

## “La epigenética y la alergia : papel de la inmunoterapia específica.”

### INTRODUCCION.

Desde el conocimiento del Genoma Humano, año 2003, múltiples disciplinas de investigación, tanto en los animales como en los humanos, reforzaron sus proyectos para alcanzar la dilucidación de numerosas incógnitas, aún presentes, en un loable afán de sobrepasar el desafío que significó aquella concreción.

Sin embargo, muchas observaciones realizadas décadas atrás, por ejemplo, la de Conrad Hal Waddington, en 1942, en Lepidópteros del género *Pontia* (mariposas), que significó las variaciones fenotípicas de ellas, según las estaciones del año. Es decir, que hace 75 años un investigador señaló las posibles interacciones entre los genes de la mariposa y las condiciones ambientales que la rodeaban. Así, sin modificar su código genético, cambiaban de color y aspecto sus alas, según fuera invierno o verano. Un similar hallazgo sorprende en la actualidad, al comprobarse modificaciones en varios parámetros inmunológicos, según se midan (en el mismo sujeto) en invierno o en verano. De ahí surge esta verdadera revolución biológica que dio en ser bautizada como **epigenética**, que analiza y estudia todos aquellos factores NO GENETICOS que perteneciendo al medio ambiente, influyen en el comportamiento del código genético SIN causar cambios estructurales en el mismo.

Estos factores del ambiente celular, que nada tienen que ver con la herencia, juegan un papel importante en la ontogenia o desarrollo de un organismo, desde la fecundación del cigoto hasta la senectud, incluyendo numerosas enfermedades banales y mortales. Es una regulación de la expresión génica SIN cambios en la secuencia nucleotídica. O sea es el conjunto de reacciones fisicoquímicas y electromagnéticas que modifican la actividad del ADN, pero SIN alterar su secuencia.

A partir de lo expuesto, se abre un inmenso horizonte investigativo, que ya se está desarrollando en varios laboratorios, estudiando factores que actúan en las enfermedades cardiovasculares, neoplásicas, neurológicas, reproductivas e inmunológicas.

La reinterpretación del Genoma Humano, ya que no podía explicar todo lo que se esperaba de su descubrimiento total, introduce la noción de que nuestras experiencias “marcarían” nuestro material genético de manera desconocida, por ahora, y que estas “marcas” podrían ser transmitidas a generaciones futuras.

Como se puede apreciar, todo un cambio de paradigma biológico.

La regulación **epigenética** induce cambios en la conformación de la cromatina y su interacción con las histonas. Si la cromatina se halla muy condensada los factores de transcripción (p.ejem.: el NFκB) no pueden acceder a una determinada región del ADN, y por ende, el gen no se transcribe, o sea, queda “amputado” o “silenciado”; si por el contrario, la cromatina no se encuentra condensada, los activadores de la transcripción se unen a las regiones promotoras y ocurre la transcripción del gen. En ningún caso, el ADN fue transformado o modificado.

Hay 3 procesos **epigenéticos** de regulación: la metilación del ADN, la modificación fisicoquímica de las histonas y el papel de los ARN de pequeño tamaño que no codifican. (1-2-14-15-16-17-18-19-20).

La metilación del ADN es un proceso que ocurre en los mamíferos y en todos los organismos superiores, merced al cual, a la base citocina (recordemos que el ADN posee 4 bases: adenina, timina, citosina y guanina), se le agrega un metilo para dar una estructura más cerrada y protegida a la cromatina. Estudios muy recientes demuestran que la metilación es un proceso defensivo contra virus y parásitos, para impedir que ambos logren dañar al ADN. Sin embargo, si la metilación es excesiva es posible el “silenciamiento” de los genes. Se propone que factores del ambiente controlarían el grado de metilación, por los hallazgos en los mamíferos en los que se comprobó que la metionina, el ácido fólico, la piridoxina y la colina, tendrían como función adicionar grupos metilo, provenientes de una dieta rica en dichas sustancias. (21-22-23-24-25-26-27-28)

La metilación ocurre en las regiones CpG con elevada concentración de citosina y guanina, que es donde están los promotores de los genes. Interviene una ADN-metil-transferasa, que mantiene y regula el patrón de metilación en las CpG. Como ejemplo destacado del “silenciamiento” de genes, vaya el hallazgo de la inactivación del cromosoma X, para tener la expresión monoalélica de ciertos genes, como se ha diagnosticado en patologías tumorales (p.ejem.: el síndrome de Beckwith-Wiedemann). Curiosamente, si por el contrario hay un bajo nivel de metilación (hipometilación), el individuo tampoco estará exento de enfermedades. (29-30-31-32-33-34-35).

La modificación fisicoquímica de las histonas, comienza en el nucleosoma, unidad constituida por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, ligadas a proteínas no-histónicas. Las tiras de ADN se “enrollan” en las histonas a la manera de un carretel y el hilo correspondiente. Por procesos de acetilación, fosforilación, deaminación, ubiquitinización, e isomerización de las prolinas, y, por supuesto, por metilación, las histonas sufren cambios conformacionales, que, determinan a la postre, si un determinado gen será silenciado o expresado.

Los ARN de interferencia o ARNi y los micro-ARN de interferencia o ARNmi, no codifican para una proteína específica, pero sus secuencias son complementarias para un ADN u otro ARN codificante, y, como tal, le impiden la traducción correspondiente. Es una forma de regulación negativa de la expresión a nivel post-transcripcional.

La herencia **epigenética** es la transmisión de información que NO depende de las secuencias de las bases nitrogenadas del ADN por mitosis o meiosis. La información **epigenética** modula la expresión de los genes SIN alterar la secuencia del ADN.

El **epigenoma** es la información **epigenética** global de un organismo. La impronta genética o el “imprinting” son genes que modifican su funcionamiento SIN cambiar su estructura; así, un gen se manifiesta de manera diferente si es de origen paterno que si es de origen materno. Un factor externo dejaría una “marca” o impronta sobre algunos genes “imprintables” y cambiaría su funcionalidad ulterior. Amplios estudios en gemelos univitelinos con idéntico código, exhiben algunas diferencias funcionales, que son de difícil explicación por el momento.

Este tipo de regulación génica se ha visto en la producción de tumores, en los efectos del envejecimiento celular por cambios en la metilación, en genes neurales asociados al estrés, en imperfecciones del desarrollo fetal, y todo conlleva a impedir la buena organización de la cromatina en el núcleo celular, regulando la expresión génica en las distintas células y manteniendo el patrón adecuado de expresión en el momento justo. Así, se codificarán y sintetizarán correctamente las proteínas, citoquinas, quimioquinas y receptores, de las células inmunocompetentes, que serán motivo de esta presentación.

### La genética de la respuesta alérgica.

Hipócrates (460-377 aC) y Tito Caro Lucrecio (¿109-98 ó 55 ? aC), fueron los primeros en señalar una respuesta anómala ante la ingestión de alimentos que a la mayoría no les provocaba daño. Desde entonces, hasta los albores del siglo XX, numerosos autores realizaron descripciones de cuadros respiratorios, digestivos, cutáneos y generales, vinculados con un “fenómeno” diferente, que recién en 1906, (Von Pirquet), fue bautizado como alérgico (“otra fuerza”).

Arthur Fernández Coca (1875-1959) y Edward Perry (1856-1938), acuñaron el vocablo atopía (otro lugar, raro, paradójico), que quedó reservado para los fenómenos de hipersensibilidad inmediata IgE dependiente. En 1916, merced al estudio de muchos pacientes alérgicos, Cooke y Van der Veer, establecieron que la llamada atopía, se heredaba genéticamente con un carácter autosómico dominante, y “ocurría solamente en familias”.

A partir de 1937, en que Gorer descubrió los antígenos del trasplante, se inició una imparable carrera de hallazgos trascendentes en la inmuno-biología. Así, Snell, Dausset, Van Rood, Payne, Bodmer, Benacerraf, Ishizaka y Johansson, contribuyeron con la importancia de los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II en la activación linfocitaria, y con la caracterización de la IgE, tan crítica en la funcionalidad de los mastocitos y basófilos, y en la participación de los procesos alérgicos-atópicos, de indudable carácter poligénico.

Desde Wyman (1872), Cooke (1916), Hamburger (1973), Marsh y Meyers (1980), que ratificaron ese carácter, y, curiosamente, lo relacionaron con sustancias del medio ambiente como desencadenantes y/o agravantes. Son clásicos los trabajos de Marsh y la polinosis, al igual que en nuestro país, los de Julio A. Cruciani y José A. Bózzola, con sus mapas fitogeográficos y sus floras alergológicas, y Krikor Mouchián con los péptidos inmuno-dominantes del polen de la gramínea *Lolium perenne*.

En la última década, los estudios genéticos sobre el asma y la atopía, avanzaron mucho gracias a los pequeños tándems de polimorfismos repetidos (STRP) del ADN, que permitieron identificar 5 regiones de gran interés:

- 1): en el cromosoma 5q vinculado a un grupo de citoquinas ;
- 2): en el CMH (HLA) del cromosoma 6p relacionado con la polinosis;
- 3): en el cromosoma 11q para la subunidad  $\beta$  del RFc $\epsilon$  de la IgE, que, en años anteriores, Cookson diera en llamar “el gen del asma” ;
- 4): en el cromosoma 12q que contiene el gen que codifica para el interferón- $\gamma$ , y,
- 5): en el 14q el locus  $\alpha\delta$  para el receptor del LT.

Daniels en 1996 y el CSGA (Estudio Colaborativo sobre la Genética del Asma) en 1997, agregaron los siguientes datos :

- 1): el cromosoma 4q 34-35 y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ );
- 2): el 6p 21 (región HLA) y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ );
- 3): el 7p 13 y la hiperreactividad bronquial ( $p < 0,0005$ );
- 4): el 11q13 y las pruebas cutáneas positivas ( $p < 0,00005$ );
- 5): el 13q-14.1-14.2 y la atopía ( $p < 0,005$ ), y
- 6): el 16q 21-24 y los niveles de la IgE sérica total ( $p < 0,005$ ).

Al analizar las influencias étnicas, el CSGA demostró el ligamento entre el 5q 31-33 o grupo de las citoquinas en los caucásicos ( $p = 0,0187$ ); entre el 6p 21 en igual grupo humano ( $p = 0,0129$ ); entre el 12q 15-24.1 y los caucásicos e hispanos ( $p = 0,0042$ ) y entre el RcT  $\alpha\delta$  en el 14q 11.2 y los caucásicos ( $p = 0,0062$ ).

Otras 7 nuevas regiones muestran ligamentos en el asma bronquial: en el 5p 15 y en el 17p 11.1 y 11.2 en afro-americanos ( $p=0,0008$  y  $p=0,0015$ , respectivamente); en el 11p 15, 13q 21.3-qter y 19q 13 en caucásicos ( $p=0,0089$ ,  $0,0014$  y  $0,0013$ , respectivamente), y en el 2q 13 y en el 21q 12 en hispánicos ( $p=0,0005$  y  $p=0,004$ , respectivamente).

Hizawa en 1998, halló 2 nuevas regiones que controlan la respuesta de la IgE contra el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* en el cromosoma 2q 21q-23 y el 8p 23-p21 ( $p=0,0033$  y  $p=0,0011$ , respectivamente), en caucásicos y afro-americanos.

Con anterioridad, esas regiones eran la 6p 21 y 13q 32-q34 ( $p=0,0064$  para ambas) para los caucásicos y el 5q 23-q33 ( $p=0,0071$ ) para los afro-americanos.

Los aspectos genéticos de la polinosis también fueron exhaustivamente estudiados. Los pólenes de las variedades de *Ambrosia* y de *Lolium* atrajeron la atención de los investigadores. Con respecto a estos últimos que serán motivo de uno de los proyectos a presentar, los Lol p I, Lol p II y Lol p III, están estrechamente vinculados con el HLA-DR ( $\alpha\beta-1^* 0301$ ) o el DR3 (w17). Es posible que exista un sitio de unión en la molécula del CMH para los 3 alérgenos que permita una concordancia entre esos 3 epitopes y el DR3. La respuesta al Lol p III está relacionada con el DR ( $\alpha\beta-1^* 1101$ ) y con el DR ( $\alpha\beta-1^* 1301$ ) con una secuencia de 5 aminoácidos en el primer dominio de la primera región hipervariable. El análisis molecular de los genes DRB1, DRB3, DQA y DQB sugiere que esta secuencia es imprescindible para la presentación de Lol p I, Lol p II y Lol p III. Niños alemanes con altos niveles de IgE sérica total tienen estrecha relación con el cromosoma 12q15-q24.1.

En los últimos años, se han detectado aspectos de la genética del asma bronquial, que señalan **1**): la desmetilación de secuencias que unen el GATA al promotor del gen de la IL-4 con la hiperproducción de la misma, y, **2**): la acetilación de las histonas H3-K9 y H3-K4 con efecto sobre los LTCD4-Th2, y sobre los genes de las IL-5 e IL-13 con su hiperproducción, y las consecuencias en el cuadro clínico de los pacientes.

### Los objetivos del presente trabajo.

Luego de la breve información sobre la epigenética, se ha considerado la hipótesis que la **inmunoterapia (IT)**, de 3 a 5 años (Informe Técnico de la OMS, 1998), podría constituir una forma de mecanismo **epigenético**, pues como se va a documentar en nuestra presentación, dicha terapia modifica sustancialmente la funcionalidad de numerosas células involucradas en el fenómeno inflamatorio de la mucosa respiratoria, y, del organismo todo, pues el atópico es poseedor de una condición poligénica, documentada en el presente.

Con el propósito de dar mayor solidez a los datos que se exponen, se decidió encarar el efecto de la **IT** con 3 alérgenos diferentes (por separado) cuyo origen biológico fuera distinto, su composición química también, al igual que, su repercusión medio-ambiental y generadora de respuestas de hipersensibilidad en el 20% de la población.

Así, se analizarán los resultados de 3 proyectos con alérgenos diferentes : 1): de la **cucaracha** *Periplaneta americana*, aislado por nosotros y con similitudes bioquímicas con el Pa-7 ; 2): del **pólen** de la gramínea *Lolium perenne*, con sus glicoproteínas 33 y 38, y, 3): del **hongo** *Bipolaris australiensis*, que por ser anemófilo es causante de la sinusitis fúngica alérgica.

En todos los casos, se realizaron valoraciones inmuno-alérgicas previas y posteriores a la **IT**, cuantificando valores séricos de proteínas, citoquinas y células inflamatorias.

Los análisis estadísticos revelaron el grado de significación, y, por ende, sostienen que un factor inducible y controlado por nosotros, fue capaz de modificar el comportamiento celular SIN generar modificaciones estructurales en su ADN.

## **MATERIALES Y METODOS.**

### **Proyecto n° 1:** Cucaracha Periplaneta americana. (**Pa**).

\***Antígeno** : un extracto del cuerpo entero de la **Pa** fue preparado por nosotros siguiendo la metodología descrita por Frugoni - Hansen y por Cruciani, siendo especialmente cuidadosos con las estructuras quitinosas del insecto. La **Pa** fue rigurosamente seleccionada entre las especies abundantes del país, siguiendo las reglas entomológicas. Ese extracto (3,5 mL) fue sometido a una filtración en una columna de Sephadex G-200, de 780 mm x 22 mm, y cuyos eluidos se hicieron con un buffer de ClNa-fosfato 0,15 M, a pH 8 y a 4° C. Se aplicó otro pasaje por columna de DEAE-celulosa (de 25 mm x 380 mm) con un buffer de 0,01 M a 0,5 M, pH 8 a pH 6. Las alícuotas de 1 mL de cada eluido fueron recogidas a una velocidad de 20 mL/min. El contenido proteico de los eluidos se determinó por el método de Bradford y por absorbancia a 280 nm de DO en un espectrofotómetro Metrolab, y las hexosas por el método del indol (mezcla de galactosa-manosa como controles), y lectura a 470 nm de DO en el espectrofotómetro.

\***Técnicas inmunológicas** : los datos expuestos previamente, permiten aseverar la composición glicoproteica de estos antígenos, que, sometidos a un experimento en conejos, generaron anticuerpos IgG específicos, que positivizaron pruebas como la doble difusión en agar de Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva de Boyden (título 1/1024) y la inmuno-electroforesis, con bandas de precipitación características. El Ouchterlony, reveló bandas con identidad total y parcial, con los antígenos de otras cucarachas (especies Blatella germánica y Blatta orientalis), al igual que, con un extracto de la vinchuca Triatoma infestans, en publicaciones ya realizadas. <sup>(3-4-5-6-7-11)</sup>.

\***Peso molecular** : fue determinado en comparación con marcadores proteicos conocidos tales como la anhidrasa carbónica, albúmina sérica bovina, alcohol dehidrogenasa, amilasa, apoferritina y tiroglobulina, dando un valor de 180 kDa para el extracto total.

\***SDS-PAGE** : permitió identificar las propiedades proteolíticas y enzimáticas del extracto de **Pa**, certificando que al inhibir a la TLCK o tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone, se estaría en presencia de una serina-proteinasa o una proteinasa tripsina-like.

\***Pacientes** : se dividieron en 3 grupos : el **grupo A**, de 50 pacientes, 28 mujeres y 22 varones, con edades comprendidas entre los 18 y 37 años, todos atópicos con el síndrome rinitis/asma y con valores séricos de la IgE entre 165 y 410 KU/L ; el **grupo B**, de 20 pacientes, 12 mujeres y 8 varones, con edades entre los 33 y 47 años, con idéntico cuadro clínico y con valores séricos de la IgE entre 145 y 380 KU/L, y, el **grupo C**, de 20 sujetos, 15 varones y 5 mujeres, con edades entre los 25 y 52 años, completamente sanos, que poseían una IgE sérica total entre 18 y 37 KU/L. Se recuerda que el valor de corte de la IgE sérica total para nuestra población ha sido establecido en 100 KU/L.

De esta manera, el **grupo A**, o grupo experimental, recibió **IT** con **Pa** durante 5 años, el **grupo B**, que **no** recibió **IT** actuó como control atópico, que al igual que el **grupo A**, sólo recibió medicación farmacológica según su cuadro clínico y el criterio médico.

Finalmente, el **grupo C**, que **no** recibió **IT**, ofició de control absoluto de la experiencia. Todos

los pacientes de los **grupos A y B**, revelaron pruebas cutáneas positivas al antígeno de la **Pa** mientras que los del **grupo C**, fueron totalmente negativos a dicho antígeno. Cada paciente fue intradérmicamente inyectado con 0.02 mL de **Pa**, solución fisiológica pH 7,2 e histamina 1/1000. La lectura la realizó siempre el mismo profesional a los 20 minutos, leyendo los milímetros del eritema-pápula, siendo positiva por encima de los 5 mm. (Figs. 1 a 9).

\***Radioinmunoensayos** : la IgE sérica total se midió por el método del PRIST con equipos elaborados por Phadebas (Pharmacia, Uppsala, Suecia), que emplean las KU/L como parámetros de cuantificación. Las IgE e IgG específicas anti-**Pa** se midieron por el RAST, confeccionado con 33,5 mg/mL del **Pa** covalentemente unido a discos de celulosa (SS547) en un medio alcalino de pH 11 con bromuro de cianógeno durante 2 horas. Se midieron los resultados en PRU/mL (Phadebas-RAST-Units). Se tomaron muestras basales y al cumplirse cada año de **IT**. (8-9-10-12-13).

\***RAST-inhibición** : se desarrolló de acuerdo con la técnica de Gleich empleando **Pa** como alérgeno principal, y otros como, el pólen de Ambrosia, el epitelio de gato y el hongo Alternaria, para establecer las diferentes especificidades del RAST con el **Pa**.

\***Plan de IT específica** : fue realizada semanalmente por vía subcutánea en el brazo, con un volumen inicial de 0.05 mL hasta 0.50 mL, de una solución de **Pa**, conteniendo desde 1.67 mcg/proteína hasta 1.5 mg/proteína, al cabo de los 5 años de seguimiento. Luego de cada inyección, el paciente permanecía 30 minutos en el consultorio, para detectar y controlar cualquier reacción adversa inmediata que pudiese ocurrir.

\***Determinación sérica de las IL-2, IL-4 e IL-4R** : la muestra que se tomó para el dosaje de las IgE e IgG se compartió para la detección de estas citoquinas. Todas las muestras se guardaron a -20° C. Las IL-2 e IL-4 se determinaron por ELISA provisto por Immunotech, mientras que el IL-4R fue detectado usando un anti-CD124 de conejo unido al I<sup>131</sup> preparado por nosotros de acuerdo al método de Ceska y Erikson.

\***Evaluación clínica** : los síntomas de rinitis alérgica se valoraron antes y después de cada año de **IT** siguiendo los criterios de Okuda establecidos en las planillas de registro diario de los síntomas y signos. Dichos criterios establecen el número de ataques de estornudos, la intensidad de obstrucción nasal y la copiosidad de la rinohidrorrea.

\***Procedimientos estadísticos** : la comparación y la significación entre los grupos se basó en el análisis de la varianza, el test de Student (t), y el valor de la p menor a 0.05.

## **RESULTADOS.**

\***Pruebas cutáneas con Pa** : todos los pacientes de los **grupos A y B** (50 y 20 respectivamente) expusieron positividad entre 5 y 14 mm de eritema-pápula e incluso prurito, a la inoculación del alérgeno. Los sujetos del **grupo C** (20 personas) no expresaron ninguna reacción, sólo al control positivo de histamina 1/1000. Al cabo de los 5 años de **IT**, los integrantes del **grupo A**, habían modificado su reactividad cutánea con disminución de la misma en 38 de ellos (de 14 mm a 6 mm) y negatividad total (de 7 mm a 0 mm) en los 12 restantes. Los pacientes del **grupo B**, que no recibieron **IT**, mantuvieron su reactividad inicial.

Siempre se tuvo en cuenta que las testificaciones con alérgenos se realizaran **sin** la ingesta de anti-H1, anti-depresivos o  $\beta$ -agonistas, por lo menos, 72 horas antes de su realización, y por el mismo profesional en horas de la mañana.

\***Dosajes de las IgE séricas totales (PRIST)** : los valores basales para esta inmunoglobulina fueron los siguientes : **grupo A** :  $225 \pm 160$  KU/L ; **grupo B** :  $150 \pm 120$  KU/L y **grupo C** :  $26 \pm$

18 KU/L.

Luego del primer año de **IT**, en el **grupo A** se detectaron los siguientes valores:  $240 \pm 140$  KU/L, en el **grupo B**:  $160 \pm 130$  KU/L, y en el **grupo C**:  $30 \pm 15$  KU/L.

Como puede advertirse, en los 3 casos, el valor de la p es **NO** significativo.

Luego del segundo año de **IT**, en el **grupo A**: se detectaron estos valores:  $220 \pm 130$  KU/L, en el **grupo B**:  $145 \pm 128$  KU/L, y en el **grupo C**:  $22 \pm 19$  KU/L.

Tampoco en este caso el valor de la p fue significativo.

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A**: mostró valores de  $200 \pm 110$  KU/L, el **grupo B**: de  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C**: de  $24 \pm 20$  KU/L. Si bien la p no llegó al 0.05 se vio una declinación leve en los valores séricos de la IgE en el **grupo A** que recibió **IT**.

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A**: expuso datos de  $180 \pm 90$  KU/L, el **grupo B**: de  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C**: de  $25 \pm 20$  KU/L.

Aquí aparece la  $p < 0.05$  en los datos obtenidos en el **grupo A**, mientras que los demás grupos **no** experimentaron cambios de significación.

Luego del quinto año de **IT**, el **grupo A**: tuvo  $160 \pm 80$  KU/L, el **grupo B**:  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C**:  $22 \pm 18$  KU/L.

Nuevamente la  $p < 0.05$  en los valores detectados sólo en el **grupo A** que recibió **IT** específica.

**\*Dosajes de las IgE-anti-Pa séricas (RAST)**: los valores basales para estos anticuerpos fueron los siguientes: para el **grupo A**:  $0,66 \pm 0,28$  PRU/mL, para el **grupo B**:  $0,53 \pm 0,21$  PRU/mL, y, para el **grupo C**:  $0,05 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del primer año de **IT**, el **grupo A**: reveló  $1,05 \pm 0,37$  PRU/mL, el **grupo B**:  $0,55 \pm 0,22$  PRU/mL y el **grupo C**:  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Se verificó un ligero aumento de la IgE-anti-Pa, pero no llegó a la significación esperada.

Luego del segundo año de **IT**, el **grupo A**, reveló  $0,70 \pm 0,14$  PRU/mL, el **grupo B**,  $0,58 \pm 0,24$  PRU/mL y el **grupo C**,  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A**, reveló  $0,50 \pm 0,16$  PRU/mL, el **grupo B**,  $0,53 \pm 0,22$  PRU/mL y el **grupo C**,  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A**, mostró  $0,38 \pm 0,13$  PRU/mL, el **grupo B**,  $0,55 \pm 0,25$  PRU/mL y el **grupo C**,  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Se detectó aquí una  $p < 0,05$  entre los valores basales y los logrados en el 4° año de **IT**.

Luego de quinto año de **IT**, el **grupo A**, reveló  $0,17 \pm 0,09$  PRU/mL, el **grupo B**,  $0,55 \pm 0,22$  PRU/mL, y el **grupo C**,  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Nuevamente, la  $p < 0,05$  fue indicativa de un descenso estadísticamente significativo de los valores séricos de la IgE-anti-Pa.

**\*Dosajes de las IgG-anti-Pa séricas ( RAST )**: los valores basales para estos anticuerpos fueron los siguientes: para el **grupo A**:  $18.71 \pm 9.12$  IU/mL, para el **grupo B**:  $15.8 \pm 12.33$  IU/mL, y para el **grupo C**:  $0.12 \pm 0.18$  IU/mL.

Luego del primer año de **IT**, el **grupo A** reveló  $85.70 \pm 48.37$  IU/mL, el **grupo B**, mostró  $16.2 \pm 11.38$  IU/mL, y el **grupo C**:  $0.14 \pm 0.18$  IU/mL.

Como se advierte, el **grupo A**, mostró un notable incremento de la IgG-anti-Pa específica, con una significación de  $p < 0.002$ .

Luego del segundo año de **IT**, el **grupo A**, mostró valores de  $186 \pm 88,46$  IU/mL, el **grupo B**, reveló  $18,4 \pm 14,20$  IU/mL, y, el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

En este caso, el incremento de la IgG-específica señaló una  $p < 0,001$ .

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A**, evidenció valores de  $290 \pm 122$  IU/mL, el **grupo B** :  $15,6 \pm 11,4$  IU/mL, mientras que el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

Aquí se aprecia una significación de  $p < 0,001$ .

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A**, mostró valores de  $330 \pm 125$  IU/mL, el **grupo B**,  $17,2 \pm 11,7$  IU/mL, y el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

La significación de los valores del **grupo A** siguen estando en  $p < 0,001$ .

Por fin, luego del quinto año de **IT**, los valores registrados en los **grupos A, B, y C**, fueron, respectivamente, de  $378 \pm 132$  IU/mL, de  $12,9 \pm 10,9$  IU/mL, y de  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

La significación de los valores del **grupo A**, sigue estando en  $p < 0,001$ .

De los anticuerpos estudiados, hasta aquí, se aprecia un **descenso** significativo de la IgE-anti-**Pa** ( $p < 0,05$ ) acompañado por un **ascenso** notable de la IgG-anti-**Pa**, como anticuerpo protector y bloqueante de la reacción alérgica específica a la **Pa**, presumiblemente, integrante de los llamados anticuerpos asimétricos, como se demostró en su momento.

**\*Determinaciones séricas de las IL-2, IL-4 y del IL-4R** : los valores basales de estas citoquinas, es decir, antes de la **IT**, fueron los siguientes : para el **grupo A** : **IL-2** :  $168 \pm 119$  U/mL, **IL-4**:  $152 \pm 70$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2070 \pm 437$  c.p.m.; para el **grupo B** : **IL-2** :  $175 \pm 120$  U/mL, **IL-4** :  $148 \pm 66$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2055 \pm 450$  c.p.m., y para el **grupo C** : **IL-2** :  $122 \pm 66$  U/mL, **IL-4**:  $98 \pm 44$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1278 \pm 301$  c.p.m.

Luego del primer año de **IT**, se registraron los siguientes valores : para el **grupo A** : **IL-2** :  $211 \pm 72$  U/mL; **IL-4** :  $263 \pm 92$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2539 \pm 617$  c.p.m.; para el **grupo B** : **IL-2** :  $180 \pm 100$  U/mL, **IL-4** :  $144 \pm 67$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2033 \pm 550$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2** :  $120 \pm 60$  U/mL, **IL-4** :  $100 \pm 48$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1300 \pm 312$  c.p.m.

Como puede apreciarse, el **grupo A**, **no** expresa significación estadística para la **IL-2**, pero **si** para la **IL-4** ( $p=0,01$ ) y para el **IL-4R** ( $p < 0,05$ ).

Luego del segundo año de **IT**, se detectaron los siguientes hallazgos: para el **grupo A** : **IL-2** :  $160 \pm 114$  U/mL ; **IL-4** :  $147 \pm 75$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2110 \pm 429$  c.p.m. ; para el **grupo B** : **IL-2** :  $170 \pm 95$  U/mL; **IL-4** :  $140 \pm 80$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2010 \pm 600$  c.p.m., y para el **grupo C** : **IL-2** :  $120 \pm 65$  U/mL, **IL-4** :  $100 \pm 50$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1200 \pm 300$  c.p.m.

Como se observa, ninguno de los valores del **grupo A**, mostró significación con respecto a los hallados en las muestras basales.

Luego del tercer año de **IT**, se documentaron los siguientes datos : para el **grupo A**: **IL-2**:  $88 \pm 45$  U/mL; **IL-4** :  $104 \pm 34$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1550 \pm 302$  c.p.m. ; para el **grupo B**: **IL-2** :  $172 \pm 99$  U/mL; **IL-4** :  $138 \pm 77$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2020 \pm 530$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2** :  $130 \pm 69$  U/mL, **IL-4** :  $110 \pm 60$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1200 \pm 310$  c.p.m.

En el **grupo A**, se registran modificaciones en la significación de las citoquinas; así, la **IL-2** presenta  $p=0,05$ , la **IL-4** expone  $p=0,05$  y el **IL-4R**  $p=0,01$ , con respecto a los valores basales.

Luego del cuarto año de **IT**, se registraron los siguientes valores : en el **grupo A** : **IL-2**:  $80 \pm 40$  U/mL, **IL-4** :  $93 \pm 32$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1500 \pm 300$  c.p.m.; en el **grupo B** : **IL-2** :  $168 \pm 93$  U/mL, **IL-4** :  $130 \pm 79$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $2000 \pm 510$  c.p.m.; en el **grupo C**: **IL-2** :  $130 \pm 70$  U/mL, **IL-4** :  $120 \pm 65$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1100 \pm 320$  c.p.m.

En el **grupo A**, vuelven a repetirse los valores estadísticos registrados al finalizar el tercer año de **IT** en todas las citoquinas donde la  $p$  es de  $0,05$ ,  $0,05$  y  $0,01$ , respectivamente.

Luego del quinto año de **IT**, obtuvimos estos valores definitivos para nuestro proyecto : **grupo A**: **IL-2** :  $72 \pm 38$  U/mL ; **IL-4** :  $70 \pm 29$  U/mL, y, para el **IL-4R** :  $1400 \pm 240$  c.p.m. ; **grupo B** :



**IL-2** :  $166 \pm 92$  U/mL, **IL-4** :  $123 \pm 72$  U/mL, y para el **IL-4R** :  $1900 \pm 500$  c.p.m., por fin, el **grupo C**: **IL-2** :  $130 \pm 70$  U/mL, **IL-4**:  $120 \pm 66$  U/mL, y el **IL-4R** :  $1100 \pm 300$  c.p.m.

Se reitera la significación de la  $p=0,05$ ,  $p=0,05$  y  $p=0,01$ , para los valores de las **IL-2**, **IL-4** e **IL-4R**, respectivamente, en comparación con los pre-**IT** para cada citoquina.

**\*RAST- inhibición** : se probó fehacientemente la especificidad de la reacción de los anticuerpos IgE-anti-**Pa**, al lograrse el máximo de inhibición, cercana al 100 % con **Pa**, mientras que las absorciones con los otros alérgenos (pólen de Ambrosia, epitelio de gato y el hongo *Alternaria*) no fueron capaces de bloquear la reactividad de los anticuerpos específicos, y, por ello, su porcentaje de inhibición fue casi despreciable (15-25 %) inducido por fenómenos fisicoquímicos inespecíficos.

Así, con cantidades de  $10^{-6}$  y de  $10^{-5}$  del antígeno, la inhibición fue mínima, mientras que con  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  se dibujó una curva sigmoidea que logró su meseta entre  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ . Los controles no relacionados con el **Pa**, al no bloquear a la IgE-anti-**Pa**, proveyeron una curva casi plana al utilizar las mismas concentraciones desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-1}$ .

**\*SDS-PAGE** : se emplearon mini-geles de 10 x 10 cm cada uno, de 1,5 mm de espesor, de acrilamida al 10%, con gelatina al 0,15%. Se sometieron a 120 V por 2 horas y cuando el control del azul de bromofenol llegó al punto establecido, se cortó la corriente, y los geles se lavaron 2 veces en agua destilada con Tritón-X-100 al 0,1% durante 15 minutos. Luego, se incubaron a 37°C en buffer a pH 6 con 0,1% de 2-[N-morpholino]-ácido etano-sulfónico (MES), Tris AcH 100 mM a pH 3,5 y Tris ClH 100 mM a pH 8,5 con 0,5 mM de dithiothreitol (DTT). La proteína remanente fue coloreada con 0,25 de azul brillante de Coomassie R-250 en metanol/ácido acético/agua 5:1:5 (v/v/v). Luego de la decoloración en metanol al 20% y ácido acético al 10%, las bandas activas aparecieron sin color sobre un fondo azul intenso. El lavado e incubación de los geles se realizó con y sin los inhibidores de las proteasas, como el E64 [L-trans-epoxy-succinyl-leucyl-amido (4-guanidino)-butano] 100  $\mu$ M; tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone (TLCK) 0,5-1 mM; tosyl-phenyl-alanyl-chloro-methyl-ketone (TPCK) 0,5-2 mM; phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) 2  $\mu$ M; leupeptin 100  $\mu$ M; o-phenan-troline 1 mM y pepstatin-A 100  $\mu$ M; o-phenan-troline 1 mM y pepstatin-A 100  $\mu$ M. Los marcadores de los pesos moleculares comparativos fueron: la albúmina sérica bovina (66 kDa), la ovoalbúmina (45 kDa), la anhidrasa carbónica (29 kDa), la  $\alpha$ -2-macroglobulina (180 kDa), la  $\beta$ -galactosidasa (120 kDa), la fructosa-6-fosfoquinasa (84 kDa), la fumarasa (55,3 kDa), la lactato-dehidrogenasa (43.6 kDa) y la triosa-fosfo-isomerasa (30 kDa). En los Western-blots, las muestras fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa, y luego testificadas con suero de conejo anti-**Pa** 1/250 y suero humano anti-**Pa** 1/10.

Luego de una incubación de 12 hs, se trataron con una IgG de cabra anti-conejo y con una IgG de ratón anti-IgE humana, copuladas con fosfatasa alcalina, y reveladas con nitro-blue de tetrazolio y 5-Br-4-chloro-3-indolyl-fosfato. La **Pa** reveló un patrón gelatinolítico en las bandas de 90, 78, 65, 34, 32 y 24 kDa, siendo la mayor actividad a pH 6. Con los inhibidores de las proteasas, se detectaron serin y cistein-proteinasas, del tipo tripsina, las más inmunorreactivas en 90, 78, 65 y 34 kDa. <sup>14-15-16-17-18-19-20</sup>

**\*Fraccionamiento por columnas de Sephadex-G-200 y de DEAE-celulosa** : se obtuvieron proteínas por Sephadex-G-200 entre los tubos 76-115 y por DEAE-celulosa entre los tubos 190-200; las hexosas ocuparon los tubos 12, 64 y 102, en la primera, y los tubos 70, 100 y 150 en la segunda. El Bradford detectó 42 mg/mL de proteínas en **Pa**, mientras que las hexosas eran de 2000 mcg/mL. Se ratifica la composición glucoproteica de **Pa**, y su potencia inmunogénica.

**\*Evaluación clínica :** los datos estadísticos previos a la **IT**, señalaron para los estornudos un valor de  $1,8 \pm 0,77$ , para la rinohidrorrea un valor de  $1,8 \pm 0,4$  y para la obstrucción nasal un valor de  $2 \pm 0,88$ ; después del 1° año de **IT**, los valores **no** fueron estadísticamente significativos (NS). Luego del 2° año de **IT**, se detectaron valores de  $0,6 \pm 0,49$  ( $p < 0,01$ ) para los estornudos, valores de  $0,8 \pm 0,84$  ( $p = 0,01$ ) para la rinorrea y datos de  $0,9 \pm 0,32$  ( $p = 0,01$ ) para la obstrucción nasal. Luego del 3° año de **IT**, se obtuvieron los siguientes valores :  $0,3 \pm 0,48$  ( $p = 0,001$ ) para los estornudos y la rino-hidrorrea, y, de  $0,4 \pm 0,51$  ( $p < 0,001$ ) para la obstrucción nasal. Los hallazgos del 4° y 5° años de **IT**, **no** difirieron de los del 3° año, presentando una gran significación ( $p < 0,001$  y  $p = 0,001$ ), las diferentes evaluaciones. <sup>21-22-23-24-25-26</sup>

## **Proyecto n° 2 : Polen de Lolium perenne (Lp).**

### **MATERIALES Y METODOS.**

**\*Antígeno :** se elaboró en el laboratorio de la División Alergia del Hospital de Clínicas. Los pólenes provistos por Hollister-Stier (Spokane, USA), se extrajeron en buffer salino-fosfato (PBS), por agitación a 4° C, se centrifugaron a 12.500 rpm durante 40 minutos; los extractos clarificados se dializaron en PBS y se esterilizaron con filtros Millipore de 0,22  $\mu$ m. Se trabajó con una mezcla de pólenes de gramíneas compuesta por alícuotas de Anthoxanthum odoratum, Avena fatua, Cynodon dactylon, Festuca elatior, Hordeum vulgare, Lolium perenne, Phleum pratense, Poa pratensis y Sorghum vulgare, y, con el polén de Lolium perenne (**Lp**), a una concentración final de 12.000 mcg/mL. Se realizaron controles de esterilidad y se conservaron a -20°C.

**\*Animales de experimentación :** se usaron 5 conejos albinos adultos que fueron inmunizados con el extracto de **Lp**. Se preparó una emulsión de 1 mL compuesta por 0,5 mL de **Lp** más 0,5 mL de adyuvante de Freund completo. A cada conejo se le administró semanalmente 0,20 mL en el dorso rasurado. Diez días después de la última inyección, fueron sangrados “a blanco” por punción cardíaca, y los sueros obtenidos se conservaron a -20°C. <sup>27-28-29-30-31-32-33</sup>

**\*Pacientes :** fueron 30 personas con polinosis entre septiembre y diciembre, con historia heredo-familiar de atopía, prueba cutánea positiva  $>5$  mm a **Lp** y una IgE sérica total superior a 120 KU/L. Eran 13 varones y 17 mujeres, con edades entre los 18 y los 73 años, residentes en la CABA y en el Gran Buenos Aires. Firmaron el consentimiento informado, y no estaban recibiendo inmunoterapia (**IT**) ni tratamiento inmunosupresor de ningún tipo.

Los controles fueron 25 internados en Medicina Interna, no atópicos, sin historia familiar de alergia, con una IgE sérica total  $<50$  KU/L, y sin reactividad cutánea al **Lp**.

**\*Fraccionamiento cromatográfico en columna de Sephadex G-50 :** 1,5 mL del extracto de 12.000 mcg/mL se filtró por Sephadex G-50, y se recogió en 40 fracciones. La columna fue de 480 mm x 10 mm y se eluyó con buffer PBS 0,15 M de pH 8 y a 4° C. En alícuotas de 1,5 mL se valoraron proteínas por absorbancia a 280 nm de OD en el espectrofotómetro y a 470 nm de OD para las hexosas por el método del indol. <sup>34-35-36-37-38-39-40</sup>

**\*Fraccionamiento cromatográfico en columna de intercambio iónico o de DEAE-celulosa** de 380 mm x 25 mm, con 400 tubos para los eluidos obtenidos con buffer fosfato 0,01 M y de pH 8, con cambios de molaridad de 0,01 a 0,5 M y el pH de 8 a 6.

Se aplicaron las técnicas de Bradford (para proteínas) y del indol (para hexosas).

**\*Pesos moleculares:** marcadores como la albúmina sérica bovina (66 kDa), la albúmina de huevo (45 kDa), la pepsina (34,7 kDa), el tripsinógeno (24 kDa), la  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa), y, la

lisozima (14,3 kDa) se filtraron por Sephadex G-50 a razón de 13.500 mcg en 1,5 mL. Se leyó en el espectrofotómetro a 280 nm OD.

**\*Técnicas inmunológicas :** los extractos fueron testificados contra el suero de conejo anti-**Lp** por Ouchterlony (doble difusión en agar), Boyden (hemaglutinación pasiva) e inmunoelectroforesis para valorar su antigenicidad en los animales.

**\*SDS-PAGE y electroforesis bidimensional :** 400 mg de **Lp** se incubaron 16 hs a 4° C con 4 mL de solución salina (0,85 % p/v NaOH, pH 7,5), y luego 2 hs más a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4000 g por 30 min y el sobrenadante dializado con agua destilada por 16 hs a 4°C se filtró por membrana de 0,22 µm. La electroforesis en una dimensión se corrió en gel de poliacrilamida al 15 %, con 10 mcL de **Lp** (12 mcg), y se tiñó con azul de Coomassie R-250. Para las 2 dimensiones, el **Lp** se disolvió en urea 8 M, Tritón X-100 al 2 %, anfolitos 5/7 al 1,6 % y anfolitos 3/10 al 0,4 %. La corrida se hizo en un Mini-Protean II (Bio-Rad), con una solución catódica 100 mM NaOH, y como anódica 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Se sometió a 750 V por 4,5 hs, y para eliminar la urea se empleó 62 mM Tris-HCl, 10 % glicerol, 2,3 % SDS, azul de bromofenol, pH 6,8.

**\*Inmunotransferencia :** las proteínas del SDS-PAGE se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa, se colocaron por 90 min en TRIS-buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6 con 3 % de leche descremada en polvo), se incubaron con suero de conejo anti-**Lp** 1/100, por un lado, y otras, con sueros humanos atópicos 1/10, por la noche a 4° C. Las primeras, se incubaron con una IgG de cabra anti-conejo 1/2000 conjugada con fosfatasa alcalina por 90 min, y las segundas, con una anti-IgE-humana de cabra 1/1000, marcada con peroxidasa. Se revelaron con 4-cloro-1-naftol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS metanol.

**\*Métodos radioinmunológicos :** el PRIST para los valores de la IgE sérica total, y el RAST para las IgE e IgG específicas anti-**Lp**. El PRIST se midió en KU/L y el RAST-IgE en PRU/mL, mientras que el RAST-IgG anti-**Lp**, anti-F33 y anti-F38, se midió en KU/L. El RAST-anti-**Lp** y anti-fracciones 33 y 38, se hizo por la unión covalente a pH 11 en discos Whatman n° 1 con bromuro de cianógeno.

**\*RAST-inhibición :** valora la especificidad de la IgE-anti-**Lp**, con otros antígenos no relacionados con **Lp**, como fue la **Pa**, los epitelios de gato y de perro y el hongo anemófilo *Alternaria alternata*. Con pasos metodológicos similares a los anteriores, la conclusión reveló un 100% de especificidad inmune.

**\*Determinación de los valores de las IL-2, IL-4 e IL-4R por ELISA :** estas citoquinas se detectaron con igual procedimiento que el de la **Pa**.

**\*Pruebas cutáneas :** los extractos de las gramíneas (1/100), **Lp** (1/100), y sus 14 fracciones, esterilizados por Millipore (0,22 µM), se inyectaron en la cara externa del brazo, con los controles de histamina (1/1000), solución fisiológica estéril y buffer fosfato (pH 7) con material descartable. Las proteínas y hexosas sumaban 120 mcg/mL.

Se leyó a los 20 min cuando la histamina logró su máximo de eritema-pápula, y las realizó el mismo profesional en horas de la mañana.

**\*Inmunoterapia (IT) :** los 30 polínicos constituyeron 3 grupos de 10 pacientes cada uno: (**A**) : recibieron **Lp** total ; (**B**) : recibieron fracción SP-33 (F 33) y el (**C**) : recibió fracción DP-38 (F 38). Se inocularon semanalmente, desde 0,05 hasta 0,50 mL, por vía subcutánea en el brazo, comenzando con 6 mcg de cada alérgeno hasta llegar a 100 mcg, totalizando 15.600 mcg por

persona. Luego de cada inyección, permanecieron 30 minutos en el consultorio en observación y prevención de una reacción adversa.

\***Análisis estadístico** : con la t de Student y el análisis de la varianza. La  $p < 0,05$  fue significativa.

## **RESULTADOS.**

\***Fraccionamiento por Sephadex G-50** : se lograron 3 picos proteicos, (tubos 13, 28 y 33), por absorbancia a 280 nm de DO y 3 picos de hexosas (tubos 2, 8 y 16), a 470 nm de DO, por el método del indol.

\***Fraccionamiento por DEAE-celulosa** : se observan 4 picos proteicos (tubos 25, 38, 55 y 359), a 280 nm de absorbancia, con cambios de molaridad y pH. Se detectan 7 picos de hexosas (tubos 30, 56, 93, 192, 215, 281 y 360), a 470 nm de DO.

\***Determinación cuantitativa de proteínas** : **Lp** concentrado : 12.000 mcg/mL ; Sephadex G-50 : tubo 13 : 50 mcg/mL; tubo 28 : 150 mcg/mL; tubo 33 : 2500 mcg/mL; DEAE-celulosa : tubo 25 : 75 mcg/mL; tubo 38 : 4500 mcg/mL; tubo 55 : 200 mcg/mL y tubo 359 : 125 mcg/mL.

\***Determinación cuantitativa de hexosas** : extracto de **Lp** : 1400 mcg/mL % ; Sephadex G-50, tubo n° 2 : 60 mcg/mL % ; tubo n° 8 : 90 mcg/mL % ; tubo n° 16 : 120 mcg/mL % ; DEAE-celulosa, tubo n° 30 : 90 mcg/mL % ; tubo n° 56 : 180 mcg/mL % ; tubo n° 93 : 40 mcg/mL % ; tubo n° 192 : 150 mcg/mL % ; tubo n° 215 : 120 mcg/mL % ; tubo n° 281 : 90 mcg/mL % y tubo n° 360 : 80 mcg/mL %.

\***Pesos moleculares** : por las bandas de precipitación por las inmuno-difusiones la albúmina sérica bovina/anti-albúmina sérica bovina, por un lado, y, el anti-Lp de conejo/fracciones 13, 28 y 33, y su transporte a una escala semi-logarítmica con el volumen de elución en la abscisa, el valor para el tubo n° 13 fue de 68 kDa, para el n° 28 de 25,5 kDa y para el n° 33 de 18 kDa.

\***Técnicas inmunológicas** : el Ouchterlony reveló bandas de precipitación entre el anti-Lp de conejo y el extracto de gramíneas, 2 con el **Lp** y la fracción n° 38, y una con las n° 33 y 55. Los sueros humanos fueron negativos.

Análogo resultado se obtuvo con la inmuno-electroforesis. La electroforesis unidimensional del **Lp** en SDS-PAGE al 15% visualizó varias bandas entre los 19 y 97 kDa. En la bi-dimensional, se vieron 5 manchas o "spots" mayoritarios. El spot 1 presentó 48,6 kDa con un pI de 3; los spots 2, 3 y 4 poseían 31,5 kDa, y podrían ser isoformas de una proteína, con un pI entre 9 y 10; el spot 5, reveló 21,8 kDa y se halló en la zona básica. La inmuno-transferencia del anti-Lp exhibió bandas entre los 28 y 97 kDa, siendo las más importantes las de 37 y 40 kDa y 45 y 60 kDa, mientras que otras lo hicieron entre 90 y 95 kDa.

Los sueros humanos anti-Lp revelados con una anti-IgE de cabra, mostró bandas entre los 29 y 97 kDa, las más significativas entre los 37 y 40 kDa, y entre los 45 y 60 kDa. Otras menos importantes se situaron entre 90 y 95 kDa.

\***Métodos radioinmunológicos** : en el grupo control la IgE sérica total fue de 13 a 68 KU/L, mientras que los atópicos tuvieron entre 90 y 1250 KU/L, con un promedio de 472 KU/L. La IgE-anti-Lp fue de clase 0 en el control, y para los atópicos de clase 0 en 11 pacientes, de clase 1 en 11 y de clase 2 en 8 pacientes.

La IgE mono-específica reveló valores significativos para las fracciones SP-33, DP-38, DH-56 y DH-192.

La IgG-anti-Lp tuvo en los atópicos un  $\bar{x}$  de 391,4 KU/L, y en el control no superó 50 KU/L.

Las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-4R, descendieron desde el 2° año de **IT**, y en el 5° año, la significación fue de una  $p < 0,02$  para la IL-2, una  $p < 0,01$  para la IL-4 y una  $p < 0,001$  para el IL-4R.

**\*Pruebas cutáneas :** los controles fueron negativos para todos los alérgenos. Los atópicos presentaron reacciones de eritema-pápula mayor de 5 mm con la mezcla de gramíneas, 1/100, **Lp** 1/100, las fracciones SP-33, DP-38, y DH-56, 192 y 360.

**\*Inmunoterapia (IT) :** en los grupos **A**, **B** y **C**, descendió la IgE – anti-**Lp** al cabo de los 5 años. La IgG-anti-**Lp**, se incrementó en todos los grupos.

En el grupo **A**, la **IT** con **Lp** descendió la IgE-PRIST de 495 a 290 KU/L ( $p=0,20$ ); en los grupos **B** (SP-33) y **C** (DP-38), desde 401 KU/L pasó a 240 KU/L ( $p=0,20$ ) y desde 520 KU/L bajó a 235 KU/L ( $p=0,20$ ).

El grupo **A** vacunado con **Lp** mostró el descenso de la IgE-anti-**Lp** desde 0,99 PRU/mL a 0,23 PRU/mL ( $p < 0,05$ ) y un ascenso de la IgG-anti-**Lp** desde 379 KU/L hasta 940 KU/L ( $p = 0,10$ ), con mejoría sintomática correlativa. El grupo **B**, vacunado con SP-33 mostró un descenso de la IgE-anti-**Lp** de 1,34 PRU/mL a 0,40 PRU/mL ( $p < 0,01$ ), y de la IgE-anti-SP-33 de 0,44 PRU/mL a 0,12 PRU/mL ( $p < 0,01$ ), mientras que la IgG-anti-**Lp** ascendió de 418 KU/L a 970 KU/L ( $p = 0,10$ ) y la IgG-anti-SP-33 desde 132 KU/L a 503 KU/L ( $p < 0,05$ ). El grupo **C** vacunado con DP-38 mostró un descenso de la IgE-anti-**Lp** desde 1,02 PRU/mL a 0,29 PRU/mL ( $p = 0,10$ ), y de la IgE-anti-DP-38 desde 0,66 PRU/mL a 0,21 PRU/mL ( $p < 0,05$ ), mientras que la IgG-anti-**Lp** ascendió desde 377 KU/L hasta 960 KU/L ( $p = 0,10$ ) y la IgG-anti-DP-38 desde 114 KU/L hasta 444 KU/L ( $p < 0,05$ ).<sup>41-42-43-44-45</sup>

**\*Determinación de los valores de las IL-2, IL-4 e IL-4R después de la IT :** los valores basales fueron: para el **grupo A**, IL-2 de  $172 \pm 110$  UI/mL; IL-4 de  $230 \pm 110$  UI/mL e IL-4R de  $2500 \pm 400$  c.p.m.; el **grupo B** : IL-2 de  $190 \pm 120$  UI/mL; IL-4 de  $265 \pm 100$  UI/mL e IL-4R de  $3000 \pm 600$  c.p.m., y, el **grupo C** : IL-2 :  $250 \pm 105$  UI/mL, IL-4 de  $255 \pm 90$  e IL-4R :  $3000 \pm 650$  c.p.m. Al cabo de los 5 años consecutivos de **IT**, se lograron estos valores con su significación estadística: el **grupo A**: la IL-2 de  $100 \pm 60$  UI/mL ; la IL-4 de  $120 \pm 60$  UI/mL y el IL-4R de  $2000 \pm 200$  c.p.m. con una  $p < 0.05$  ; el **grupo B**: la IL-2 de  $160 \pm 90$  UI/mL; la IL-4 de  $100 \pm 60$  UI/mL y el IL-4R de  $1200 \pm 250$  c.p.m. con una  $p < 0.001$  y el **grupo C**: la IL-2 de  $180 \pm 80$  UI/mL; la IL-4 de  $120 \pm 75$  UI/mL, y el IL-4R de  $1200 \pm 400$  c.p.m., con una  $p < 0.001$ .

### Proyecto n° 3 : Hongo anemófilo Bipolaris australiensis (Ba).

#### MATERIALES Y METODOS.

**\*Antígeno : Ba** es un hongo ambiental, teleomorfo, llamado también Cochliobolus sp, con colonias de rápido crecimiento, difusas, de color gris a marrón negruzco, cuya imagen inversa es flocoso de color negro. La microscopía muestra el desarrollo de color marrón claro pigmentado, pseudoseptante con conidios geniculados o en zig-zag del talo. Los conidios son producidos a través de poros en la pared del conidióforo (poroconidia) y son rectos, fusiformes o elipsoidales, redondeados en ambos extremos, lisos a finamente rugosos y con germinación sólo en los extremos (bipolar). El género Bipolaris contiene cerca de 45 especies que son, sobre todo, subtropicales y parásitos de plantas tropicales, sin embargo, varias especies, en particular **Ba**, B. hawaiiensis y B. spicifera, están bien documentados como patógenos humanos. Las manifestaciones clínicas incluyen la queratitis micótica, la feohifomicosis subcutánea y sinusal, la peritonitis en pacientes

con diálisis peritoneal continua ambulatoria y en infecciones cerebrales, tanto en normales como en inmunosuprimidos.

Drechslera, Bipolaris, Curvularia y Exserobolium están relacionados y la diferenciación de los géneros se basa en una combinación de caracteres incluyendo la forma de los conidios, la presencia o ausencia de un hilo que sobresale, el contorno de la porción basal del conidio y su hilo, y, en la secuencia y la localización de los septos.

Se han descrito casos de infecciones importantes en inmuno-suprimidos y en atópicos, como la sinusitis alérgica fúngica (SAF). <sup>46-47-48-49-50-51-52</sup>

El **antígeno** que se empleó fue preparado según la metodología de Frugoni y Hansen en su texto clásico. Su contenido proteico por el Bradford fue de 13 mg/mL y la detección de hexosas también fue positiva por el método del indol, lo cual permite sospechar la presencia de glicoproteínas.

**\*Pacientes :** se estudiaron 12 varones derivados de la Cátedra de Otorrinolaringología, con edades entre los 22 y 39 años, con el diagnóstico de SAF, corroborado por los estudios especializados y por el cultivo micológico. Todos ellos eran atópicos, con historia heredo-familiar, y con una IgE-sérica total (PRIST) elevada de  $230,50 \pm 115,39$  KU/L. Padecían una rinitis crónica, que trataban con aerosoles descongestivos o fármacos antihistamínicos anti-H1 con y sin vasoconstrictores. Ninguno padecía de asma bronquial. No empleaban otros fármacos, no eran fumadores, y firmaron el consentimiento informado requerido. <sup>53-54-55-56-57</sup>

**\*Pruebas cutáneas :** se realizaron micropápulas de 0,025 mL, con alérgenos ubicuos del hábitat, y el extracto de **Ba**, con lectura a los 20 min, y controles de histamina 1/1000 y solución fisiológica pH 7,2. Fueron realizadas por el mismo profesional y en horas de la mañana. Los 12 pacientes resultaron positivos ( $> 20$  mm), al extracto de **Ba**. Ninguno sufrió una reacción adversa.

**\*Métodos radioinmunológicos :** la IgE-sérica total (PRIST) se midió en condiciones basales, y luego de cada año de **IT** hasta los 5 años, y se midió en KU/L ; la IgE-anti-**Ba**, y la IgG-anti-**Ba**, se midieron por RAST, desde el inicio de la **IT** hasta los 5 años de la misma, y se midieron en PRU/mL (Phadebas Rast Units), en clases de 0-0,35; 0,35-0,70; 0,70-3,50; 3,50-17; 17-50 y 50-100, y más de 100 PRU/mL.

**\*Inmunoterapia (IT) :** al poseer una IgE-anti-**Ba**, pruebas cutáneas positivas al **Ba**, y la SAF, se les propuso la **IT** para valorar su incidencia en su evolución clínica.

De los 12 pacientes, 5 de ellos NO aceptaron la **IT**, por razones laborales, de distancia y de escasa credibilidad en la misma, por lo cual se comportaron como un grupo control atópico sin **IT**, que aceptaron dado que debían concurrir para su control periódico. Así, los 7 que aceptaron la **IT**, recibieron dosis semanales del extracto de **Ba** por vía subcutánea en el brazo, desde una dilución 1/100.000 hasta la de 1/10 a lo largo de los 5 años programados.

Los que NO hicieron vacunoterapia, realizaron tratamiento sintomático para su rinitis perenne, y, eventualmente, instilación de los senos paranasales con anfotericina-B o itraconazol, según la evolución de su SAF.

## **RESULTADOS.**

Los 7 pacientes vacunados, sin medicación anti-fúngica, sólo recibieron tratamiento sintomático para su rinitis crónica. Iniciaron la **IT** con **Ba**, y eran controlados en el acto de su vacunación, por posibles reacciones locales y/o generales. Las modificaciones de los valores séricos de las IgE e IgG específicas anti-**Ba**, obtenidos por los métodos radio-inmunológicos, se consignan en las Tablas 1 y 2.

Se advierte que la IgE-anti-**Ba** en el grupo vacunado experimentó cambios significativos, ya que, antes de la vacunación sus valores eran de  $0,985 \pm 0,455$ , y que después de la vacunación dichos valores fueron de  $0,29 \pm 0,165$ , donde la  $p < 0,02$ . En los NO vacunados, los dosajes de las IgE-anti-**Ba**, sufrieron escasas modificaciones pues de valores iniciales de  $1,02 \pm 0,327$  a los 5 años se detectaron  $1,12 \pm 0,318$  con una  $p = 0,50$ , no significativa.

El dosaje por ELISA de las IL-2, IL-4 e IL-4R, del grupo vacunado por 5 años, fue concordante con el descenso de la IgE-anti-**Ba**, y, el ascenso de la IgG-anti-**Ba**, como un índice más de la actividad de la **IT** sobre el sistema inmune del atópico, induciendo una “reeducción” del mismo. La IL-2 descendió hasta valores con una  $p < 0,02$  respecto al basal, la IL-4 mostró una  $p < 0,01$ , y, el receptor IL-4R tuvo un descenso  $p < 0,001$ , lo cual lleva a sospechar que su funcionalidad se halla disminuida por menor estímulo de la IL-4.

El grupo que NO recibió **IT** sólo mostró ligeros cambios en los niveles de las citoquinas, pero cuya significación fue una  $p = 0,50$ , independientemente de los tratamientos otorrinolaringológicos recibidos.

La **IT** modificó la IgG-anti-**Ba** en los 7 pacientes, de la siguiente forma :

paciente n° 1 : basal 50 UI/ml asciende a los 5 años a 150 UI/ml;

paciente n° 2 : basal 44 UI/ml, a los 5 años : 280 UI/ml ;

paciente n° 3 : basal 32 UI/ml , a los 5 años : 350 UI/ml;

paciente n° 4 : basal 68 UI/ml , a los 5 años : 190 UI/ml;

paciente n° 5 : basal 12 UI/ml, a los 5 años : 170 KU/ml ;

paciente n° 6 : basal 24 UI/ml, a los 5 años : 140 UI/ml, y,

paciente n° 7 : 28 UI/ml , a los 5 años : 235 UI/ml.

La estadística señala que la IgG- anti-**Ba** del grupo vacunado muestra  $36,85 \pm 18,61$  UI/ml como valores basales y  $216,42$  UI/ml  $\pm 76,34$  UI/ml a los 5 años, con una  $p < 0,001$ .

Con respecto al grupo NO vacunados con **Ba**, los valores son :

paciente n° 8 : basal 33 UI/ml y para los 5 años: 40 UI/ml;

paciente n° 9 : basal 100 UI/ml y a los 5 años : 140 UI/ml;

paciente n° 10 : 20 UI/ml, y a los 5 años, 30 UI/ml;

paciente n° 11 : basal 40 UI/ml y a los 5 años, 50 UI/ml, y,

paciente n° 12 tuvo un basal de 50 UI/ml y a los 5 años tuvo 70 UI/ml.

La estadística señaló que la IgG-anti-**Ba** de los NO vacunados, NO mostró cambios, dado que los valores iniciales eran  $48,6 \pm 30,73$  UI/ml, y, a los 5 años :  $66 \pm 43,93$  UI/ml, con una  $p = 0,50$ .

La SAF es una entidad clínica novel que aqueja a los sujetos atópicos sanos, mientras que, pacientes inmunocomprometidos sufren serias micosis en los senos paranasales y cavidades anexas.

Publicaciones previas probaron la participación de varios hongos anemófilos en la patología broncopulmonar; así, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Absidia* sp., entre otros, se vincularon con inflamaciones e infecciones crónicas del árbol respiratorio. Realizamos una modesta experiencia en cobayos y valoramos la capacidad de **Ba** para inducir una inflamación crónica de la mucosa respiratoria debida a los componentes metabólicos del hongo (p.ejem. proteasas), y no a la presencia del mismo, tal como se demostró en la ABPA con las enzimas del *Aspergillus fumigatus*. Estos péptidos, se comportan a su vez, tanto en animales como en los humanos, como potentes antígenos promoviendo una respuesta inmune específica, con anticuerpos, citoquinas e infiltrados celulares macrófago-linfocito dependientes. La síntesis de la

IgE podría coadyuvar en el empeoramiento de la inflamación, no obstante no detectarse mastocitos en las histopatologías estudiadas. La presencia de la IgG estimularía a los macrófagos a través de su RFc- $\gamma$ , aunque la respuesta inmune es típicamente del tipo IV de Gell & Coombs, con sus variantes IV-a, IV-b, IV-c y IV-d. El empleo de anticuerpos anti-CD4+ y anti-CD8+ ratificó la abundancia de ambas poblaciones linfocitarias.

## **DISCUSION.**

Se presentan 3 modelos humanos de hipersensibilidad a alérgenos del hábitat. Todos ellos eran enfermedades respiratorias **atópicas**, cuyas bases genéticas fueron expuestas. Esta inflamación crónica de la mucosa respiratoria, posee numerosas formas de tratamiento, alivio y mejoría, modificando el infiltrado celular, y los factores que de él dependen. Aquí, exponemos los datos hallados al emplear una forma de terapia inmunológica, como es la vacunoterapia con alérgenos, o **inmunoterapia (IT)**, que se aplica desde Noon y Freeman, en 1911.

Creemos que la **IT** es algo más que un tratamiento exitoso, y que “reeduca” a las células involucradas en esta patología, y, que es una forma **epigenética** de devolverle la “normalidad” a ese genoma, sin alterar su constitución intrínseca, pero modificando el comportamiento de alguno de los elementos constitutivos del núcleo celular, que “silenciarían” por un tiempo poco definido aún, el erróneo comportamiento de los genes de los atópicos y su incesante lucha contra un medio-ambiental “hostil” por las partículas (glicoproteicas) de muy variados orígenes que lo acosan.

La **inmunoterapia** significa la readaptación del atópico a una mejor calidad de vida casi similar a la del no-atópico, y se constituye así, hasta ahora, en el único tratamiento posible, accesible, y que, requiere mucha más investigación acerca de la mejor vía de administración (subcutánea, oral, sublingual, por aerosol), tal como lo manifestó en 1998, la **OMS** en su Informe Técnico sobre **Inmunoterapia en Alergia**.

Será de trascendental importancia el poder vincular las modificaciones citológicas, los valores de las IgE e IgG, y de las IL-2, IL-4 e IL-4R, antes y después de la **inmunoterapia**, con los cambios del ADN y sus posibles metilaciones, u otros cambios fisicoquímicos en las histonas y enzimas que intervienen, al igual que en los ARNi y ARNmi, detectando secuencias metiladas en los genes, así como, inhibición de las quinasas dependientes de las ciclinas p15, p16 y RASSF1A.

La **inmunoterapia** subcutánea al incentivar a las poblaciones linfoideas residentes en los ganglios linfáticos regionales desencadena un mecanismo de procesamiento y presentación antigénicos, que induce a las células dendríticas, a los LT-CD4, LT-CD8 y LT-Reg, así como, a los LB y a los plasmocitos, a desarrollar una respuesta inmune específica contra el alérgeno, pero que, al cabo de cierto tiempo de reiteración, le provoca cambios sub-celulares poco conocidos, modificando su estrategia original regida por el código atópico, en un activo mecanismo para contrarrestar los efectos deletéreos del alérgeno en el organismo (mucosa respiratoria en estos 3 casos).

Esta presión, éticamente aceptable, que desde el exterior ejercemos sobre el sistema inmune del atópico con el propósito de mejorar su condición clínica, creemos que es una forma de **epigenética** para el atópico, y aún para sus descendientes, basados en los hallazgos de aquella en la embriogénesis humana.<sup>57-58-59-60-61-62</sup>



**BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Kaminker P. : Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. Arch. Argent. Pediatr., 2007 ; 105 (6) : 529-531.
- 2.- González S.J., Cristiano E., Argibay P. : Epigenética y epigenoma. Medicina (Bs.As.), 2011 ; 71 (4) : 89-95.
- 3.- Alonso A., Albónico J.F., Scavini L.M., Rodríguez S.M., Pionetti C.H. : Immunochemical properties of the antigens of *Periplaneta americana*. Allergol et Immunopathol., 1987 ; 15 : 109-115.
- 4.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H. : Interstitial pneumonitis induced in guinea pigs by the antigens of *Periplaneta Americana*. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1992 ; 2 : 263-267.
- 5.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H. : Immunological changes during cockroach immunotherapy. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1999 ; 9 : 299-304.
- 6.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K. : Cross reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*. J. Invest. Allergol Clin Immunol., 1996 ; 6 : 301-306.
- 7.- Arruda L.K. : Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins as a cause of IgE antibody responses. J. Biol. Chem., 1995 ; 270 : 31196-31201.
- 8.- Barret A.J. : Classification of peptidases. Meth. Enzymol., 1994 ; 244 : 1-15.
- 9.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem., 1976 ; 72 : 248-254.
- 10.- Frugoni C. : Preparación de extractos alérgicos. En : Alergia Clínica. Hansen K. y Werner M. – Salvat, Barcelona, 1970, p.586.
- 11.- Irañeta S.G., Albónico J.F., Alonso A. : Proteinase and gelatinolytic activities of house-dust mite and cockroach extracts. J. Invest. Allergol. Clin Immunol., 1999; 9: 235-240.
- 12.- Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970 ; 227 : 680-685.
- 13.- Towbin H. : Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci .USA., 1979 ; 76 : 4350-4354.
- 14.- Berger S.L. : An operational definition of epigenetics. Genes Dev., 2009; 23 : 781-783.
- 15.- Waddington C.H. : Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1939; 25 : 299-307.
- 16.- Garcia Giménez J.L. : Epigenética. La gramática del código genético. Journal of Feelsynapsis. ISSN 2254-3651, 2012 ; 4 : 34-38.
- 17.- Watt W.B. : Adaptive significance of pigment polymorphisms in *Colias* butterflies. PNAS, 1969 ; 63 (3) : 767-774.
- 18.- Nijhout H.F. : Control mechanisms of polymorphic development in insects. BioScience, 1999 ; 42 : 181-192.
- 19.- Kroon F.J. : Aromatase pathway mediates sex change in each direction. Proceedings Biological Sciences, 2005 ; 272 : 1399-1405.
- 20.- Kucharski R. : Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. Science, 2008 ; 319 : 1827-1830.
- 21.- Black M.P. : Reproduction in context : field testing a lab model of socially controlled sex change in *Lythrypnus dalli*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005 ; 318 : 127-143.

- 22.- Jaenisch R. : Epigenetic regulation of gene expression : how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Rev.Genet.*, 2003 , 33 .245-254.
- 23.- Jirtle R. : Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, 2007 ; 8 (4) : 253-262.
- 24.- Ting A. : The cancer epigenome components and functional correlates. *Genes Dev.*, 2006 ; 20 (23) : 3215-3231.
- 25.- Rivenbark A.G. : The use of epigenetic biomarkers for preclinical detection of hepatocellular carcinoma : potential for noninvasive screening of high-risk populations. *Clinical Cancer Research*, 2007 ; 13 : 2309-2312.
- 26.- Emlen D.J.: Integrating development with evolution : a case study with beetle horns. *BioScience*, 2000; 50 : 403-418.
- 27.- Mark A. : Targeting epigenetics readers in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012; 367: 647-657.
- 28.- Felsenfeld G. : Controlling the double helix. *Nature*, 2003 ; 241 : 448-453.
- 29.- Adcock I.M. : Epigenetics and airways disease. *Respir. Res.*,2006 ; 7 : 21-40.
- 30.- Buj R. : Quantification of unmethylated Alu (QUAlu) : a tool to assess global hypomethylation in routine clinical samples. *Oncotarget*, 2016 : <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7233>
- 31.- Bedregal P. : Aportes de la epigenética en la composición del desarrollo del ser humano. *Rev. Med. Chile*, 2010; 138 : 366-372.
- 32.- Rico Rosillo G. : Epigenética, medio ambiente y asma. *Revista Alergia México*, 2014 ; 61 : 99-109.
- 33.- Pascual M. : Epigenetic aspects of the allergic diseases. *Front. Biosci*, 2010 ; 2 : 815-824.
- 34.- Sircac G. : Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Front. Genet.*, 2014 ; 4 : 308-320.
- 35.- Brand S. : DNA methylation of Th1/Th2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012 ; 129 : 1602-1610.
- 36.- Abramson M.: Is allergen immunotherapy effective in asthma ? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Am.J.Resp.Crit.Care Med.*, 1995; 151 : 969-974.
- 37.- Ansari A.A.: Human immune responsiveness to *Lolium perenne* pollen allergen Lol p III (rye III) is associated with HLA-DR3 and DR5. *Human Immunol.*, 1989; 25 :59-69.
- 38.- Ansari A.A. : An investigation of human immune response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p X). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987; 80: 229-234.
- 39.- Ansari A.A.: Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* pollen allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264 : 11181-11188.
- 40.- Armentia A. : Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen? *Allergol et Immunopathol.*, 2002 ; 30 : 218-224.
- 41.- Blaher B. : Identification of T-cell epitopes of Lol p 9 a major allergen of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996 ; 98 : 124-128.
- 42.- Cabrera A.L. : Flora de la Provincia de Buenos Aires: Gramíneas. Colección Científica del INTA, 1970 ; IV (II) : 1-18.
- 43.- Cottam G.P. : Physicochemical and immunochemical characterization of allergenic proteins from rye grass (*Lolium perenne*) pollen prepared by a rapid and efficient purification method. *Biochem J.*, 1986 ; 234 : 305-310.
- 44.- Foucard T. : Allergen-specific IgE and IgG antibodies in pollen-allergic children given immunotherapy for 2-6 years. *Clin. Allergy*, 1978 ; 8 : 249-255.

- 45.- Guerra F. : Th2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001 ; 107 : 647-653.
- 46.- Moingeon P. : Specific immunotherapy for common grass pollen allergies : pertinence of a five grass pollen vaccine. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2008; 146 (4): 338-342.
- 47.- Subiza F.J. : Recuento de pólenes. En: *Tratado de Alergología de Pelaez Hernández A. y Davila González I.J.* : Edit. Ergon, 2007 ; I (23) : 415-424.
- 48.- Albónico J.F., Tiraboschi I.N. : La sinusitis fúngica alérgica. En *Temas de Inmunoalergia.*, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs.. 99-114.
- 49.- Campana N.R., Alonso A. : La poliposis endonasal recidivante. En *Temas de Inmunoalergia*, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 57-97.
- 50.- Alonso A., Campana N.R., Albónico J.F., Mouchián K., Kaimen-Maciél I. : Aspectos inflamatorios de la poliposis endonasal recidivante (PENAR). *Prensa méd. argent.*, 2009 ; 96 (4) : 197-205.
- 51.- Clarke S.R. : Allergic fungal sinusitis. *J. La State Med. Soc.*, 1998 ; 150 : (6), 248-252.
- 52.- De Shazo R.D. : Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995 ; 96 : 24-35.
- 53.- Folker R.J. : Treatment of allergic fungal sinusitis : a comparison trial of postoperative immunotherapy with specific fungal antigens. *Laryngoscope*, 1998 ; 108 : 1623-1626.
- 54.- Gourley D. : Bipolaris sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1990; 85: 583-591.
- 55.- Mabry R.L. : Immunotherapy for allergic fungal sinusitis : three years' experience. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, 1998; 119 : (6) : 648-651.
- 56.- Sánchez Sánchez B. : Allergic fungal sinusitis. *Rev. Alergia Mex.*, 1999; 46 (5) : 145-150.
- 57.- Shubert M.S.: Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998 ; 102 : 387-394.
- 58.- Alonso A., Albónico J.F., Tiraboschi I.N., Mouchián K., Pionetti C.H., Irañeta S.G., Kaimen-Maciél I. : Patogenia e inmunoterapia en la sinusitis fúngica alérgica (SAF). *Prensa méd. argent.*, 2009; 96 (7) : 407-410.
- 59.- Alonso A., Mouchián K., Irañeta S.G., Rodríguez S.R., Albónico J.F. : Utilidad de la vacunoterapia con *Bipolaris australiensis* en la sinusitis alérgica fúngica. *Prensa méd argent*, 2012 ; 10 : 95-104.
- 60.- Alonso A., Iovannitti C., Rodríguez S.R., Mouchián K., Albónico J.F.: Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por *Bipolaris australiensis*. *Prensa méd argent.*, 2013 ; 99 (6) : 426-431.
- 61.- Alonso A., Rosetti F. A., Rodríguez S.R., Mouchián K., Albónico J.F. : IgE and IgG antibodies against *Bipolaris australiensis* (Ba) in allergic fungal sinusitis. *Clin. Microbiol.*, 2015 ; 4 : 204. <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000204>
- 62.- Mouchián K. : Tesis de Doctorado. Biblioteca de la Facultad de Medicina. "Aislamiento y caracterización de las fracciones antigénicas del polen de la gramínea *Lolium perenne* y su relación con la polinosis". Año 2011.



TABLA 1.

Valores de la IgE sérica total y específica antes y después de la inmunoterapia.

Pac n°	IgE basal KU/L	IgE-RAST-basal anti-Ba. (PRU/mL)	IgE-RAST-anti-Ba después de 5 años. (PRU/mL).
1 :	130	1,40	0,20
2 :	162	0,45	0,10
3 :	184	0,65	0,30
4 :	220	0,60	0,40
5 :	145	1,70	0,35
6 :	370	1,10	0,10
7 :	135	1,00	0,60

**Grupo Control que no realizó vacunoterapia :**

8 :	600	0,90	0,90
9 :	120	1,20	1,50
10 :	330	0,80	1,20
11 :	410	0,70	0,70
12 :	280	1,50	1,30

Valor promedio de la IgE sérica total basal de la población estudiada :  
230,50 KU/L con un DE  $\pm$  115,39 KU/L.

IgE específica : grupo vacunado : antes : x : 0,985 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,455 PRU/mL ; después de 5 años : x : 0,29 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,165 PRU/mL.  
p  $\leq$  0.02.

IgE específica : grupo no vacunado : antes : x : 1,02 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,327 PRU/mL ; después de 5 años : x : 1,12 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,318 PRU/mL.  
p = 0,50

---

TABLA 2

Valores de la IgG sérica específica antes y después de la inmunoterapia.

	IgG-RAST-basal Anti-Ba.	IgG-RAST-anti-Ba. después de 5 años
1 :	50	150
2 :	44	280
3 :	32	350
4 :	68	190
5 :	12	170
6 :	24	140
7 :	28	235

**Grupo control que no realizó vacunoterapia :**

8 :	33	40
9 :	100	140
10 :	20	30
11 :	40	50
12 :	50	70

IgG-RAST-grupo vacunado : basal :  $x : 36,85$  UI/ml con un  $DE \pm 18,61$  UI/ml ;

A los 5 años :  $x : 216,42$  UI/ml con un  $DE \pm 76,34$  UI/ml ;  $p \leq 0,001$ .

IgG-RAST-grupo no vacunado : basal :  $x : 48,6$  UI/ml con un  $DE \pm 30,73$  UI/ml ;

A los 5 años :  $x : 66$  UI/ml con un  $DE \pm 43,93$  UI/ml ;  $p = 0,50$ .

---

Pico proteico de Pa por columna de Sephadex G - 200.

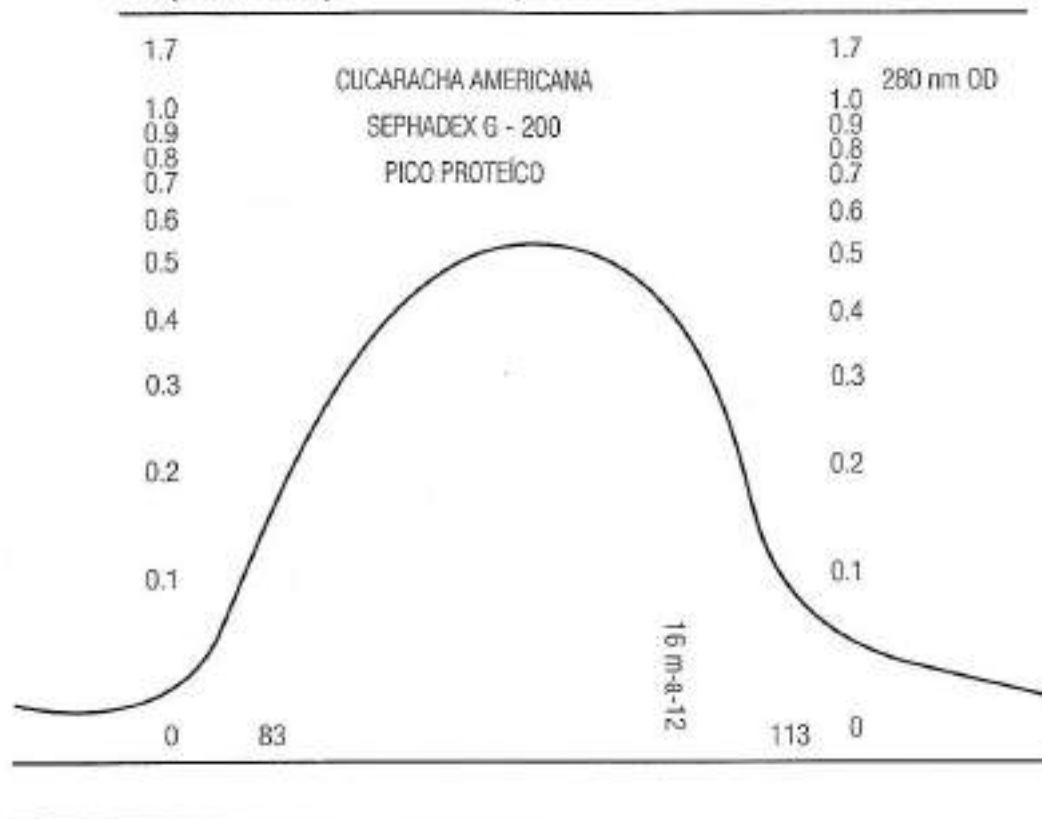


Figura 1

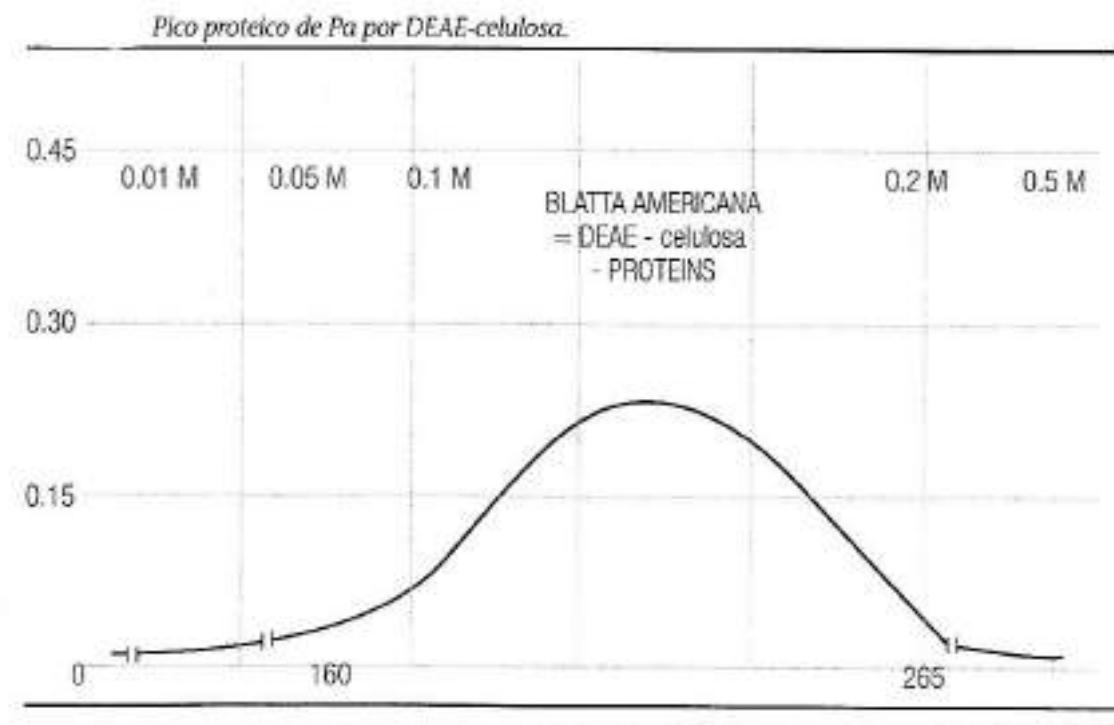


Figura 2



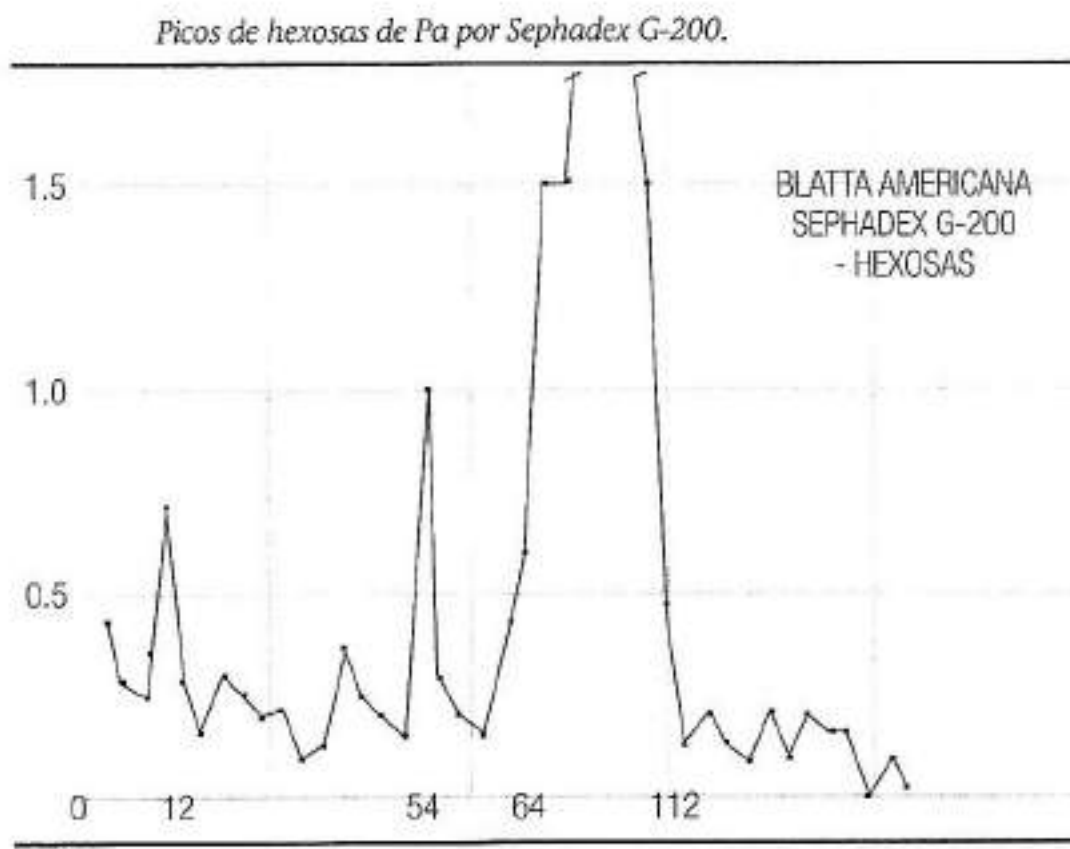


Figura 3

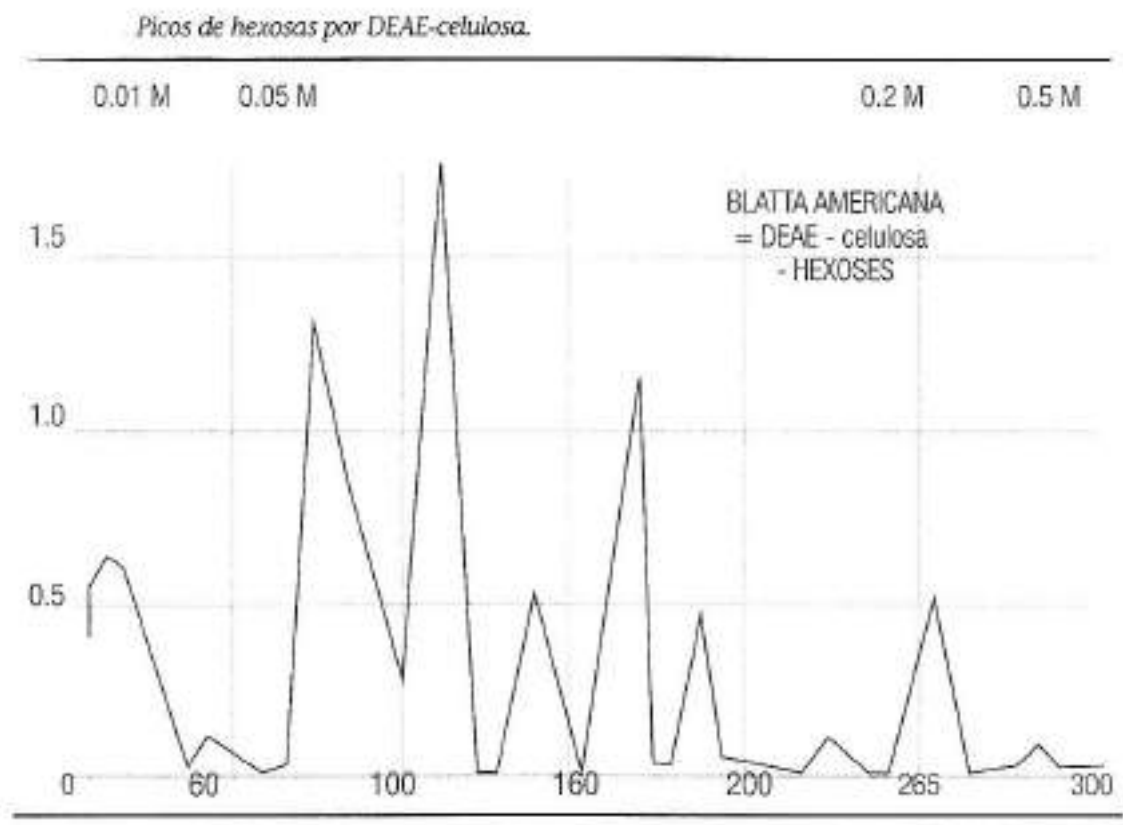


Figura 4

Ouchterlony: P es Pa; G es *Blatta germánica*; S: suero-anti-Pa. Hay identidades entre ambos extractos.

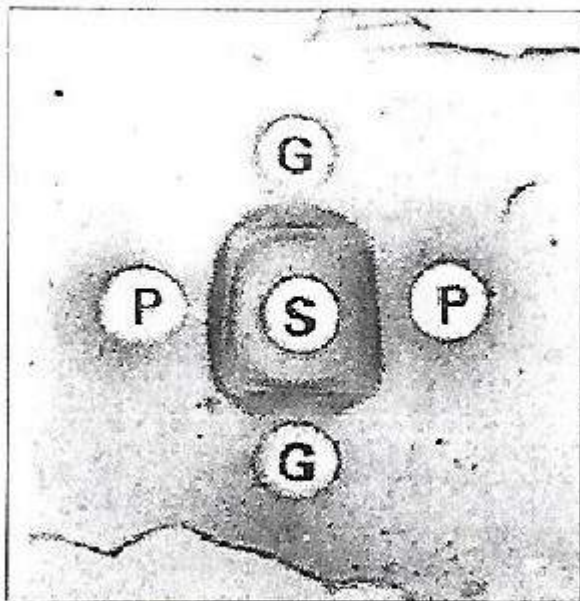


Figura 5

---

*. Pesos moleculares de mar-  
cadores y de Pa.*

---

1. CARBONIC ANHYDRASE
2. ALBUMIN, BOVINE
3. ALCOHOL DEHYDROGENASE
4. AMYLASE
5. APOFERRITIN
6. THYROGLOBULIN
7. BLATTA AMERICANA

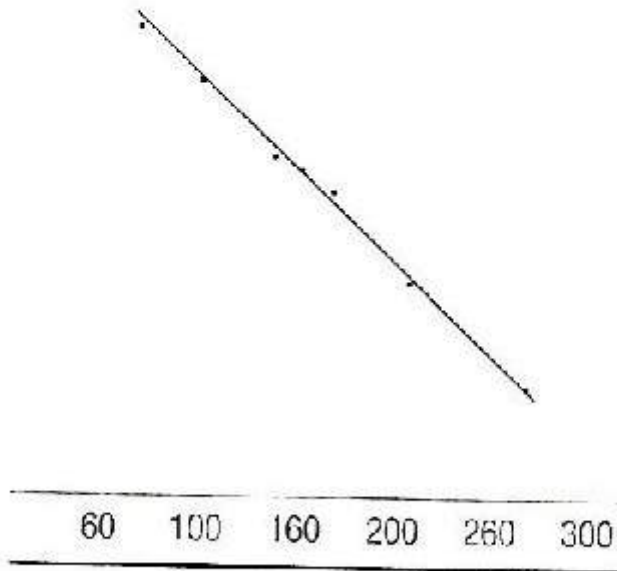
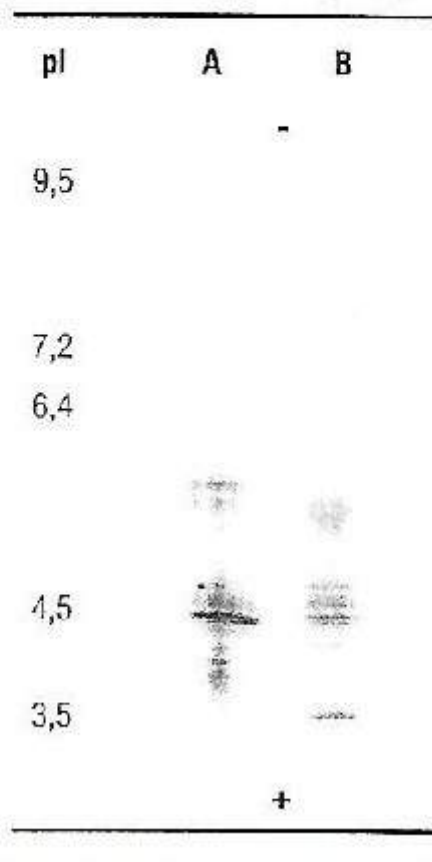


Figura 6

---

## Figura 7

*Isoelectrofo-  
que entre Ti (A) y Pa (B).  
Bandas comunes a igual pI.*



## Figura 8

*Bandas similares a iguales kDa:  
Electroforesis en gel de  
poliacrilamida de ex-  
tractos de Triatoma in-  
festans (Ti) y Periplaneta  
americana (Pa).*

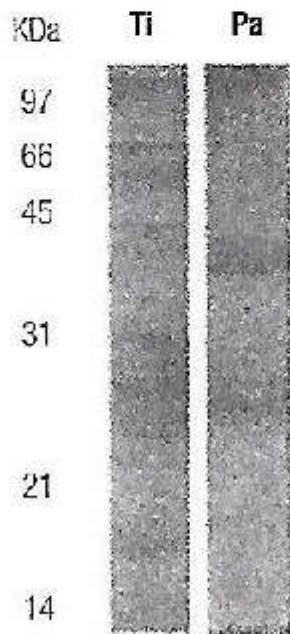
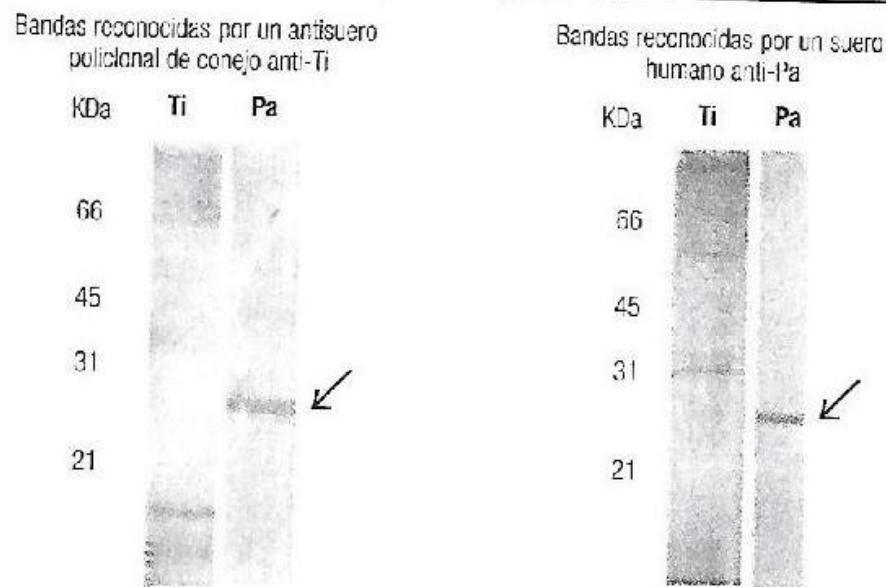


Figura 9

*Bandas detectadas por 2 antisueros diferentes. Ensayos de reactividad cruzada entre los extractos de Triatoma infestans (Ti) y Periplaneta americana (Pa).*



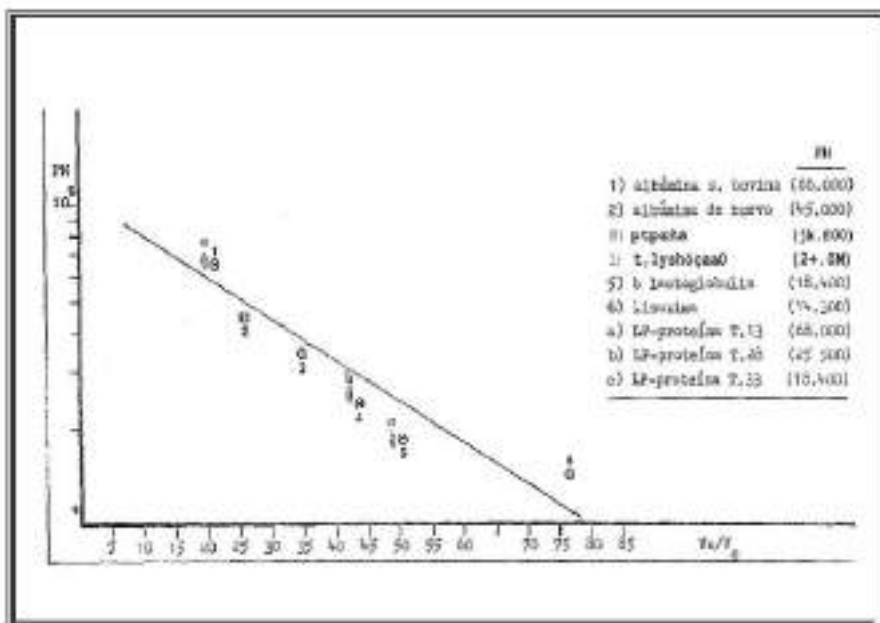


Fig. 10 A

Representación gráfica, en escala semilogarítmica, de los pesos moleculares de los marcadores proteicos y de las proteínas obtenidas por Sephadex con el extracto de Lp. En ordenadas y en abscisas se observan, respectivamente, los pesos moleculares y los volúmenes de elución sobre el volumen muerto.



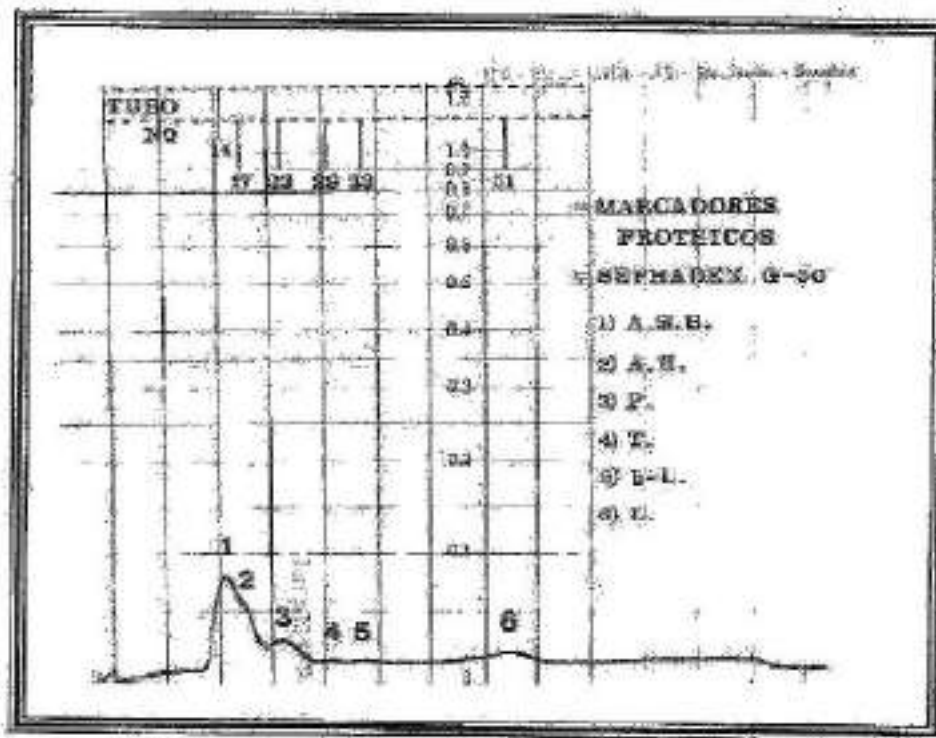


Fig. 10 B

Pasaje de marcadores proteicos por una columna de Sephadex G-50.

- 1) Albúmina sérica bovina: PM 66 kDa
- 2) Albúmina de huevo: PM 45 kDa
- 3) Pepsina: PM 34,7 kDa
- 4) Tripsinógeno: PM 24 kDa
- 5)  $\beta$ -Lactoglobulina: PM 18,4 kDa
- 6) Lisozima: PM 14,3 kDa