Rumpold H. Kraft D. & Scheiner O. (1993). cDNA Cloning of a Major Allergen from Timothy Grass (*Phleum pratense*) Pollen; Characterization of the Recombinant Phl p V Allergen. The Journal of Immunology. Vol. 151. 4773-4781.
- 20.Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G and Bousquet J. (1997). Transforming growth factor- β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med; 156:591-9.
- 21.Stone K., Prussin C. & Dean D. (2010). IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. J Allergy Clin Immunol. Vol 125. 2-16.
- 22.Ledezma J. (2017). Evaluación de la respuesta inmune a alérgenos de *Phleum pratense* en el modelo de minicerdo vietnamita. (tesis de posgrado). Instituto Politécnico Nacional. México.
- 23.Salazar G. (2016). Caracterización de la respuesta de hipersensibilidad respiratoria para alérgenos del polen en un modelo porcino (tesis de posgrado). Instituto Politécnico Nacional. México.
- 24.Rodríguez R. (2010). Los aeroalérgenos como un factor condicionante de la alergia respiratoria. Unidad de Alergología. Hospital Universitario de Getafe. 1-14.
- 25.Bertia J.M, López M.A, Alonso A., Vega A., Mateo B., Cárdenas R. & Cames J. (2014). Allergic profile to *Phleum pratense* and immunological changes induced after grass allergen-specific immunotherapy. Allergy and immunology. Vol. 167. 9-17.
26. Kips J.C. Cytokines in asthma. (2001). European Respiratory Journal. Vol. 18 (34 suppl) 24s-33s.
- 27.Pilette C., Stephen R. Durham, Jean-Pierre Vaerman, and Yves Sibille. (2004). Mucosal Immunity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proceedings of the American Thoracic Society, 125-135
- 28.The Global Initiative for Asthma. (2006). Global strategy for asthma management and prevention. Definition and Overview. 2-13.
- 29.Sola J., Ferreira J.A, Elera J., Plácido J.L, Pereira C., Fonseca J., Panizo C., Inácio L.F., Cancellaire N., Ortuño J.M, Landeta J., Madariaga B. & Martínez A. (2016). Timothy

grass pollen therapeutic vaccine: optimal dose for subcutaneous immunotherapy. *Immunotherapy*. Vol 8(3):251-63.

30. Woof, J. M. & Burton, D. R. (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews. Immunology*, 4(2), 89–99.

31. Akdis CA. Allergy and hypersensitivity. Mechanism of allergic disease. *Current Opinion in Immunology*. 2006; 18: 718-726.

32. Colegio Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia, A.C. y de la Sociedad Latinoamericana de Alergia, Asma e Inmunología. *Revista Alergia México*, año 64, suplemento 1, 2017.

33. Institute, National Institutes of Health: U.S. Department of Health and Human Services; 2007 Aug 28. Report No.: NIH Publication No.07-4051.

34. Kim D., Ester M, Quirijn J., Annedien K., Onno C., and Edthar M. (2009). Early diagnosis of asthma in young children by using non-invasive biomarkers of airway inflammation and early lung function measurements: study protocol of a case-control study. *BMC Public Health*. 9: 210.

35. Sastre J., Vandenas O., & Park H. (2003). Pathogenesis of occupational asthma. *European Respiratory Journal*. Vol 22, 364–373.

36. Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 0 2), S41–S52.

37. Rupa P., Schmied J. & Wilkie B. (2009). Porcine Allergy and IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol 132. 41–45.

38. Taylor P.E., Staff I.A, Singh M.B, Knox R.B. (1994). Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J*; 26:392–401.

39. Baraldi E, Ghio L, Piovan V, Carraro S, Ciabattini G, Barnes PJ, Montuschi P. Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest*. 2003; 124:25–31.

40. Borghesi, L., & Milcarek, C. (2006). From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic Research*, 36(1–3), 27–32.

41. Kavran J., & Leahy J., (2014). Coupling Antibody to Cyanogen Bromide-Activated Sepharose. *Methods Enzymol*. 541: 27–34.

42. Michael J. Walter & Michael J. Holtzman. (2005). A Centennial History of Research on Asthma Pathogenesis. *A Centennial History of Research on Asthma Pathogenesis*. Vol 32. pp 483–489.

43. Stephen T., Hasan S., Graham C., Peter H., Philipp T. & Donna E. (2010). A new look at the pathogenesis of asthma. *Clinical Science*. Vol 118, 439–450.

44. Río-Navarro B., Hidalgo-Castro E., & Sienra-Monge M. (2008). Asma. *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol. 66. pp 2-37.
45. Antoine F., MOUTHUY J., Stephen R., Pascal C, Yves S. & Charles P. (2014). Asthma phenotypes and IgE responses. *Basics asthma.* 124:25–31.
46. Hannah J. Gould, Brian J. Sutton, Andrew J. Beavil, Rebecca L. Beavil, Natalie McCloskey, Heather A. Coker, David Fear, & Lyn S. (2013). The biology of Ige and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* Vol 21:579–628.
47. Jin-Shu H., Sriram N., Sharrada S., Wen Q., Lafaille J., & Maria A. (2015). Biology of IgE Production: IgE Cell Differentiation and the Memory of IgE Responses. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 3 347-365.
48. Maria A., Curotto L., & Lafaille J. The Biology of IgE: The Generation of High-Affinity IgE Antibodies. *Molecular Pathogenesis Program.* Vol. 21 pp 31-48.
49. Vaibhav K., Nitish G., & Dinesh R. (2017). Correlation between serum immunoglobulin levels and bronchial asthma. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences.* Vol. 7 pp 106-107.
50. Cabrera P. Antiinmunoglobulina E, un anticuerpo monoclonal en el tratamiento de enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 241-245
51. Hans O. (2016). Fifty years later: Emerging funtions of IgE. *Mechanims of allergies.* Vol. 24 pp 1632-1644.
52. Norris, C. R., Byerly, J. R., Decile, K. C., Berghaus, R. D., Walby, W. F., Schelegle, E. S., Gershwin, L. J. (2003). Allergen-specific IgG and IgA in serum and bronchoalveolar lavage fluid in a model of experimental feline asthma. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* Vol 96.119–127.
53. Reynolds H. (1998). Immunoglobulin G and Its Function in the Human Respiratory Tract. *Pulmonary Section, Yale University School of Medicine.* Vol 63. pp 161-174.
54. Hiemstra P. (1998). Immunoglobulin A in asthma: friend or foe. *European Respiratory Journal.* Vol. 12: 517–518.
55. Hellman L., Akula S., & Zhirong F. (2017). Origins of IgE, Mast Cells, and Allergies. *Frontiers in immunology.* Vol 8:1749.
56. Acharya M., Borland G., Edkins A.L, MacLellan J., Matheson J, Ozanne W. & Cushley W. (2010). CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clinical and Experimental Immunology.* Vol. 162. 23-23.
57. Baillieau F. (2015). Inmunoglobulina e: revisión y actualización de su rol en la salud y enfermedad. *Archivos de alergia e inmunología clínica.* Vol. 46(2): pp 54-66.
58. Lawren C. Wu & Zarrin A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature immunology.* Vol. 4. pp 247-452.

59. Hans C. Oettgen & Boston M. (2000). IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*. Vol 32. Pp 429-444.
60. Eoin P. Judge, Lynne, J. M. (2014). Anatomy and Bronchoscopy of the Porcine Lung A Model for Translational Respiratory Medicine. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 51. pp 334–343.
61. Reuter S., Stassen M., & Taub C. (2010). Mast Cells in Allergic Asthma and Beyond. *Yonsei Med J* 51(6):797-807.
62. Devendra K. Agrawal. (2010). Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. Vol. 10(1): pp 39–48.
63. Holgate S. Pathogenesis of Asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. Vol 38, 872–897.
64. Faoud T. (2011). The Inflammatory Response in the Pathogenesis of Asthma. S12• *JAOA • Supplement*. Vol 111. pp 11-17.
65. Craig H., Wojciech S. a Frederick W. (2002). The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell*, Vol. 109, S45–S55.
66. Krejci J., Nechvatalova K., Blahutkova M., & Faldyna M. (2013). The respiratory tract in pigs and its immune system: a review. *Veterinarni Medicina*, Vol (4): pp 206–220.
67. Davies D. (2009). The Role of the Epithelium in Airway Remodeling in Asthma. *Proceedings of the american thoracic society*. Vol 6. 678–682.
68. Rupa P, Schmied J, Wilkie BN. (2009). Porcine allergy and IgE. *Vet Immunol Immunopathol*. Vo.;132(1):41-5.
69. Bates J. H., Rincon M., & Charles G. I. (2009). Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Vol 297: L401–L410
70. Zosky G. R. & Sly P. D. (2007). Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, Vol. 37, 973–988.
71. Reddy, A. T., Lakshmi, S. P., & Reddy, R. C. (2012). Murine Model of Allergen Induced Asthma. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (63), 3771. Advance online publication.
72. Vivolo A.M., Bonamichi S.F., Magalhães A., Kalil J. & Bianchi A. (2017). Animal models of asthma: utility and limitations. *Journal of Asthma and Allergy*. Vol.10. 293–301.
73. Ricciardolo Fabio L.M., Nijkamp F., De Rose V. & Folkerts G. (2008). The Guinea Pig as an Animal Model for Asthma. *Current Drug Targets*, Vol. 9, No. 6, 453-465.

74. Karol M.H. (1994). Animal models of occupational asthma. *European Respiratory Journal*. Vol 7, 555–568.
75. Iraola V., Gallego M.T, López-Matas M.A., Morales M., Bel L., García N., & Carnés J. (2012). Immunogenicity of Phleum pratense Depigmented Allergoid Vaccines: Experimental Study in Rabbits. *J Investig Allergol Clin Immunol*; Vol. 22(1): 35-40.
76. Fischer S., Grote M., Fahlbusch B., Miller W. D., Kraft, M.D. & Valenta R. (1996). Characterization of Phi p 4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen. *Journal allergy clinical immunol*. Vol 98, number 1. 189.198.
77. Cosgrove D, Bedinger P., & Durachko D. (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 94(12): 6559–6564.
78. Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DK. (2006). Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*;13(6):488–99
79. Fokkens W., Vinke J., & KleinJan A. (2000). Local IgE production in the nasal mucosa: a review. *Am J Rhinol* Vol. 14(5):299-303.
80. Londoño J., Raigosa M., Vásquez M., & Sánchez J.(2018). Anafilaxia: estado del arte. *latreia*. ;31(2):166-179.
81. Sturgill J. & Conrad D. (2013). Purifying and Measuring Immunoglobulin E (IgE) and Anti-IgE. *Mouse Models of Allergic Disease*. Vol 1032. pp 121-13.
82. Rousseaux-Prévost J & Bazin H. (1983). Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab)₂ fragments from monoclonal IgG of different Rat IgG subclasses. *Journal of Immunological Methods*. Vol 64. pp141-6.
83. Ishizaka K., Ishizaka T. & Hornbrook M. (1996) Physicochemical Properties of Reaginic Antibody. *J Immuno*, Vol 97. pp 840-853.
84. Peng Z., Kierek-Jaszczuk D., Thomas J., & Becker A.B. (1993). Purification and Identification of Polyclonal IgE Antibodies from Ragweed-Sensitized Dog Sera. *Int Arch Allergy Immunol*. Vol.102: pp 176–184.
84. Lawren C. & Zarrin A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature Reviews Immunology*. Vol 1. pp 247-259.
85. Gould H., Sutton B., Beavil A., Beavil R., McCloskey N., Coker H., Fear D. & Smurthwaite L. (2003). The biology of IgE and the basis of Allergic Disease. *Annual Review og Immunology*. Vol 21. pp 579-628.
86. Somayeh K., Abdollah S. Hazhir T. & Rahman H. (2018). Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent aptamer onto muntiwalled carbon nanotubes. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol 43. pp 28-255.
87. Amero S., James T. & Elgin S. (1998). Production of antibodies using proteins in gel bands. *New Protein Techniques*. Vol 3. pp 355-362.

88. Schonbrunn A. (2014). Editorial: Antibody can get it right: confronting problems of antibody specificity and irreproducibility. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 28(9), 1403–1407.
89. Couchman JR. (2008) Commercial antibodies: the good, bad, and really ugly. *J Histochem Cytochem.* 29 ;57:7–8
90. Holmseth, S., Zhou, Y., Follin-Arbelet, V. V., Lehre, K. P., Bergles, D. E., & Danbolt, N. C. (2012). Specificity controls for immunocytochemistry: the antigen preadsorption test can lead to inaccurate assessment of antibody specificity. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 60(3), 174–187.
91. Pelier V., Monteagudo A., Rosales Y., Ribes B. Martinez G. & Perera A. (2013). Validación de un inmunoensayo tipo ELISA para la cuantificación de los niveles séricos de antígeno de superficie en pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis B. *Rev Biomédica.* Vol 28, pp 3-18.
92. Amilcar A. & Arnelis F. (2006). Optimization of an immunoenzymatic (ELISA) assay for detecting ovine antibodies against *Haemonchus contortus*. *Cuban Journal of agricultural science.* Vol 49. 120-135.
93. Cantillo A. & González I. (2005). Linealidad, algo más que R^2 : un ejemplo práctico. *Revista CENIC, ciencias biológicas.* Vol 37. pp 87-92.
94. Ochoa R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Segunda edición ampliada. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2008.
95. Ochoa R, Martínez J, Ferriol X, Estrada E, García A, Blanco R. Guía para la Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor.* 2000;9(3):13-8.
96. Pérez-Barrios Y. (2018). Estandarización de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra vesículas de membrana externa de *Salmonella Paratyphi A*. *VacciMonitor.* Vol 27. pp 76-83.
97. Virgen R., Goitybell M., Torres B., Zúñiga R., Alles G., & Martínez P. (2013). Standardization and validation of an ELISA for quantifying titanic antitoxin in human serum. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* Vol 12 pp 534-541.
98. Froidure A. (2014). Asthma phenotypes and IgE responses. *Eur Respir J.* Vol. 13. pp 112-124.
99. Fokkens W., Brauntahl G. Kleinjan A., Overbeek S., Prins J. & Hoggsteden H. (2000). Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J. Respirat Crit Care Med.* Vol 161. 2051-2057.
100. Londoño J., Raigosa M., Vásquez M. & Sánchez J. (2018). Anafilaxia: estado del arte. *Latreira.* Vol 2. Pp 166-179.

101. Dharmage S., Lowe A., Matheson M., Burgess J., Allen K. & Abramson M. (2014). Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy*. Vol 69. 17-27.
102. Lee C., Chen J., Chiu H., Hong C., Liu C. & Ta Y. (2015). Dermal dendritic cells, but not Langerhans cells, are critical in murine single epitaneous sensitization. *Dermatol*. Vol 24. pp 67-69.
103. Romani N., Flacher V., Tripp C., Sparber F., Ebner S. & Stoitzer P. (2012). Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol 351. pp 113-138.
104. Kleine-Tebbe J. & Davies J. (2008). Grass pollen allergens. *Global atlas of allergy*. Vol 3. Pp 23-26.
104. Slovick A. (2017). Intradermal grass pollen immunotherapy increases Th2 and IgE responses and worsens respiratory allergic symptoms. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 19. pp 1830–1839.
105. Pérez-Aranda M., B. Blanco, Hernández E., P. J. Ginel. (2016). Resultados del test intradérmico en perros con dermatitis atópica: estudio retrospectivo de 176 casos en Andalucía. *Departamento de Medicina y Cirugía Animal; Facultad de Veterinaria*. Vol. 3 pp 285 – 292.
106. Cox L, Larenas-Linnemann D, Lockey RF, Passalacqua G. (2010). Speaking the same language. The World Allergy Organization Subcutaneous Immunotherapy Systemic Reaction Grading System. *J Allergy Clin Immunol*. Vol. 125(3):569-74.
107. Fokkens W., Vinke J., & KleinJan A. (2000). Local IgE production in the nasal mucosa: a review. *Am J Rhinol* Vol. 14(5):299-303.
108. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, Macrì F, Pingitore G, Di Rienzo Businco A, Dondi A, Pansa P, Ragusa G, Asero R, Faggian D, Plebani M, Matricardi P. (2012). Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. Vol 129(3):834-839.
108. Cosgrove D. & Sanpedro J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biol*. Vol. 6(12): 242.
109. Valdivia E., Yajun W., Lian-Chao L., Cosgrove D, & Stephenson A. (2007). A Group-1 Grass Pollen Allergen Influences the Outcome of Pollen Competition in Maize. *PLoS One*.
110. Tripodi S. Frediani T. (2012). Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: Implications for specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol 129, pp 834-839.
111. Femenia A., Simal S., Garau M. & Roseello C. (2005). ENDO-beta- 1,3 gluconasas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Alergen Asma Inmunol Pediatric*. Vol 15. pp 37-42.

Anexo

Preparación de columnas de afinidad por acoplamiento de anticuerpos a sefarosa con bromuro de cianógeno

Lo primero que se realizó para la elaboración de las columnas de afinidad anti-IgA y anti-IgM fue el acoplamiento de anticuerpos monoclonales (clona F9 y clona 5C9 respectivamente) a sefarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr-Activated Sepharose 4 Fast Flow GE Healthcare, Alemania). Para la preparación de anticuerpo y resina, se concentró el anticuerpo a 1–2 mg/mL. Se determinó la cantidad de resina necesaria, aproximadamente 2 mg de anticuerpo se acoplaron a 1 mL de resina hidratada. Se pesó 0.25 g de resina seca por cada 1 mL de resina hidratada necesaria. Se añadió 5 mL de *buffer* de activación (HCl, 1 mM) frío a la resina y se incubó en agitación. Después de hidratar la resina, se centrifugó a 1000 × g durante 5 min, y se decantó el sobrenadante. Se agregaron los anticuerpos (IgA e IgM) a sus resinas respectivas y se incubaron durante la noche en agitación a 4 °C.

Para detener la reacción de acoplamiento, se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se guardó. Se midió la densidad óptica del sobrenadante a 280 nm. Se agregaron 5 mL de *buffer* de acoplamiento (NaHCO₃, pH 8.3, NaCl con una concentración final de 100 mM) a la resina. Se incubó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se agregaron de 5 a 10 mL de *buffer de quenching* (1M Tris-HCl, pH 8.0 para una concentración final de 100 mM). Se incubó en agitación durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. La eficiencia de acoplamiento se calculó dividiendo la cantidad total de anticuerpo en el sobrenadante por la cantidad total de anticuerpo cargado en la columna. Las eficiencias de acoplamiento estuvieron en el rango del 70%.

Por último, se hizo el lavado de la resina. Se resuspendió la resina en 10 mL con el *buffer* de lavado de pH alto (Tris-HCl, pH 8.0 con una concentración final de 100 mM y NaCl con una concentración 500 mM). Se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió la resina con 10 mL de *buffer* de lavado de pH bajo (NaOAc, pH 4.0 con una concentración final de 100 mM y NaCl 500 mM). Se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, se repitió el mismo procedimiento dos veces más. Se resuspendió la resina en 5 mL de *buffer* de almacenamiento (PBS, pH 7.4). Se centrifugó la resina a 1000 × g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se empacaron las columnas de vidrio (Econo-Column® Chromatography Columns, 1.5 × 10 cm #7371512) de 10 mL. Por último, se agregaron 5 mL del *buffer* de almacenamiento (PBS y azida al 2%) y se almacenó la resina a 4 °C.

Bibliografía

Cuatrecasas, P.; Wilchek, M. & Anfinsen, C.B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 61, No. 2, (October 1968), pp. 636-643, ISSN 0027-8424.

Franco-Fraguas, L.; Plá, A.; Ferreira, F.; Massaldi, H.; Suárez, N. & Batista-Viera, F. (2003). Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography B*, Vol. 790, No. 1-2, (June 2003), pp. 365-372, ISSN 1570-0232.

Hermanson, G. T. et al, (1992). *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press (New York).

Kavran JM, Leahy DJ. (2014). Coupling antibody to cyanogen bromide-activated sepharose. *Methods Enzymol.* 2014;541:27-34

Tinción con nitrato de plata

Una vez que terminó la migración del gel de poliacrilamida, este se retiró de los vidrios y con ayuda de la espátula se colocó en un recipiente de cristal limpio, al cual se añadió 200 mL de solución de metanol 50 % y ácido acético 5 % durante 20 minutos en agitación. Después de realizaron 3 lavados con agua bidestilada. Se agregaron 200 mL de solución de etanol al 10 % y ácido acético al 5 % durante 10 minutos en agitación. Se retiró esta solución y se agregaron 200 mL de solución de dicromato de potasio (0.1 %), ácido nítrico (0.01 %), durante 10 minutos en agitación. Se realizaron 2 lavados con agua bidestilada de 1 minuto cada uno en agitación. Después el gel se colocó en solución de nitrato de plata al 0.1 % durante 30 minutos, en oscuridad y en agitación. Se realizaron 2 lavados con agua bidestilada de 1 minuto cada uno en agitación. Por último la reacción se desarrolló sumergiendo el gel en una solución de carbonato de sodio (8 % Na₂CO₃ y 0.05 % de formaldehído) que permitió la reducción de la plata. El primer lavado con la solución de carbonato se removió rápidamente para evitar la precipitación por el exceso de plata. El gel y los continuos lavados se observaron cuidadosamente y se detuvo la reacción hasta que se evidenciaron las bandas de interés. La reacción se detuvo al ser retirado el carbonato y se sumergió el gel en una solución de ácido acético al 5 %.

Bibliografía

Rabilloud T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis.* 1990;11:785–794.

Merril CR, et al. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science.* 1981;211:1437–1438.

Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166:368–79. 4.

Tabla 6. Datos de los pacientes asmáticos

Nomenclatura	Sexo	Edad	Estado de la enfermedad	Procedencia
C18	Masculino	22	No tenía asma	ENMyH del IPN

C25	Masculino	44	Asma crónico	INER
T14	Femenino	38	Asma crónico	INER
E28	Masculino	19	Asma crónico	Centro Médico SXXI
SPI17	Femenino	34	Asma crónico	Centro Médico SXXI