



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
“IN VITRO” DE HONGOS ALERGÉNICOS
ASOCIADOS A RINITIS ALÉRGICA**

para obtener el grado de

MAESTRO EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

PRESENTA:

QFB HÉCTOR RUIZ REYES

**DIRECTOR DE TESIS:
D EN C. ALAIN R. RODRÍGUEZ OROZCO**

**MORELIA, MICHOACÁN
MÉXICO
2006**

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Prevalencia de enfermedades alérgicas.	7
1.2 Mediadores solubles de la respuesta humoral alérgica.	8
1.3 Respuesta inmunológica a hongos alergénicos.	10
1.4 Diagnóstico de la alergia a hongos.	12
1.5 Vacunas con alergenos fúngicos.	13
1.6 Inmunoterapia con extractos fúngicos en rinitis alérgica.	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Mecanismo inmunológico de la reacción alérgica de tipo 1.	15
2.1.1 Etapa de Sensibilización.	16
2.1.2 Etapa de Desencadenamiento.	17
2.2 Citocinas implicadas en la respuesta alérgica.	23
2.3 Enfermedades alérgicas inducidas por hongos alergénicos.	25
2.3.1 Alveolitis alérgica fúngica.	25
2.3.2 Aspergilosis brocopulmonar alérgica.	25
2.3.3 Sinusitis alérgica fungosa.	26
2.3.4 Principales epítopes fúngicos inductores de rinitis alérgica.	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. HIPÓTESIS	30
6. OBJETIVOS	31
6.1 Objetivo general.	31
6.2 Objetivos específicos.	31
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
8. MATERIAL Y MÉTODOS	33

8.1 Pruebas de hipersensibilidad cutánea a hongos.	33
8.2 Obtención de la muestra biológica.	35
8.3 Preparación de medios de cultivo celular.	36
8.4 Obtención y separación de células mononucleadas.	38
8.5 Determinación de la viabilidad celular de células mononucleadas.	39
8.6 Obtención de sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por extractos fúngicos estandarizados.	40
8.7 Determinación de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivo celular.	41
8.8 Análisis estadístico.	44
9. RESULTADOS	45
9.1 Pruebas de hipersensibilidad cutánea positiva a alergenos fúngicos.	45
9.2 Curva patrón para la determinación de IL-4 por ensayo ELISA.	47
9.3 Curva patrón para la determinación de IL-5 por ensayo ELISA.	48
9.4 Curva patrón para la determinación de IL-13 por ensayo ELISA.	49
9.5 Concentraciones de citocinas detectadas por ELISA.	50
9.6 Comparación de medias por <i>t student</i> de la expresión de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 en C+ vs. C-.	52
9.7 Índice de estimulación, expresada en veces X.	54
9.8 Análisis de la varianza y distribución de <i>Fisher</i> : Pruebas estadísticas utilizadas para comparar los niveles de expresión entre citocinas durante la respuesta inmune a hongos.	58
9.9 Expresión de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), en las primeras 72 h. de reto con los extractos fúngicos.	60
9.10 Prueba exacta de <i>Fisher</i> , nos permite observar el comportamiento cinético de expresión de citocinas a las 24h, 48h y 72h.	66
10. DISCUSIÓN	68
11. CONCLUSIONES	75
12. BIBLIOGRAFÍA	76
13. ANEXOS	82
13.1 Hoja de Consentimiento informado.	82

RESUMEN

Antecedentes: La inhalación sistémica de esporas y micelios de hongos, induce enfermedades alérgicas respiratorias como rinitis alérgica. La importancia alérgica global de los hongos y sus esporas no esta sólo en función de su antigenicidad, sino de su presencia en el medio ambiente, reproducción, liberación, transporte y sobre todo, en el depósito de las mucosas de un huésped atópico.

Objetivo: Valorar la respuesta inmune *in vitro* de alergenos fúngicos en células mononucleadas obtenidas de pacientes atópicos con diagnóstico de rinitis alérgica y prueba de hipersensibilidad cutánea positiva a hongos.

Material y métodos: Estudio experimental, se evaluaron cuatro pacientes atópicos con diagnóstico de rinitis alérgica provenientes de consulta externa del Hospital ISSSTE Vasco de Quiroga de la ciudad de Morelia, Michoacán. Se realizaron pruebas de hipersensibilidad cutánea contra hongos mediante el método de Prick-Test, utilizando 18 extractos alérgicos estandarizados de hongos de la marca *Allerstand*, en concentración 1:20 p/v, para su aplicación se utilizaron lancetas Duotip-test estériles (LINCOLN DIAGNOSTIC, INC. Decatur, Illinois 62525 USA). A pacientes con prueba cutánea positiva a hongos se les extrajeron 10 mL de sangre periférica con la finalidad de separar células MN por el método Ficoll-Paque (densidad = 1.077) (Amersham Biosciences, USA). Se determinó la viabilidad de células MN mediante el método de exclusión con azul de tripano al 4% y la suspensión celular se ajustó a una concentración final de 1×10^6 cel/mL. Se realizaron medios de cultivo celular en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA). Se obtuvieron sobrenadantes (24h, 48h y 72h) de cultivo de células MN activadas por extractos fúngicos estandarizados a los que cada paciente resultó positivo en la prueba cutánea, y mediante el método ELISA (Amersham Biosciences, USA) se determinaron las concentraciones en pg/mL de las citocinas IL.4, IL-5 e IL-13.

Resultados:

Los pacientes con rinitis alérgica que participaron en nuestro estudio presentaron sensibilizaciones *in vivo* a los siguientes hongos: *Candida albicans* (++) , *Cunninganella* (+++), *Alternaria alternata* (+++), *Mucor racemosus* (+++), *Rhizopus stolonifer* (++++), *Curvularia lunata* (++) , *Rhodotorula* (++++) y *Penicillium notatum* (+++).

Los niveles de expresión de IL-4 presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos, se encuentran más elevados con respecto a los niveles de expresión de IL-13 e IL-5, se admitió como significancia estadística a una $P = 0.05$, esto indica el predominio de la expresión de IL-4 en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida por un mitógeno policlonal.

Observamos en la respuesta inmune *in vitro* a hongos alergénicos, que a una $p > 0.10$ la expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no siguen un mismo patrón de liberación a través del tiempo (24h, 48h o 72h).

Conclusiones:

Las respuestas alérgicas de hipersensibilidad de tipo 1 a alérgenos fúngicos son más severas contra epítopes de *Alternaria alternata*.

El índice de estimulación es un parámetro importante que nos permite estimar la magnitud de la respuesta alérgica *in vitro* a hongos alergénicos.

En nuestro estudio se observó que IL-4 es la principal citocina T_H2 liberada en la modulación de la respuesta alérgica a hongos, lo que resulta atractivo a la hora de diseñar el esquema de tratamiento.

En los ensayos realizados observamos que la liberación de las citocinas T_H2 no siguen un patrón de expresión regular a través del tiempo (24h, 48h o 72h), durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos y por lo tanto, su liberación depende de múltiples factores que requieren ser abordados por otros estudios.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Prevalencia de enfermedades alérgicas.

Las enfermedades alérgicas representan un grave problema de salud pública, principalmente en los países industrializados y urbanizados, afectando a casi 500 millones de personas en el mundo, enfermedades como rinitis alérgica, asma bronquial, sinusitis alérgica, dermatitis atópica y rinoconjuntivitis alérgica están condicionadas a factores ambientales y a la predisposición genética de cada individuo, ocupando uno de los primeros lugares de los motivos de atención médica y hospitalización entre las enfermedades crónicas de los niños y los adolescentes, además, es un proceso que incrementa los costos, el ausentismo escolar-laboral y suele tener otras repercusiones sociales negativas (Pedraza Escalona MM y cols., 2004; Rodríguez Mosquera M., 2000).

La prevalencia de enfermedades alérgicas en la ciudad de México en una población de 8 millones de habitantes es la siguiente: rinitis alérgica 19.67%, dermatitis atópica 18.7%, conjuntivitis 17.9%, asma 14.97% y 3.22% para urticaria (Huerta JG y cols., 2004). La mayoría de los pacientes con rinitis alérgica manifiestan síntomas como rinorrea, prurito, estornudos y congestión nasal antes de los 20 años, con un máximo de incidencia entre los 12 y 15 años (Zendejas Cervantes LH y cols., 2003). En la ciudad de Morelia., Michoacán, se han realizado estudios de prevalencia por parte de médicos estudiantes de la UMSNH, encontrando una prevalencia del 10% en asma y 12% para rinitis alérgica, en una población de 2000 adolescentes (Pérez Sánchez AG., 2004; Cardoso Alonso SA., 2005).

Diversos estudios epidemiológicos, fisiopatológicos y clínicos han sugerido que los fenómenos inflamatorios y de remodelación de las vías respiratorias superiores e inferiores son similares entre rinitis alérgica y asma bronquial, puesto que ambas comparten diversas características en su patogénesis y particularmente fenómenos inflamatorios, al parecer, la rinitis y el asma se relacionan temporalmente con el inicio de los síntomas en los pacientes

en quienes coexisten ambas enfermedades, cerca del 90% de los pacientes con asma padecen rinitis alérgica (Fireman P., 2000).

1.2 Mediadores solubles de la respuesta humoral alérgica.

Recientemente, ha quedado demostrado en diversos estudios, que la respuesta sistémica inflamatoria alérgica ha sido descrita como un proceso dirigido por los linfocitos T-helper 2 (T_H2), que segregan citocinas con capacidad de interactuar con los tejidos locales como son el endotelio, el epitelio y lugares distantes incluyendo la médula ósea para estimular y mantener la inflamación sistémica. Entre estas citocinas se encuentran las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$), (López Velásquez B y cols., 2004). Como consecuencia de la inflamación alérgica sistémica se producen una serie de quimiocinas como RANTES y eotaxina; estas quimiocinas participan en la migración de células inflamatorias incluyendo eosinófilos hacia el lugar de la inflamación alérgica. La migración de células inflamatorias a través del endotelio vascular precisa la interacción entre las moléculas de adhesión presentes en el endotelio vascular y las presentes en las células inflamatorias. Estas moléculas de adhesión, incluyendo la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), la molécula de adhesión celular inflamatoria (ICAM-1), el antígeno activador (VLA-4) y la P-selectina, son críticas para las manifestaciones locales de la inflamación alérgica sistémica (Montero Mora P y cols., 2003; Pawankar R., 2003).

Entre las citocinas más importantes implicadas en la respuesta alérgica se encuentran la IL-4, IL-5 e IL-13. La glucoproteína IL-13 es una citocina pleiotrópica producida principalmente por células T_H2 y linfocitos T citotóxicos $CD8^+$. Las principales actividades biológicas de IL-13 son anti-inflamatorias, deprime la actividad de los monocitos y los

macrófagos. La IL-13 disminuye la producción de las principales citocinas inflamatorias que habitualmente liberan los macrófagos activados por las endotoxinas. Por consiguiente, IL-13 disminuye la síntesis y liberación al exterior de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF, G-CSF y óxido nítrico, esta actividad suprime las funciones citotóxicas e inflamatorias de los macrófagos. La IL-13 induce la expresión de CD23⁺ en células B y promueve su proliferación, la IL-13 también prolonga la supervivencia de monocitos humanos *in vitro* y facilita la expresión de las principales integrinas sobre la superficie de la membrana e incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) en la superficie de células CD23⁺ (García Tamayo F., 1997).

La IL-13 e IL-4 son citocinas producidas por la activación de células T CD4⁺ y T CD8⁺, estas interleucinas son responsables de la generación de células T_H2 principalmente a partir de linfocitos T CD4⁺, y se ha asociado a la producción de IgE, esta homología y similitud de funciones se debe a que la IL-4 puede unirse a receptores de IL-13 y viceversa. La glucoproteína IL-4 es una citocina pleiotrópica de aproximadamente 20 kDa, producida por linfocitos T, macrófagos, mastocitos, basófilos, células B y células del estroma de la médula ósea. En los mastocitos, la IL-4 influye sobre su crecimiento y maduración, estimulando la síntesis y la liberación del receptor (CD23) para la porción Fc de las IgE. En cambio, en los linfocitos B aumenta la expresión de los antígenos de MHC II. La IL-4 también estimula la producción de IgG1 e IgE por los linfocitos B, además posee efectos inmunológicos directos como el incremento de la producción de moco, la regulación positiva en la expresión de VCAM-1 y la regulación positiva de los receptores de alta y baja afinidad para IgE, por lo tanto, participa en la activación de mastocitos y basófilos. En los pacientes atópicos y asmáticos, se han identificado mutaciones en el receptor de IL-4 que inducen incremento en la señalización de IL-4. Estas mutaciones pueden potenciar la probabilidad de presentar una enfermedad alérgica debido al

incremento de la actividad de IL-4. Los genes de IL-4, IL-5 e IL-13 se encuentran localizados en la misma región del cromosoma 5q23-31 (Dubuske LM., 2002).

Por otra parte, la IL-5 está implicada en las respuestas nasales de fase tardía. La producción de IL-5 se correlaciona con el asma, la alergia y los síntomas de rinitis alérgica. La producción local de IL-5 se observa en la mucosa nasal tras la provocación con alérgeno en pacientes alérgicos pero no en pacientes no alérgicos. Por lo tanto, la síntesis local de IL-5 ha sido correlacionada con la gravedad de los síntomas de la enfermedad rinitis alérgica. La IL-5 es una glicoproteína principalmente segregada por las células T activadas, que promueve la diferenciación terminal de los progenitores eosinófilos. Además, prolonga la supervivencia de los eosinófilos *in vitro* y potencia ciertas funciones de los eosinófilos como la generación de mediadores y proteínas citotóxicas. Existen varias publicaciones que sugieren que la IL-5 está implicada en la modulación y la migración de eosinófilos observada en la patogenia del asma bronquial y en otras enfermedades alérgicas (Ishizuka T y cols., 2002; López Velásquez B y cols., 2004).

1.3 Respuesta inmunológica a hongos alérgicos.

La inhalación sistémica de esporas de hongos puede inducir patología alérgica respiratoria, tanto de vías aéreas superiores como inferiores, en personas atópicas. Las esporas de los hongos contienen moléculas como glucoproteínas, proteínas y polisacáridos que pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE (Chapman JA., 2003).

La reacción excesiva del sistema inmune se va adquiriendo después de exposiciones prolongadas a concentraciones elevadas de antígenos fúngicos durante meses y años. Sin embargo, una vez que el sistema inmune ha sido sensibilizado, la reacción de hipersensibilidad se desencadena con la exposición a mínimas cantidades del alérgeno

específico. Se estima que alrededor del 8% de los adultos y entre el 20% y 25% de los niños con alergia respiratoria son hipersensibles a antígenos de hongos. El desarrollo de una hipersensibilidad de tipo 1 implica en la mayoría de los enfermos una predisposición genética. Estos pacientes suelen producir una respuesta de anticuerpos IgE en concentraciones más elevadas que las personas no atópicas (Pontón J y cols., 2002).

Los alérgenos de hongos suelen ser proteínas solubles presentes en las esporas fúngicas y que son extraídas de las mismas por los fluidos mucosos de las vías respiratorias. Los antígenos van a atravesar las barreras mucosas y van a ser fagocitados por los macrófagos y otras células presentadoras profesionales de antígenos (APC) que degradan a los alérgenos. Durante la degradación del alérgeno, las APC procesan a estos componentes proteicos para presentárselos posteriormente, bajo restricción de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II, a los receptores (TCR) de los linfocitos T cooperadores (CD4+). Los linfocitos B, a través de su receptor específico (BCR), también van a reconocer a los alérgenos. El intercambio de señales químicas por mediadores como las interleucinas entre linfocitos T cooperadores y linfocitos B va a posibilitar que las células B se transformen morfológicamente en células plasmáticas y produzcan anticuerpos de la clase IgE. Esta activación que en personas sin alergia produce una respuesta defensiva contra los diferentes agentes infecciosos, en las personas atópicas conlleva una sobreproducción de IgE que produce numerosos efectos indeseables (Pontón J y cols., 2002).

Los hongos de mayor importancia desde el punto de vista alergológico, por su predominio y potencia alergénica, pertenecen a los géneros de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Absidia*, *Hormodendrum*, *Helmintosporium*, *Fusarium* y *Epicoccum* (Tomás Bartra J., 2003). En trabajos recientes se ha comprobado que la prevalencia de alergia a hongos es mayor de lo que hasta ahora se pensaba y que los

hongos, como causantes de rinitis alérgica y otras enfermedades del sistema respiratorio, han sido subestimados. Las esporas fúngicas se encuentran en el aire a concentraciones muy superiores a las de los pólenes y en muchos casos son más pequeñas que los granos de polen, esto les permite alcanzar más fácilmente el tracto respiratorio inferior y producir asma. Aunque no se conoce exactamente la prevalencia de patología alérgica respiratoria por hongos y varía mucho según los diferentes autores y, sobre todo, en relación con la población analizada, según un estudio multicéntrico europeo promovido por el Subcomité de Aerobiología de la Academia Europea de Alergología en 1997, un 9.5% de los pacientes con sospecha de alergia respiratoria estaba sensibilizado a *Alternaria* y/o *Cladosporium*. Hasta la fecha se han aislado y caracterizado pocos alérgenos fúngicos; la mayor parte de ellos son ácidos. Por ejemplo: Alt a 1 es una glicoproteína ácida de *Alternaria alternata*, el Cla h I y Cla h II son epítopes alergénicos de *Cladosporium herbarum*. Actualmente se considera que los hongos son la tercera causa más frecuente de patología alérgica respiratoria, tras los ácaros y los pólenes. La mayoría de pacientes alérgicos a estos hongos presentan síntomas de modo perenne, siendo más frecuentes en niños y adolescentes (Lizaso MT y cols., 2003).

1.4 Diagnóstico de la alergia a hongos.

El diagnóstico de alergia a hongos puede ser difícil de realizar, probablemente porque los extractos comerciales disponibles hasta el momento para procedimientos diagnósticos no son muy eficaces, tienen con frecuencia una baja actividad alérgica y gran variabilidad en su composición de lote a lote. La mayor parte de fracciones fúngicas inhaladas por los pacientes son esporas, aunque también se inhalan fragmentos de micelios. Con los hongos, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los restantes agentes etiológicos sensibilizantes, no está claro cuál es la fuente original sensibilizante, si los

micelios, las esporas o sus metabolitos, por lo que no está claro cómo se deben producir los extractos con actividad antigénica, ni como son los métodos más adecuados para su estandarización. Además, existe una gran variabilidad antigénica en las cepas fúngicas (Harol SN., 1996; Lizaso MT y cols., 2003).

1.5 Vacunas con alergenos fúngicos.

Las vacunas que se utilizan en enfermedades alérgicas contienen alergenos extraíbles de sustancias biológicas a las cuales los pacientes son alérgicos. Las vacunas estandarizadas se preparan en fórmulas acuosas, glicerinadas y desecadas por congelación y son compatibles para mezclarse con productos no estandarizados. Puesto que tanto las vacunas estandarizadas como las no estandarizadas pueden presentar la misma mezcla en la vacuna, la mezcla puede basarse en diferentes determinaciones de unidades de potencia: unidades bioequivalentes de alergia (BAU), unidades de alergia (AU), unidades de nitrógeno proteico (PNU), o peso/volumen (Nelson H., 1981).

La fuente del material para las vacunas de hongos generalmente se obtiene cultivando los hongos bajo condiciones controladas. Deben estar presentes tanto micelios como esporas en este material. Puesto que la composición alergénica de un hongo es variable, una vacuna debe prepararse de los tres últimos cultivos de la misma especie. Es muy importante que se usen condiciones exactas de cultivo para asegurar que la composición alergénica entre los cultivos de hongos sea similar. El material fúngico inicial debe obtenerse de centros bien establecidos, con buena reputación, que producen materiales crudos para cultivo. Los extractos en su mayor parte no son bien estandarizados, así que se recomienda inmunoterapia con estos alergenos sólo en casos muy sugestivos que no mejoran con farmacoterapia (Fischer TJ y cols., 2005).

1.6 Inmunoterapia con extractos fúngicos en rinitis alérgica.

La inmunoterapia con alérgenos de pólenes, epitelios de animales, cucarachas y ácaros del polvo, es un tratamiento eficaz para la rinitis alérgica y asma alérgico. Respecto a la inmunoterapia con vacunas de hongos, los hongos tienen varias características que los distinguen de otros alérgenos inhalados: 1) existen miles de especies diferentes de hongos; 2) los patrones de exposición a la mayoría de especies de hongos no se conocen bien; 3) la calidad de las vacunas de hongos es variable; y 4) no existen vacunas para muchos géneros de hongos (Salvaggio JE y cols., 1993). Aunque existen pocos estudios de inmunoterapia con alérgenos fúngicos, hay dos estudios doble ciego, controlado con placebo que mostraron que la inmunoterapia con vacunas estandarizadas de *Cladosporium* y *Alternaria* pueden ser eficaces en la rinitis y/o asma (Dreborg S y cols., 1986; Horst M y cols., 1990). Existen evidencias de que enzimas proteolíticas y glucosídicas se encuentran en algunos extractos de hongos, digiriendo los alérgenos de algunas vacunas de polen, por ejemplo, la vacuna para *Aspergillus* ha mostrado que reduce la actividad de la unión a la IgE de la vacuna para el pasto timothy cuando se mezclan las dos. Aun cuando no hay evidencia de que esta reducción de la unión a la IgE disminuya la eficacia de la inmunoterapia, estas interacciones no han sido bien estudiadas (Rosenbaum M y cols., 1996).

Por todo esto, la hipersensibilidad inmediata a hongos tiene importantes dificultades en el diagnóstico y aún más en el tratamiento específico mediante inmunoterapia. El presente trabajo de investigación va encaminado a la caracterización de la respuesta inmune *in vitro* de hongos alergénicos, en pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica, con el fin de evaluar la alergenicidad de extractos fúngicos, utilizando mediadores de la inflamación como las citocinas liberadas durante diversos procesos fisiopatológicos y utilizarlos como marcadores de actividad alérgica en individuos con alergias respiratorias.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Mecanismo inmunológico de la reacción alérgica de hipersensibilidad tipo 1.

Es necesario saber, que todos sin excepción, producimos IgE en condiciones normales, puesto que nos sirve para defendernos de algunos parásitos, pero el paciente alérgico produce más cantidad y dirige esos anticuerpos contra elementos que están en el ambiente y frente a los cuales no deberíamos responder de esa forma, esta “confusión” por parte del sistema inmune que comienza a generar anticuerpos de tipo IgE frente al polvo, caspa de animales, alimentos o esporas fúngicas, entre otros, se llama *sensibilización alérgica*. El resultado es que cada vez que esa persona se ponga en contacto con lo que originó su sensibilización, las moléculas IgE se unen a ese elemento identificado como extraño y desencadenan una reacción inflamatoria en el sitio donde se produce el encuentro (O'Donnell DR y cols., 1998).

Las reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo I, son procesos con una elevada prevalencia en niños y adolescentes. Su etiología radica en la capacidad heredada de ciertos individuos para desarrollar una respuesta de anticuerpos IgE frente a antígenos inocuos medioambientales, denominados *aeroalergenos*. Los anticuerpos IgE son los responsables de mediar las reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

El término *atopia* se refiere a la tendencia hereditaria a desarrollar reacciones alérgicas inmediatas ante la presencia natural de alérgenos inhalados o ingeridos, por lo tanto, los individuos con tendencia a padecer reacciones de hipersensibilidad inmediata se denominan *atópicos* y con frecuencia producen más inmunoglobulina E en la sangre y portan más receptores Fc en sus mastocitos y basófilos. El término *atopia* no puede usarse

hasta que se documente la sensibilización mediada por IgE por su cuantificación en suero o por pruebas cutáneas (Stites PD y cols., 2000).

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I constituyen reacciones inmunológicas de un desarrollo rápido, que ocurren pocos minutos después de la combinación de un antígeno con un anticuerpo de tipo IgE unido a receptores de alta afinidad (FcεR1) presentes mastocitos o basófilos. A consecuencia de su rápido desarrollo, se las denomina también *hipersensibilidad inmediata*, ya que a pocos minutos del contacto con el antígeno se originan consecuencias patológicas, que se manifiestan con blanco preferente en un órgano (asma, rinitis alérgica, urticaria) o como una enfermedad multisistémica (anafilaxia). Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I se produce en dos etapas contiguas: *sensibilización* (Figura 1) y *desencadenamiento* (Figura 2).

2.1.1 Etapa de sensibilización: La reacción alérgica en la nariz y en otras zonas del cuerpo comienza con una fase de sensibilización donde la célula presentadora de antígeno como el macrófago entra en contacto con un alérgeno potencial. Este alérgeno es procesado por la célula presentadora de antígeno y presentado a la célula T CD4⁺ en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y del receptor de célula T, de tal forma que la célula T CD4⁺ en presencia de IL-4 se convierte en una célula T_H2 capaz de estimular las células B para convertirse en células plasmáticas generadoras de inmunoglobulina E (IgE) específica para el alérgeno que indujo su formación. Para este proceso, la IL-4 es crítica dado que su presencia es necesaria para la generación del inmunofenotipo T_H2 a partir de la célula T CD4⁺, y por otro lado, su presencia junto con la de IL-13 es necesaria para la generación de células plasmáticas secretoras de IgE, derivadas de la interacción de células B con los linfocitos T_H2. La IgE segregada por la célula plasmática se une posteriormente a receptores de alta afinidad

(FcεRI) sobre los mastocitos y basófilos, a todo esto se le denomina sensibilización (Kay AB., 2001).

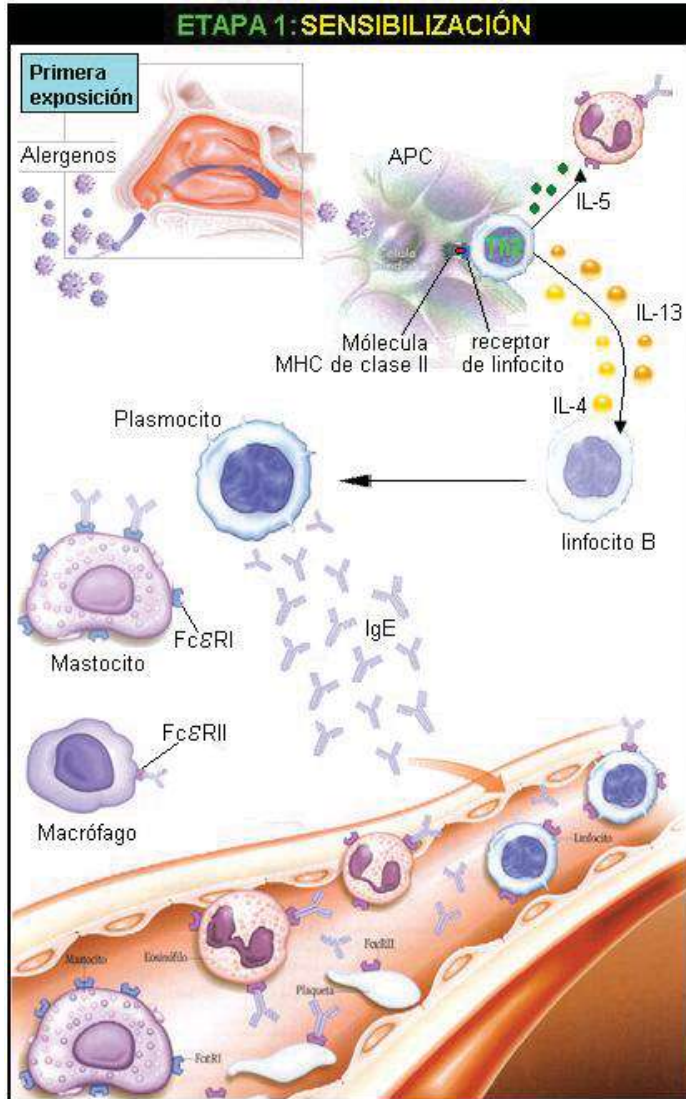


Figura 1.

Tras el primer contacto con el alérgeno fúngico, éste es fagocitado por las células presentadoras de antígenos (APC), las cuales lo procesan y exponen en la membrana unido a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase dos (MHC II). De esta manera las APC presentan el complejo antígeno-MHC II a los linfocitos T CD4+ de la subpoblación TH2, estas células liberan ciertas citocinas, que actúan sobre los linfocitos B, para sintetizar y liberar Inmunoglobulinas E (IgE), las cuales se unen a receptores de alta afinidad (FcεRI) en la membrana de los mastocitos y/o basófilos, y por otra parte, algunas inmunoglobulinas E se unen a receptores de baja afinidad (FcεRII) presentes en la membrana de macrófagos. A todo este proceso se le denomina etapa de sensibilización

2.1.2 Etapa de Desencadenamiento: En la etapa de desencadenamiento se presentan los síntomas clínicos de las enfermedades alérgicas y se caracteriza por los siguientes eventos celulares y químicos:

- *Reexposición al antígeno* e interacción del mismo con la IgE específica.
- *Activación celular* y liberación de mediadores químicos.
- *Acción de los mediadores* sobre los diferentes tejidos.

- **Reexposición al antígeno:** Las reacciones atópicas se desencadenan cuando los alérgenos se unen a las moléculas de IgE fijadas a los mastocitos, lo cual genera el entrecruzamiento de al menos dos receptores adyacentes (FcεR1), evento requerido para la activación de estas células. En un individuo alérgico para un determinado antígeno, ya ha ocurrido previamente la sensibilización con el consecuente desarrollo de IgE específica, de forma que una proporción significativa de la IgE que se encuentra unida a los mastocitos, es capaz de reconocer a ese antígeno.

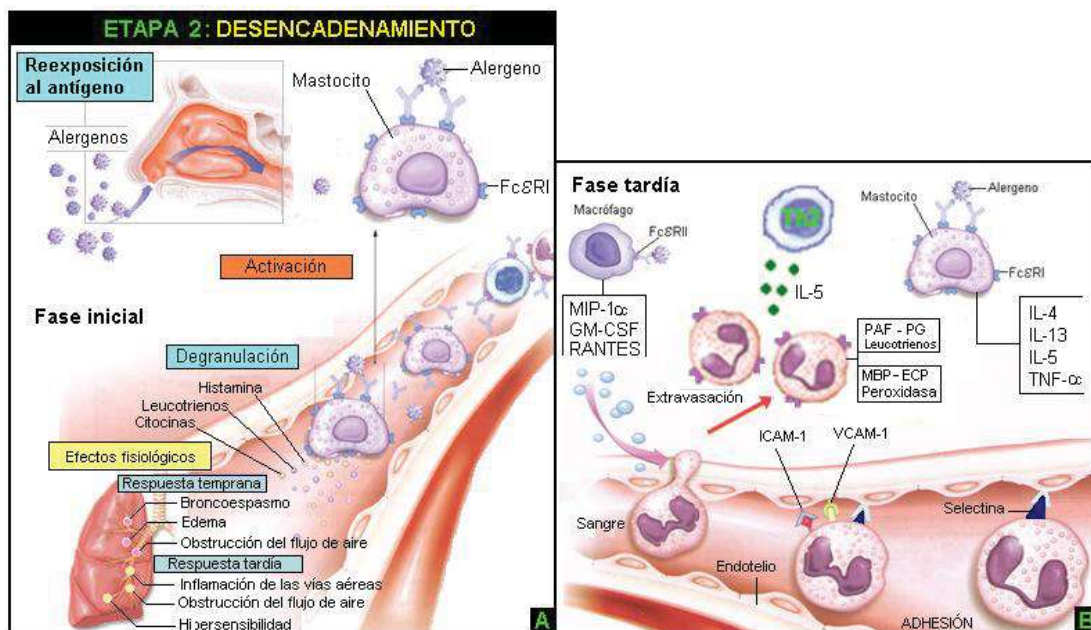


Figura 2. Sólo la segunda etapa, tiene la expresión clínica característica de cada enfermedad atópica. En la etapa de desencadenamiento, se reconocen, a su vez, dos fases, una *fase inicial* (A) y una *fase tardía* (B). En la fase inicial, tras una nueva exposición al antígeno, ocurre la unión a los anticuerpos fijados a mastocitos, lo que provoca la activación y liberación con gran rapidez de diversos mediadores preformados y de otros sintetizados de *novo*. La acción de los mediadores determina un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso bronquial y visceral, e inflamación local. La fase tardía, se desarrolla sin que exista una nueva exposición al antígeno y ocurre entre 2 a 24 horas luego de la exposición inicial. Involucra el reclutamiento de células, principalmente eosinófilos y linfocitos TH2, lo que aumenta la producción de mediadores, que mantienen y exacerbando el proceso inflamatorio.

Cuando estos individuos se vuelven a exponer al mismo antígeno, se genera una respuesta inmediata producto de la activación directa de los mastocitos. Los mastocitos se ubican en las puertas de entrada más importantes a los antígenos: la piel y los epitelios de los tractos gastrointestinal y respiratorio, y se encargan de alertar al sistema inmune de una agresión local, induciendo una reacción inflamatoria. En la alergia, esta respuesta inflamatoria provocada por un alérgeno, genera una reacción no deseada frente a un antígeno inocuo, o sea, que no se encuentra asociado a un patógeno invasor que necesite ser eliminado. De esta forma, la consecuencia de la activación de los mastocitos dependiente de IgE, se encuentra relacionada con la puerta de entrada del alérgeno, la vía de acceso implicada determinará las principales manifestaciones clínicas. (Stites PD y cols., 2000).

- ***Acción de los mediadores:*** En la fase inicial, los mediadores preformados que se liberan son de vida media corta y por tanto sus potentes efectos se limitan a las inmediaciones donde ocurrió la activación del mastocito. Los efectos de la fase tardía también ocurren inicialmente en el sitio de activación, pero en este caso, las células reclutadas que intensifican y amplifican la respuesta, determinarán la rapidez con la que se resolverá la inflamación y por ende las consecuencias que producirá en el individuo (Pedraza Escalona MM y Rodríguez Romero A., 2004).

a) Mediadores químicos preformados: Estos mediadores se encuentran ya sintetizados y almacenados dentro de los gránulos de los mastocitos y basófilos, prontos para ser liberados una vez que ocurre la activación. La liberación ocurre por exocitosis se denomina muchas veces degranulación, proceso que asegura que los mediadores preformados rápidamente se encuentren en el sitio de lesión, lo que permite diferenciarlos de los mediadores que deben ser sintetizados de novo. Los principales mediadores

preformados son: las aminas biógenas, los proteoglucanos y las proteasas neutras (Robinson DS y cols., 2004).

Aminas biógenas: La *histamina*, es la principal amina vasoactiva humana y constituye el principal componente de los gránulos. Los mastocitos contienen prácticamente el total de la histamina almacenada en los tejidos normales con la excepción de las glándulas gástricas y del sistema nervioso central. Los basófilos son la fuente principal de la histamina de la sangre. Esta amina se une a diversos tipos celulares que expresan diferentes clases de receptores histamina. La unión de este mediador a su receptor H1 en la superficie de la célula diana desencadena una cascada de señalización intracelular que da lugar a diferentes modificaciones (Dubuske LM., 2002), según el tipo celular. Los efectos de la histamina son:

- Contracción de células endoteliales vasculares, lo que permite el paso de plasma a los tejidos, *aumento de permeabilidad vascular*.

- Síntesis de prostaciclina (PGI₂) y óxido nítrico por parte de las células endoteliales lo que produce *vasodilatación*.

- Contracción del músculo liso intestinal y bronquial, *aumento de la peristalsis y broncoespasmo*.

- Estimulo de las células parietales gástricas, *aumento de la secreción de ácido gástrico*.

Otra amina vasoactiva es la *adenosina*, que estimula la liberación de mediadores por parte de los mastocitos, provocando broncoconstricción e inhibición de la agregación plaquetaria.

Proteoglucanos (heparina y condroitin-sulfato): Actúan como matrices para el almacenamiento de las aminas biógenas, las proteasas y otros mediadores preformados

dentro de los gránulos, reteniéndolos y evitando su acceso al resto de la célula. Tras la exocitosis del gránulo, los mediadores se liberan de los proteoglicanos a diferentes velocidades, siendo las aminas biógenas las que se liberan con mayor rapidez que el resto. De esta forma, los proteoglicanos pueden controlar la cinética de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Kay AB., 2001).

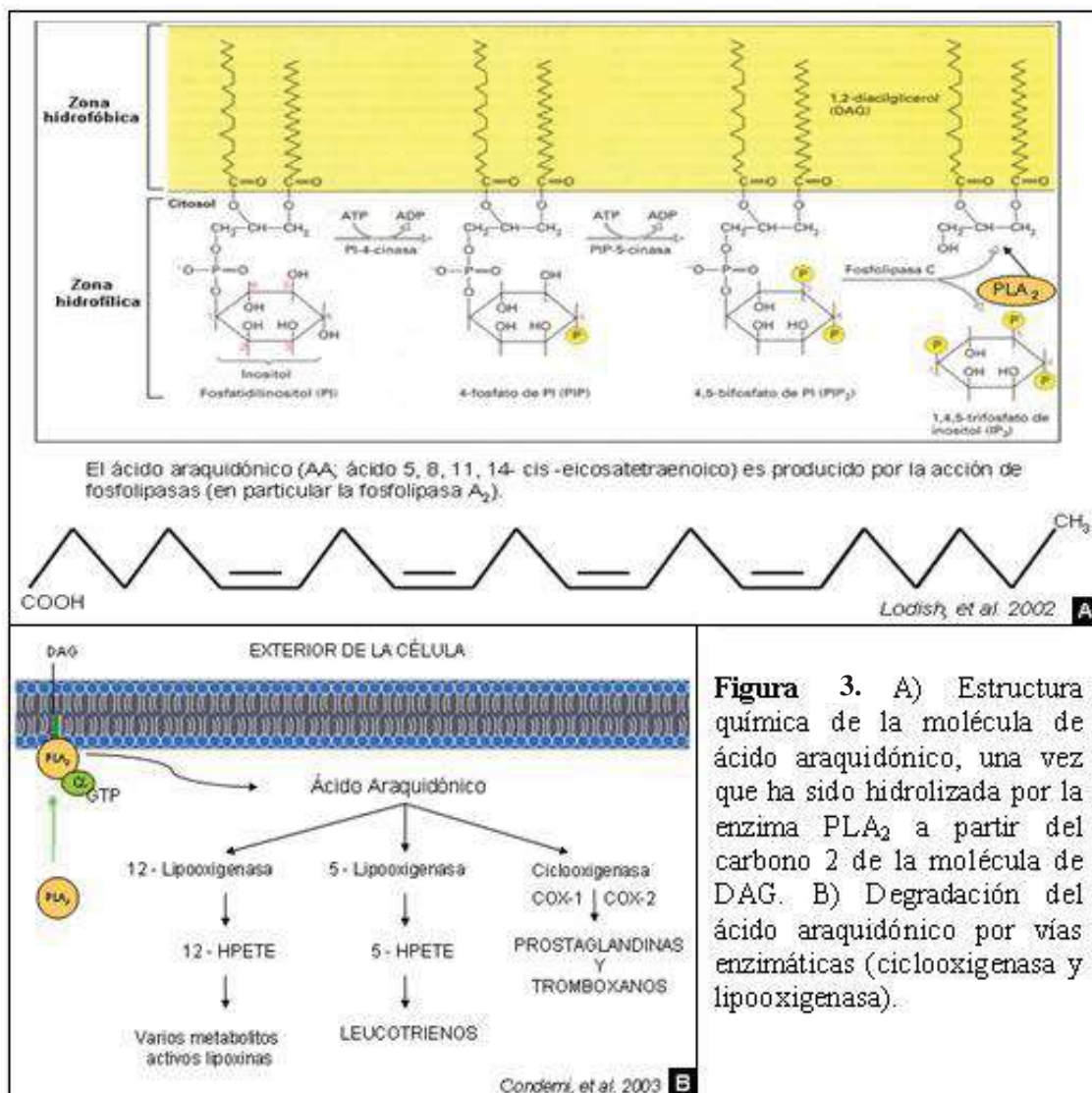
Proteasas Neutras (triptasa y quimasa): Son el mayor componente proteico de los gránulos secretorios de los mastocitos. El mecanismo exacto por el cual actúan se desconoce, no obstante "*in vitro*" se han podido demostrar, por ejemplo, que la triptasa degrada el fibrinógeno y activa la colagenasa, y que la quimasa puede degradar la membrana basal de la epidermis y estimular la secreción de moco. Lo antes mencionado contribuye a la producción de las lesiones hísticas en algunos tejidos a consecuencia de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Abbas AK y cols., 2002).

Factores quimiotácticos: Estos factores tienen gran importancia en la generación de una respuesta tardía al atraer células inflamatorias al foco de degranulación. Dentro de este grupo se encuentran el factor quimiotáctico de eosinófilos (ECF) y el factor quimiotáctico de neutrófilos (NCF).

b) Mediadores sintetizados de novo (lipídicos y citocinas).

Mediadores lipídicos: Los más importantes son derivados del ácido araquidónico, por las vías lipooxigenasa y ciclooxigenasa (figura 3). Ejercen efectos sobre los vasos sanguíneos, el músculo liso de los bronquios y leucocitos. En la vía de la ciclooxigenasa el principal mediador es la prostaglandina D₂ (PGD₂). Esta se une a receptores de las células musculares lisas y produce vasodilatación y broncoconstricción, estimula la quimiotaxis de neutrófilos y su acumulación en los focos de inflamación. Los antiinflamatorios no

esteroides (AINEs) bloquean la vía de la enzima ciclooxigenasa, determinando un desvío hacia la vía de la lipooxigenasa. En la vía de la lipooxigenasa los principales mediadores son los leucotrienos (LTC_4) y sus productos de desintegración: LTD_4 y LTE_4 . En su conjunto los LTC_4 , D_4 y E_4 se denominan sustancias de reacción lenta de la anafilaxia, y son fundamentales en la patogenia del asma. Los leucotrienos producidos por los mastocitos se unen a receptores específicos de las células musculares lisas y provocan broncoconstricción (Stites PD y cols., 2000).



Recientemente se ha descrito un tercer tipo de mediador: el factor activador de las plaquetas (PAF). Este no proviene del ácido araquidónico sino de la acetilación del lisofosfoglicérido. Debe su nombre a la capacidad de producir agregación plaquetaria. Es broncoconstrictor por acción directa, produce retracción de las células endoteliales, y puede relajar el músculo liso vascular. Su tiempo de acción es corto porque se desintegra rápidamente.

2.2 Citocinas implicadas en la respuesta alérgica.

La determinación de mediadores solubles que intervienen en la modulación de la respuesta inmune, ejemplo las citocinas expresadas en procesos inflamatorios durante situaciones de enfermedad, ha tenido un papel importante en la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos. Repta-Ramírez S y cols., (2002) con el fin de comparar el grado de inflamación entre pacientes con sinusitis aguda, síndrome de astenia crónica y rinitis alérgica, determinaron las concentraciones de diversas citocinas (IL-8, TNF α y NGF) en el líquido de lavados nasales. Por otra parte, López Velásquez B y cols., (2004) observaron el comportamiento de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 e IFN γ en suero de pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia, con la finalidad de comparar los niveles de expresión antes y después de la inmunoterapia. Estos estudios clínicos permiten evaluar el impacto que tiene la determinación de citocinas a partir de muestras biológicas de pacientes que presentan alguna enfermedad respiratoria alérgica.

Las células T CD4⁺ se han clasificado en dos subgrupos distintos: las células T_{H1} que producen IFN- γ , TNF- α , e IL-2, estas citocinas promueven el desarrollo de células T citotóxicas, macrófagos y estimulan la inmunidad celular, mientras que las células T_{H2} producen citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que inducen las respuestas inmunitarias humorales características de la atopía. (Hartel C y cols., 2005).

Los mastocitos y los basófilos producen diversas citocinas que pueden contribuir a la inflamación alérgica. Entre estas citocinas se destacan: [TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, MIP-1 α (proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 α)], y factores estimulantes de colonias como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-Macrófagos).

Vale destacar que las designaciones de estas y otras citocinas muchas veces hacen referencia al lugar o la función en las cuales fueron identificadas en primera instancia, estas designaciones se mantienen por su valor histórico, no presentando siempre una correlación estricta con su función. Estas citocinas juegan un rol importante en el cambio de isotipo (IgM a IgE), contribuyen con la supervivencia de los eosinófilos, y estimulan la proliferación de los mastocitos. La activación del mastocito induce la síntesis de *novo* de las mismas. A esto se suma TNF- α preformado que puede almacenarse en los gránulos para ser liberado con rapidez. El TNF- α activa la expresión endotelial de moléculas de adhesión que permitirán que ocurra infiltración de polimorfonucleares y monocitos. Los linfocitos TH2 que migran a los focos de las reacciones alérgicas también sintetizan algunas de estas citocinas (Rojas Ramos E y cols., 2003).

Las formas clínicas más frecuentes de enfermedad atópica son: rinitis alérgica, asma bronquial, rinosinusitis alérgica, dermatitis atópica y la urticaria. Las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas varían según la localización anatómica de la reacción de hipersensibilidad. La gravedad de las manifestaciones depende de la concentración de mastocitos presentes en los distintos órganos diana, por eso la piel, la mucosa respiratoria y el tracto digestivo son los órganos que expresan sintomatología frente a estas reacciones de hipersensibilidad de tipo 1 (O'Donnell DR., 1998).

2.3 Enfermedades alérgicas inducidas por hongos.

2.3.1 Alveolitis alérgica extrínseca.

Entre los alérgenos fúngicos que producen alveolitis alérgica extrínseca destacan fundamentalmente *Mucor* y *Alternaria*. Los hallazgos inmunológicos característicos de las alveolitis alérgicas extrínsecas son los anticuerpos precipitantes séricos específicos contra antígenos presentes en el material inhalado. Se detecta IgG por inmunoelectroforesis o por técnicas de difusión en gel, aunque en el suero del paciente también se pueden detectar IgA e IgM específicas. La sintomatología se presenta de seis a ocho horas después de la exposición e incluye malestar general, síntomas seudogripales, fiebre, mialgias y artralgias, disnea, pérdida de peso y, posteriormente, sintomatología asmática. Los rasgos más importantes de la alveolitis alérgica o neumonitis por hipersensibilidad son la afectación bilateral y difusa de bronquiolos terminales, alvéolos e intersticio pulmonar; inflamación constituida por un infiltrado celular mononuclear que frecuentemente deriva en la formación de granulomas y fibrosis.

2.3.2 Aspergilosis broncopulmonar alérgica.

La Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas inferiores caracterizada por una reacción de hipersensibilidad a los antígenos de especies de *Aspergillus* que coloniza el árbol bronquial. La ABPA ocurre predominantemente en pacientes con asma atópica o fibrosis quística; aproximadamente un 20% de pacientes con asma crónica que ingresan a los hospitales están afectados y cerca del 5% en todos los casos de rinitis, mientras que la incidencia en pacientes con fibrosis quística puede variar entre un 10% a 25%. *Aspergillus fumigatus* es el principal agente

etiológico que causa ABPA con mayor frecuencia, pero otras especies de *Aspergillus* como *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, y *A. niger* pueden causar síndromes similares (Blanco JL y cols., 1997; Quindós G., 2002). Además, la micosis broncopulmonar alérgica puede ocurrir con otros hongos como *Absidia*, *Candida*, *Curvularia*, *Dreschelia*, *Helminthosporium*, *Mucor* y *Stemphyilia* (Condemi JJ y cols., 2003).

Los criterios diagnósticos y los hallazgos de laboratorio de la ABPA incluyen 1) asma o fibrosis quística; 2) pruebas de hipersensibilidad cutánea positivas contra *A. fumigatus*; 3) nivel sérico elevado de IgE específica contra *A. fumigatus*; 4) nivel sérico elevado de IgE total; 5) anticuerpos precipitantes y/o anticuerpos IgG séricos elevados contra *A. fumigatus*; 6) bronquiectasias proximales; 7) infiltrados pulmonares en la radiografía del tórax; y 8) eosinofilia en la sangre periférica. La ABPA se presenta a menudo como asma grave dependiente de corticoesteroides (Stevens DA y cols., 2003).

2.3.3 Sinusitis fúngica alérgica.

La sinusitis fúngica alérgica (SFA) es una entidad clínica descrita recientemente que ha adquirido una importancia creciente como causa de sinusitis crónica, consiste en una enfermedad sinusal benigna no invasiva que está en relación con una reacción de hipersensibilidad a antígenos fúngicos. Fue descrita inicialmente hace más de una década por Millar y Lamb y se denominó "Aspergilosis sinusal alérgica" por la similitud histopatológica con la Aspergilosis broncopulmonar alérgica. Estudios posteriores han demostrado que la mayoría de casos con esta entidad clínica eran causados por especies distintas a *Aspergillus*, por lo que actualmente a esta entidad se le denomina "sinusitis fúngica alérgica" (Sánchez Sánchez BR y cols., 1999).

La incidencia representa aproximadamente un 6 a 8% de todas las sinusitis crónicas que requieren cirugía. Esta incidencia puede tener variaciones geográficas. La mayoría de pacientes con SFA están asociados a moldes de dematiaceous en su mucina alérgica o en los cultivos para hongos. (*Bipolaris*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Exserohilum*). Las especies de *Aspergillus* representan algunos casos de SFA, pero no la mayoría. Los primeros casos publicados de SFA no incluían la identificación mediante cultivo del agente causal. Estas especies son indistinguibles morfológicamente en el estudio histológico, por lo que muchos de los casos antiguos en los que se implicó a *Aspergillus* podían incluir otras especies de hongos (McCann WA y cols., 2002).

Tabla 1. Pruebas inmunológicas ante sospecha de SFA.

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Recuento total de eosinófilos.2. IgE total en suero.3. IgE específica frente a antígenos fúngicos.4. IgG específica frente a antígenos fúngicos.5. Anticuerpos precipitantes. |
|--|

2.3.4 Principales epítopes fúngicos inductores de asma y rinitis alérgica.

El rol de algunos hongos como factor etiológico del asma ha cobrado en los últimos años especial importancia, tal es el caso de *Alternaria*, capaz de producir un alto número de reacciones asmáticas tardías en las pruebas de provocación específicas. La inhalación de esporas de *Alternaria* ha sido asociada con el desencadenamiento de crisis asmáticas severas en niños y adultos jóvenes y constituye un factor de riesgo para muerte por asma en los meses de otoño (Jalonen M y cols., 1997; García Caballero R y cols., 2001). Entre los principales epítopes fúngicos de *Alternaria alternata* conocidos hasta ahora que causan enfermedad alérgica se encuentran: Alt a 1 (glicoproteína ácida de 28/30 kDa) el alérgeno prioritario a valorar en la inmunoterapia, que es reconocido por los anticuerpos IgE del 80-90% de los pacientes alérgicos a *Alternaria alternata* mediante estudios de

radioinmunolectroforesis y el 86% presenta reacción cutánea positiva (De Vogue M y cols., 1996), Alt a 2 (aldehído deshidrogenasa, proteína de 25 kDa) reacciona con los anticuerpos IgE del 60% de los pacientes alérgicos a *Alternaria* (Bush RK y cols., 1999), y otros epítopes como Alt a 6 (proteína P2 ribosomal ácida de 11 kDa), Alt a 7 (proteína YCP4 de 22 kDa) y Alt a 10 (aldehído deshidrogenasa de 53 kDa) reaccionan con el suero de menos del 8% de los pacientes alérgicos a *Alternaria* (Achatz G y cols., 1995).

Cladosporium herbarum es un hongo ampliamente distribuido en nuestro medio ambiente y sus esporas son fuente inductora de reacción alérgica, la composición antigénica de este hongo se ha estudiado en profundidad y se ha observado que es muy variable su aislamiento. De este hongo se conocen más de 60 extractos antigénicos, entre los epítopes más importantes se encuentran Cla h 1 (antígeno 32), Cla h 2 (enolasa o antígeno 54), Cla h 3 (aldehído deshidrogenasa), Cla h 4 (P2 ribosómica), Cla h 5, Cla h 6 (enolasa) y Cla h 12 (Jockey RF y cols., 2004).

Aspergillus fumigatus puede inducir enfermedades alérgicas, algunos de los epítopes alergénicos descritos son Asp f 1 (mitogilina), de Asp f 2 hasta Asp f 18 y Asp f 22 (enolasa). La alveolitis alérgica (pulmón del granjero), el asma o la rinitis alérgica pueden desarrollarse después de la exposición de *Aspergillus* (Busch RK y Portnoy JM., 2001) y *Penicillium notatum* presenta epítopes como el Pen n 18 (Ferreira F., 2003).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dentro de los aeroalergenos que inducen enfermedades alérgicas, los hongos son los que han creado más dificultad para su estudio, debido a la gran diversidad de especies de hongos presentes en el medio ambiente como *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Drechslera*, *Curvularia* etc., y también a la variedad de formas y tamaños de las esporas fúngicas presentes en el aire. Además, los hongos presentan algunas diferencias antigénicas respecto a otras fuentes alérgicas.

La gran variabilidad biológica de las materias primas utilizadas para la fabricación de extractos fúngicos alergénicos para uso diagnóstico y terapéutico ha ocasionado frecuentemente la utilización de productos poco reproducibles y eficaces, lo que ha dificultado, hasta el presente, el establecimiento de una inmunoterapia adecuada en pacientes atópicos. Por lo tanto, los fenómenos de hipersensibilidad a hongos tienen importantes dificultades en el diagnóstico clínico y aún más en el tratamiento específico mediante inmunoterapia.

La prevalencia de alergia a hongos, como causantes de rinitis alérgica en pacientes atópicos, ha incrementado en los últimos años, y la valoración de la hipersensibilidad a alérgenos fúngicos tiene impacto tanto en el diagnóstico, como en la elección de la inmunoterapia específica.

¿Las citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por extractos fúngicos, mantendrán niveles de expresión diferentes en las primeras 24, 48 y 72 horas de reto?

4. JUSTIFICACIÓN

El comportamiento de padecimientos respiratorios de tipo alérgico como rinitis alérgica, se encuentran dentro de las primeras diez causas de morbilidad, por lo menos a nivel estatal, nunca es mortal, pero causa problemas socioeconómicos importantes para el paciente.

En la última década ha aumentado considerablemente la incidencia de enfermedades alérgicas en nuestro estado, existen pocos reportes sobre la patogenicidad de hongos alergénicos en pacientes con rinitis alérgica, y su repercusión sobre la inflamación alérgica “*in vitro*”.

La determinación de citocinas expresadas en procesos inflamatorios durante situaciones de enfermedad, ha tenido un papel importante en la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos, por lo que, la caracterización de la respuesta inmune a hongos alergénicos “*in vitro*” resulta novedosa y de gran importancia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas inducidas por alergenos fúngicos.

5. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no mantienen un comportamiento cinético homogéneo durante la respuesta inmune a extractos fúngicos en cultivos de células MN de pacientes atópicos con diagnóstico de rinitis alérgica.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general:

Evaluar la respuesta inmunológica a extractos fúngicos estandarizados en cultivos de células mononucleadas de pacientes atópicos con diagnóstico de rinitis alérgica.

6.2 Objetivos específicos:

1. Reconocer las reacciones positivas de hipersensibilidad a extractos fúngicos en una muestra de pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica.

2. Evaluar la cinética en la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en sobrenadantes de cultivo de células MN estimuladas con extractos fúngicos, provenientes de pacientes con rinitis alérgica y prueba cutánea positiva a hongos.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

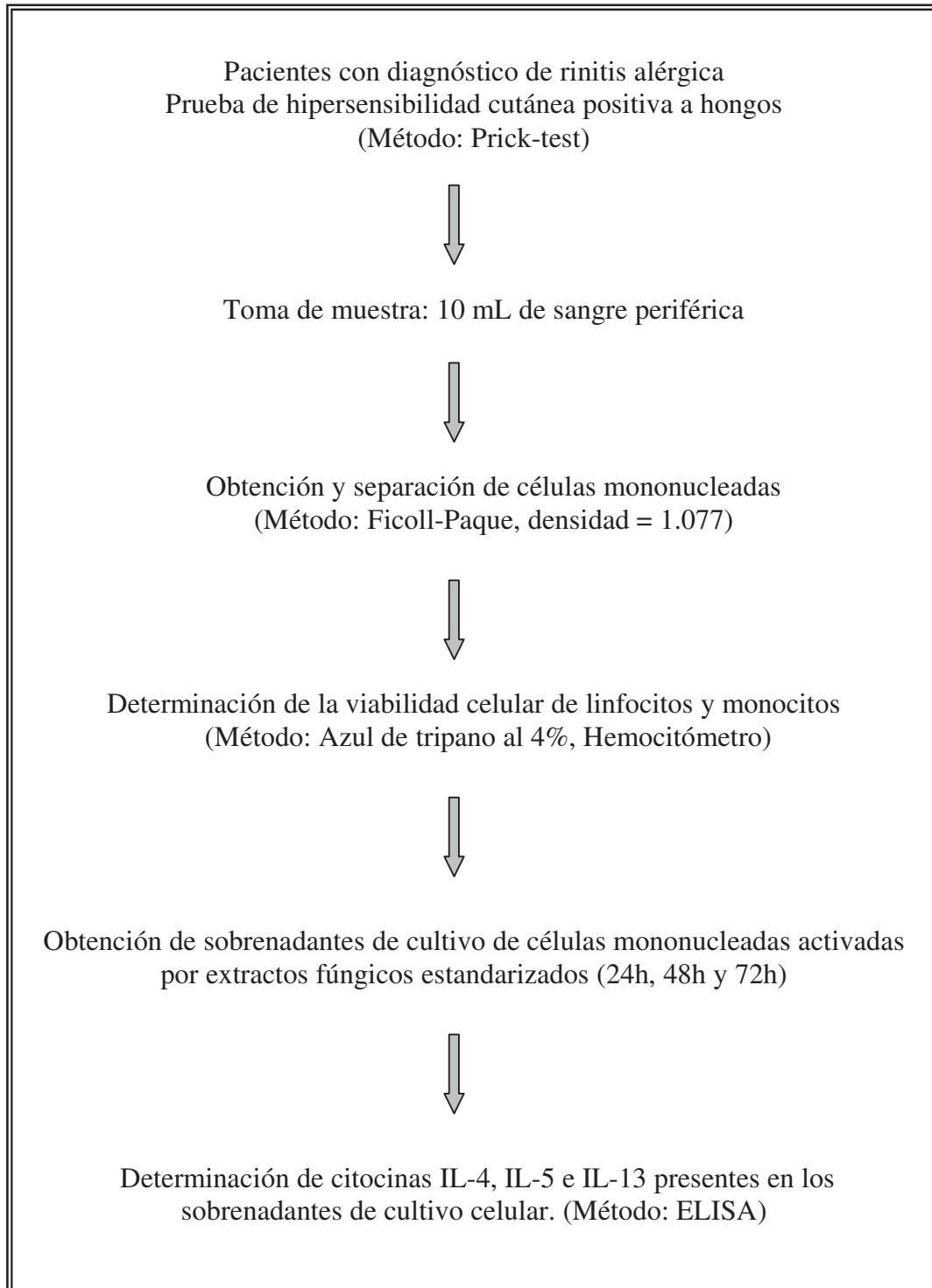


Figura 4. Estrategia experimental de laboratorio.

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

En este trabajo se obtuvieron muestras de sangre periférica a partir de cuatro pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica, provenientes del Hospital Vasco de Quiroga del ISSSTE de la Ciudad de Morelia, Michoacán, México, que dieron reacción positiva a pruebas de hipersensibilidad a hongos alergénicos mediante el método de Prick test.

Criterios de inclusión

* Pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica, que decidan participar en el estudio con edad entre 20 y 40 años.

* Pacientes con prueba de hipersensibilidad cutánea positiva a hongos.

Criterios de no inclusión

* Pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica, pero con prueba de hipersensibilidad negativa a hongos.

* Aquellos pacientes que decidieron no participar o retirarse del estudio.

8.1 Pruebas de hipersensibilidad cutánea a hongos (Método de Prick-test).

En la mayoría de las enfermedades alérgicas de tipo I, los anticuerpos IgE se encuentran en parte circulantes y en parte fijos sobre los mastocitos del órgano efector y especialmente de la piel. Estas pruebas constituyen la posibilidad más sencilla para la detección de Anticuerpos. Es un método de diagnóstico seguro y con un alto grado de especificidad, siendo la primera prueba a realizar para investigación del alérgeno. Consisten en la introducción de extractos alergénicos estandarizados o no estandarizados en la epidermis o en la dermis. El alérgeno introducido en la piel, si se encuentra con el Anticuerpo IgE específico fijado sobre las células polimorfonucleares (basófilos y

mastocitos) producirá una minirreacción Ag-Ac que induce vasodilatación capilar y edema. La prueba consiste en observar si se produce, o no, reacción alérgica local.

Método Prick-test: consiste en aplicar una gota de solución de alérgeno en la cara flexora del antebrazo, habiendo limpiado previamente la piel con alcohol al 70%, y luego puncionar la piel superficialmente levantándola algo con una lanceta en el área de la gota depositada, de este modo se introduce una mínima cantidad de extracto alérgico en la epidermis. En el adulto pueden aplicarse en cada antebrazo 10 o 12 Prick-test. Las reacciones positivas se presentan en el término de 15 a 30 minutos en forma de habón con eritema circundante. Según la intensidad de estas reacciones se les atribuye en general una puntuación que va de 1 a 4 puntos, los parámetros para reportar los resultados de las pruebas de hipersensibilidad cutánea con respecto a los controles positivo y negativo se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de las pruebas de hipersensibilidad cutánea contra alérgenos.

Reacción	Interpretación
Negativo	No existe roncha o la roncha no es más grande con respecto al control negativo. Eritema ausente o el área del eritema no es más grande con respecto al control negativo.
1+ (25%)	La roncha puede o no presentarse, sí se presenta, la roncha debe ser un poco más grande con respecto a la del control positivo. El área del eritema es más grande con respecto al área del control negativo.
2+ (50%)	Roncha de 5mm a 6mm, y el área del eritema usualmente abarca 10mm.
3+ (75%)	Roncha de 7mm a 9mm, y el área del eritema abarca cerca de 20mm. Ligera Pseudopódia y comezón pueden presentarse.
4+ (>75%)	Cualquier reacción con una roncha de 10mm o pseudopódia pronunciada. El área del eritema puede o no ser tan grande como la reacción 3+.
Nota: Usualmente los adultos presentan ronchas de 7mm a 9mm (reacción 3+) con el control positivo (fosfato de histamina), y las ronchas de los niños no exceden de los 5mm a 6mm.	

Para nuestro estudio y valoración de la reacción de hipersensibilidad cutánea a hongos en pacientes atópicos, se utilizaron los siguientes 18 extractos fúngicos estandarizados en concentración de 1:20 p/v (Marca: Allerstand): *Monilia sp*, *Helmintosporium sativum*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Ulocladium sp*, *Epicocum purpuracens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium sp*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Triticum aestivum*, *Cunninghamella sp*, *Rhodotorula sp*, *Absidia sp*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Para la aplicación de los alergenos fúngicos se utilizaron lancetas Duotip-Test estériles (LINCOLN DIAGNOSTIC, INC. Decatur, Illinois 62525 USA), realizando la técnica por rotación a 360° para la penetración del alergen a la piel. Debido a las diferentes respuestas de estimulación mecánica y química que se presentan en la piel de pacientes alérgicos es necesario comparar la reacción de sensibilidad de las muestras contra un control positivo y negativo; en nuestro estudio se utilizó una solución de fosfato de histamina como control positivo y una solución amortiguadora de fosfatos como control negativo.

8.2 Obtención de la muestra biológica.

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica de cada uno de los pacientes atópicos (solo aquellos que presentaron prueba cutánea positiva a hongos) y se depositaron en tubos de vidrio estéril de 13x75mm con tapón convencional lavanda, el tubo tenía como anticoagulante EDTA para 5 mL de sangre. La sangre extraída se utilizó con la finalidad de obtener y separar células mononucleadas mediante el método Ficoll-Paque (densidad = 1.077).

8.3 Preparación de medios de cultivo celular.

I) Medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) con o sin L-glutamina.

Descripción:

Formulación RPMI estándar con D-glucosa y bicarbonato de sodio, puede complementarse individualmente con L-glutamina.

RPMI 1640 (Gibco, Grand Island NY, USA) es un medio de cultivo celular básico usado para una gamma amplia de aplicaciones. Para perfeccionar el cultivo celular de ciertos tipos de células puede complementarse con suero, vitaminas y aminoácidos.

Modo de preparación:

- Se depositó el contenido del sobre (liofilizado del medio RPMI 1640) en un litro de agua desionizada estéril a 15 °C – 30 °C.

- Se disolvió perfectamente el polvo con ayuda de una barra magnética y un agitador.

- Se agregaron 2 g de NaHCO₃ por cada litro de medio RPMI 1640 preparado.

- Se ajustó el pH del medio a 0.2 – 0.3 debajo del deseado para trabajar (el pH óptimo para trabajar es de 7.2 a 7.5). Se recomienda usar NaOH 1N o HCl 1N (agregar lentamente).

- Se requirió, agregar antibiótico en solución al medio. (Adicionamos 200 µL de Gentamicina [160 mg/2 mL]/Litro).

- Se guardó el medio RPMI 1640 preparado en contenedor estéril (Refrigeración 4 °C, su tiempo útil es de seis meses).

- Una vez preparado el medio RPMI 1640 se esterilizó por filtración, mediante filtros milipore de 0.22 μ .

Nota: Toda la preparación del medio RPMI 1640 se realizó en campana de Bioseguridad Clase II.

II) Suero Fetal de Bovino Inactivado.

Se inactivó el suero de bovino previamente filtrado (filtros milipore de 0.22 μ) en baño maría a 55 °C/30 minutos, para desnaturalizar las proteínas del complemento.

III) Solución de RPMI + SFBI 10%.

En un tubo cónico estéril de 50 mL se depositaron 45 mL de medio RPMI 1640 y se agregaron 5 mL de SFBI inactivado, la solución se agitó en el vortex.

Para su uso en cultivos celulares se esterilizó por medio de filtros milipore de 0.22 μ .

8.4 Obtención y separación de células mononucleadas (Método: Ficoll-Paque d = 1.077).

La separación de células mononucleadas (MN) se realizó por el método de selección *Ficoll-hypaque* (Amersham Biosciences), con gradiente de densidad 1.077. Las células totales obtenidas de 10 mL de sangre periférica del paciente alérgico (con prueba de hipersensibilidad cutánea positiva a hongos) se depositaron en un tubo con anticoagulante (EDTA), se mezcló cuidadosamente y se paso a un tubo cónico de 50 mL, el cual contenía 10 mL de la solución de medio RPMI 1640 + SFBI 10%, la mezcla se adicionó a la solución 1:2 de *Ficoll-hypaque* (10 mL). Posteriormente, el tubo cónico se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos a 4 °C (centrifuga refrigerante eppendorf-Centrifuge 5804 R). El Ficoll tiene un gradiente de densidad igual al de células MN (linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células NK) pero menor que los eritrocitos y granulocitos. Los eritrocitos y polimorfonucleares (PMNs) formaron una pastilla en el fondo del tubo, mientras que las células MN quedaron en la interfase del medio y el Ficoll. Las células MN se separaron con ayuda de una pipeta pasteur o micropipeta de 1 mL, pasándose a otro tubo cónico donde fueron lavadas 2 veces con 10 mL de solución PBS (amortiguador de fosfato de potasio 0.015 M pH 7.4, NaCl 0.15 M) y centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos para su posterior utilización.

La suspensión celular se ajustó a una concentración final de 1×10^6 cel/mL, en Hemocitómetro (Cámara de Newbauer).

Nota: Toda la preparación de la obtención y separación de células MN debe realizarse en campana de Bioseguridad Clase II.

8.5 Determinación de la viabilidad de células MN (Método: Exclusión con Azul de Tripano al 4%).

Azul de tripano 4%.

Propiedades fisicoquímicas:

Formula: $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

pH: 9.8

Estado: Sólido

Color: Azul oscuro

Olor: Característico

Punto de fusión: 300 °C

Solubilidad: Soluble en agua, insoluble en etanol.

Modo de preparación:

Se pesaron 4 g de azul de tripano y se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada estéril.

Esta prueba de exclusión refleja la integridad de la membrana plasmática, ya que colorantes como el azul de Tripano no permean a través de la membrana íntegra en las células vivas. Se determinó la viabilidad celular en un hemocitómetro por el porcentaje de células teñidas de azul (muertas) contra el porcentaje de células no teñidas (vivas).

De las células obtenidas, se colocó una gota en el hemocitómetro y se agregaron 20 µL de azul de tripano al 4%, se observan al microscopio óptico a 40x.

Se aceptó la viabilidad celular igual a 95%.

8.6 Obtención de sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por extractos fúngicos estandarizados.

Las células MN se sembraron en cajas estériles de 96 pozos de fondo plano (Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA), a 2×10^5 células/100 μ L por pozo en medio RPMI-1640 completo. Las células se trataron con diferentes extractos fúngicos (extractos de hongos utilizados en la prueba cutánea): *Helminthosporium sativum*, *Penicillium notatum*, *Monilia sp*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Ulocladium sp*, *Epicocum purpuracens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium sp*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Triticum aestivum*, *Cunninghamella sp*, *Rhodotorula sp*, *Absidia sp*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*) a partir de una concentración de 1:20 p/v, el volumen de adición de los extractos fúngicos fue de 20 μ L/pozo. Las células se incubaron durante 24h, 48h y 72 horas a 37 °C en una incubadora (CO₂ Incubator – SHEL LAB) con atmósfera de CO₂ al 5%. A cada pozo se le adicionó 80 μ L de RPMI 1640 + SFBI al 10% como fuente de nutriente.

El control negativo consistió en células mononucleadas no tratadas con extracto fúngico: 2×10^5 células/100 μ L pozo y 100 μ L de RPMI 1640 + SFBI al 10% como fuente de nutriente.

Se usó como control adicional de proliferación a 20 μ L de Concanavalina A (Con A), células mononucleadas 2×10^5 células/100 μ L pozo y 80 μ L de RPMI 1640 + SFBI al 10% como fuente de nutriente.

Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular a las 24h, 48h y 72 horas en tubos eppendorf de 1 mL.

8.7 Determinación de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivo celular (Método: ELISA).

ELISA es una técnica inmunoenzimática muy común, frecuentemente utilizada en alergología, en nuestro estudio determinamos la concentración de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas activadas por alérgenos fúngicos, mediante este método. Utilizamos 3 Kits de ELISA de la marca *Amersham Biosciences*:

1. Interleukin 4 (IL-4) Human, Biotrak ELISA system.
2. Interleukin 5 (IL-5) Human, Biotrak ELISA system.
3. Interleukin 13 (IL-13) Human, Biotrak ELISA system.

Fundamento de la prueba.

Una capa de anticuerpo monoclonal anti-IL-4 (anti-IL-5 o anti-IL-13 según la citocina que se vaya a determinar) se encuentra adherida en cada uno de los 96 pocillos de la placa, la IL-4 (IL-5 o IL-13) presente en la muestra o en las soluciones estándar se une a la capa del anticuerpo monoclonal; posteriormente un conjugado con biotina anti-IL-4 (conjugado con biotina anti-IL-5 o anti-IL-13) se une a la IL-4 (IL-5 o IL-13) capturada por el primer anticuerpo, se incorpora Streptavidin-HRP que se une al conjugado con biotina anti-IL-4 (conjugado con biotina anti-IL-5 o anti-IL-13), Figura 5.

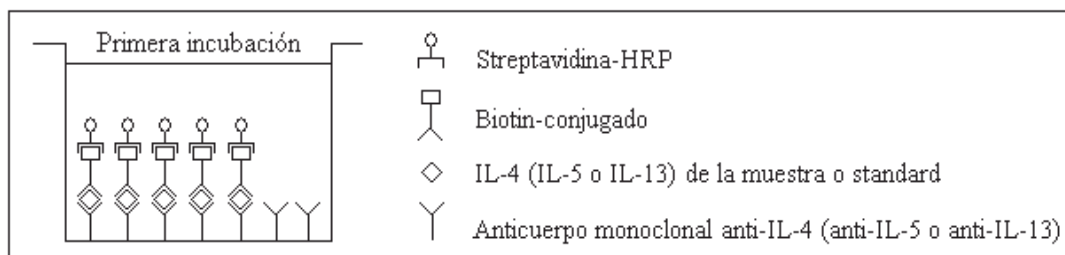


Figura 5. Esquemización de los reactivos empleados durante la primera incubación en ELISA.

Pasado el tiempo de la primera incubación, el conjugado con biotina anti-IL-4 (conjugado con biotina anti-IL-5 o anti-IL-13) y la Streptavidina HRP que no se unieron durante esta incubación, fueron removidos por un buffer de lavado, posteriormente se agregó una solución con sustrato TMB (Figura 6-A). Un producto de color es formado en proporción a la cantidad de IL-4 (IL-5 o IL-13) presente en la muestra (Figura 6-B), la reacción es detenida por adición de ácido H₂SO₄ 0.18M. Por último, se determinó la concentración de las muestras, mediante una lectura de absorbancia a 450nm (lector de ELISA).

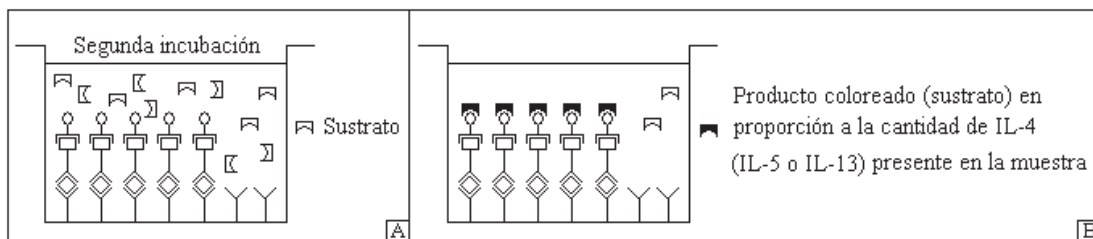


Figura 6. Esquematización de los reactivos empleados durante la segunda incubación en ELISA.

En la figura 7 se observa el diagrama a bloques del resumen de la metodología empleada en ELISA, para la determinación de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos.

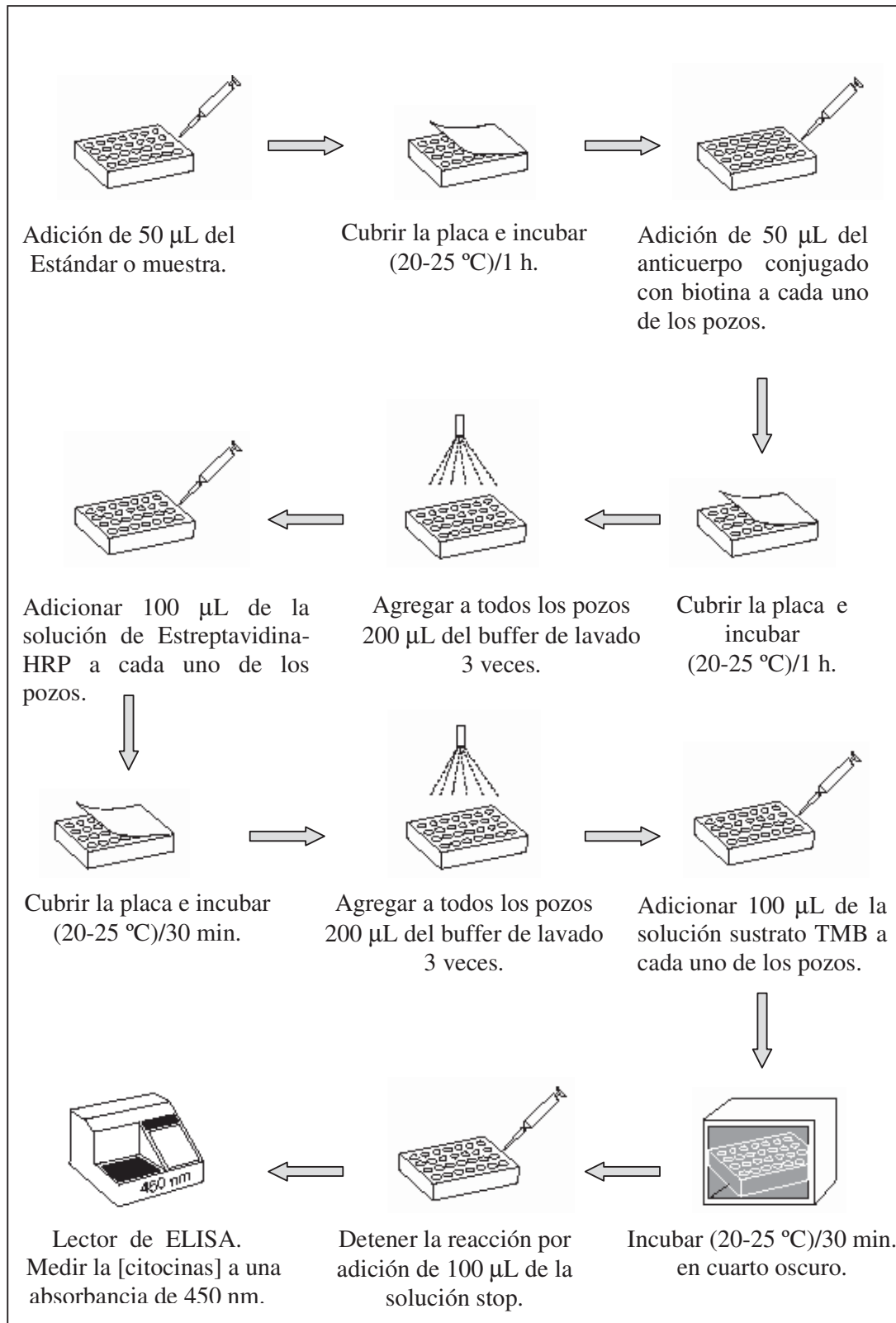


Figura 7. Diagrama a bloques de la metodología empleada para determinación de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) por ELISA.

8.8 Análisis estadístico.

- Se utilizó el *método de mínimos cuadrados* para realizar el ajuste de la recta de la curva estándar y poder determinar las concentraciones de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13).

- Se comparó la expresión de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 en C+ vs. C-, mediante el análisis de medias por *t de student*.

- Se determinó el *índice de estimulación* de la muestra; 1) con respecto al C+ y 2) con respecto al C-.

Tabla 3. Fórmulas utilizadas para la obtención del índice de estimulación.

Índice de estimulación IL-4	=	$\frac{[\text{IL-4 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-4 humana}] \text{ del Control positivo}}$
Índice de estimulación IL-5	=	$\frac{[\text{IL-5 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-5 humana}] \text{ del Control positivo}}$
Índice de estimulación IL-13	=	$\frac{[\text{IL-13 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-13 humana}] \text{ del Control positivo}}$
Índice de estimulación IL-4	=	$\frac{[\text{IL-4 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-4 humana}] \text{ del Control Negativo}}$
Índice de estimulación IL-5	=	$\frac{[\text{IL-5 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-5 humana}] \text{ del Control Negativo}}$
Índice de estimulación IL-13	=	$\frac{[\text{IL-13 humana}] \text{ de muestra}}{[\text{IL-13 humana}] \text{ del Control Negativo}}$

- *Análisis de la varianza y distribución de Fisher*; pruebas estadísticas utilizadas para comparar la expresión de citocinas durante la respuesta inmune a hongos.

- *Prueba exacta de Fisher*, nos permite valorar el comportamiento cinético de expresión de citocinas a las 24h, 48h y 72h.

9. RESULTADOS

9.1 Pruebas de hipersensibilidad cutánea positiva a alergenos fúngicos.

Durante la realización de pruebas de hipersensibilidad cutánea a hongos en pacientes atópicos con rinitis alérgica observamos los siguientes resultados: en el paciente 1 se observó en el C+ un área del eritema de 30 mm, en C- de 5 mm y en *Candida albicans* 11 mm, en el paciente 2 el área del eritema en C+ fue de 20 mm, en C- de 4 mm, en *Mucor racemosus* de 15 mm y en *Alternaria alternata* fue de 14 mm. Para el paciente 3 el área del eritema en C+ fue de 13 mm, en C- de 5 mm, en *Rhizopus stolonifer* de 10 mm y en *Rhodotorula* de 17 mm. Por último, el paciente 4 presentó un área de eritema en C+ de 25 mm, en C- de 6 mm, en *Curvularia lunata* de 10 mm, en *Cunninganella* de 15 mm y en *Penicillium notatum* de 15 mm. En la tabla 4 se observan los principales hongos que causaron sensibilización en pruebas cutáneas.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de hipersensibilidad cutánea positivas a hongos en pacientes atópicos con rinitis alérgica.

Paciente	Sensibilización al hongo	Reacción
1	<i>Candida albicans</i>	++
2	<i>Alternaria alternata</i>	+++
	<i>Mucor racemosus</i>	+++
3	<i>Rhizopus stolonifer</i>	++++
	<i>Rhodotorula</i>	++++
4	<i>Curvularia lunata</i>	++
	<i>Cunninganella</i>	+++
	<i>Penicillium notatum</i>	+++

9.2 Curva patrón para la determinación de IL-4 por ensayo ELISA.

La curva patrón para la determinación de concentraciones de IL-4 mostró los siguientes parámetros: coeficiente de regresión lineal $r = 1$, pendiente = 0.012 e intercepto en el eje $y = 0.87$, lo que se consideró adecuado para las mediciones que se efectuaron en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alergenos fúngicos. La figura 8 es una representación gráfica de dicha curva.

9.3 Curva patrón para la determinación de IL-5 por ensayo ELISA.

La curva patrón para la determinación de concentraciones de IL-5 mostró los siguientes parámetros: coeficiente de regresión lineal $r = 1$, pendiente = 0.008 e intercepto en el eje $y = 0.918$, lo que se consideró adecuado para las mediciones que se efectuaron en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alergenos fúngicos. La figura 9 es una representación gráfica de dicha curva.

9.4 Curva patrón para la determinación de IL-13 por ensayo ELISA.

La curva patrón para la determinación de concentraciones de IL-13 mostró los siguientes parámetros: coeficiente de regresión lineal $r = 1$, pendiente = 0.043 e intercepto en el eje $y = 0.741$, lo que se consideró adecuado para las mediciones que se efectuaron en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alergenos fúngicos. La figura 10 es una representación gráfica de dicha curva.

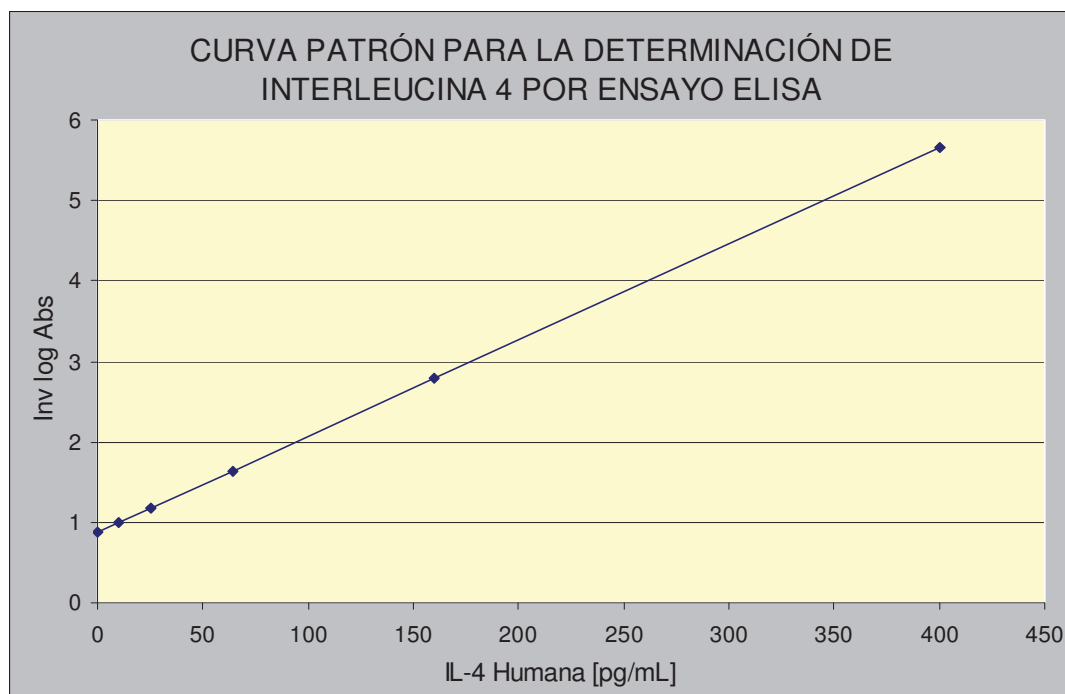


Figura 8. Los puntos representan las concentraciones detectables de interleucina 4 expresadas en pg/mL según el inverso del logaritmo de la absorbancia.

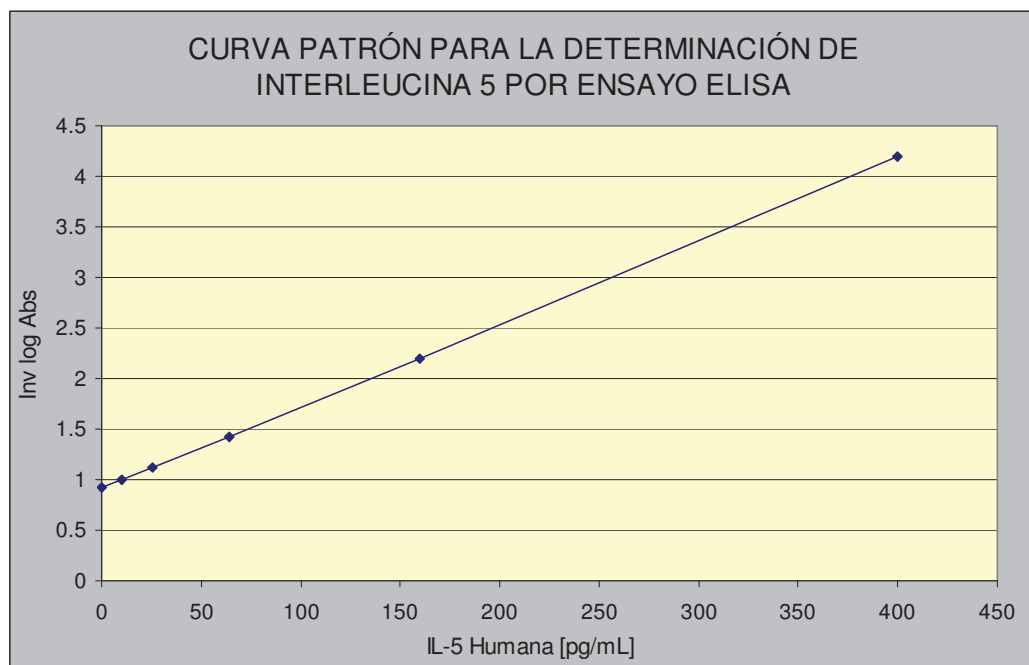


Figura 9. Los puntos representan las concentraciones detectables de interleucina 5 expresadas en pg/mL según el inverso del logaritmo de la absorbancia.

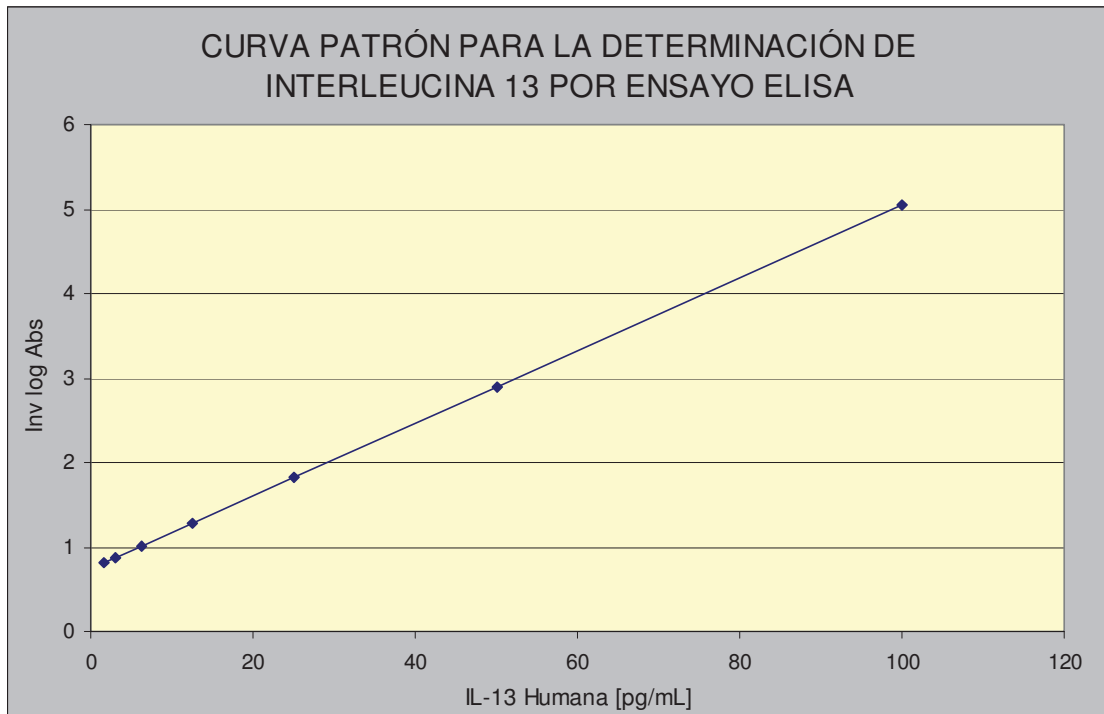


Figura 10. Los puntos representan las concentraciones detectables de interleucina 13 expresadas en pg/mL según el inverso del logaritmo de la absorbancia.

9.5 Citocinas detectadas por ELISA, en cultivos de células MN provenientes de pacientes con prueba cutánea positiva a alérgenos fúngicos.

Tabla 5. Concentraciones detectadas de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos.

Paciente 1	IL-4 Humana [pg/mL]	IL-5 Humana [pg/mL]	IL-13 Humana [pg/mL]
C- 24h	3.5	6.25	6
C- 48h	6.85	6.25	6
C- 72h	12.5	No detectable	6
C+ 24h	5.25	31.25	18.25
C+ 48h	7.5	31.25	19.25
C+ 72h	8.5	26	19.25
<i>Candida albicans</i> 24h	9.5	No detectable	6.25
<i>Candida albicans</i> 48h	6	No detectable	6
<i>Candida albicans</i> 72h	166	No detectable	6
Paciente 2	IL-4 Humana [pg/mL]	IL-5 Humana [pg/mL]	IL-13 Humana [pg/mL]
C- 24h	28.5	No detectable	6.4
C- 48h	31	1.25	6.25
C- 72h	26.25	No detectable	6.6
C+ 24h	15.25	3.75	3.6
C+ 48h	14.5	6.25	3.6
C+ 72h	11	6.25	6.6
<i>Alternaria alternata</i> 24h	7.5	No detectable	6.4
<i>Alternaria alternata</i> 48h	107	8.75	6.4
<i>Alternaria alternata</i> 72h	29.5	19.75	6.4
<i>Mucor racemosus</i> 24h	24.5	No detectable	6.25
<i>Mucor racemosus</i> 48h	26.25	No detectable	6.4
<i>Mucor racemosus</i> 72h	17.75	No detectable	6.6
Paciente 3	IL-4 Humana [pg/mL]	IL-5 Humana [pg/mL]	IL-13 Humana [pg/mL]
C- 24h	14.5	No detectable	6.25
C- 48h	9.5	No detectable	6.4
C- 72h	8.5	No detectable	6.4
C+ 24h	125	14.75	6.25
C+ 48h	32.75	No detectable	6
C+ 72h	32	6.25	6
<i>Rhodotorula</i> 24h	37	No detectable	6
<i>Rhodotorula</i> 48h	24	No detectable	6.4
<i>Rhodotorula</i> 72h	15.25	No detectable	6.25
<i>Rhizopus stolonifer</i> 24h	13.5	No detectable	6.25
<i>Rhizopus stolonifer</i> 48h	6	2.5	6.25
<i>Rhizopus stolonifer</i> 72h	96	No detectable	6.25
Paciente 4	IL-4 Humana [pg/mL]	IL-5 Humana [pg/mL]	IL-13 Humana [pg/mL]
C- 24h	43.75	No detectable	6.25
C- 48h	27	No detectable	6.25
C- 72h	38.75	No detectable	6.25
C+ 24h	33.5	No detectable	6.25
C+ 48h	16	6.25	6.25
C+ 72h	11	No detectable	6.9

Valoración de la respuesta inmune *in vitro* de hongos alergénicos asociados a rinitis alérgica

<i>Penicillium notatum</i> 24h	7.5	No detectable	6.25
<i>Penicillium notatum</i> 48h	43.5	4.75	6.6
<i>Penicillium notatum</i> 72h	No detectable	2.5	6.4
<i>Cunninganella</i> 24h	No detectable	1.25	6.4
<i>Cunninganella</i> 48h	3.5	16.25	6.6
<i>Cunninganella</i> 72h	No detectable	4.75	6.6
<i>Curvularia lunata</i> 24h	No detectable	2.5	6.4
<i>Curvularia lunata</i> 48h	No detectable	1.25	6.6
<i>Curvularia lunata</i> 72h	No detectable	2.5	6.6

Los niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos, resultaron no detectables a las 72h en *Penicillium notatum*, *Cunninganella* (24h y 72h) y *Curvularia lunata* (24h, 48h y 72h). Con respecto a los niveles de IL-5, resultaron no detectables a las 72h en C- del paciente 1, *Candida albicans* (24h, 48h y 72h), en C- (24h y 48h) del paciente 2, además de *Alternaria alternata* (24h) y *Mucor racemosus* (24h, 48h y 72h), en el paciente 3 a C- (24h, 48h y 72h), C+ (48h), *Rhodotorula* (24h, 48h y 72h) y *Rhizopus stolonifer* (24h y 72h), por último, en el paciente 4 a C- (24h, 48h y 72h), C+ (24h y 72h) y *Penicillium notatum* (24h). En cuanto a los niveles de expresión de IL-13 en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos, fue detectada tanto en muestras como en controles en todos los tiempos evaluados.

9.6 Expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 inducida por mitógeno policlonal y la expresión espontánea por células en cultivo.

De la tabla 6 se obtuvieron los siguientes datos: con respecto a C+, IL-5 $n_1 = 12$, $X_1 = 11$ pg/mL, $S_1 = 11.93$ pg/mL, para IL-4 $n_1 = 12$, $X_1 = 26.02$ pg/mL, $S_1 = 32.63$ pg/mL y para IL-13 $n_1 = 12$, $X_1 = 9.02$ pg/mL, $S_1 = 6.067$ pg/mL. Para C-: IL-5 $n_2 = 12$, $X_2 = 1.15$ pg/mL, $S_2 = 2.41$ pg/mL, IL-13 $n_2 = 12$, $X_2 = 6.25$ pg/mL, $S_2 = 0.19$ pg/mL e IL-4 $n_2 = 12$, $X_2 = 20.88$ pg/mL, $S_2 = 13.35$ pg/mL. Por lo tanto, se llevaron a cabo pruebas t student de dos muestras, bilaterales, a un nivel de significancia en $\alpha = 0.05$ y con g.l. = $n_1 + n_2 - 2$. La H_0 : $\mu_{C+} = \mu_{C-}$; establece que no existe diferencia en los niveles medios de expresión de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN del C+ con respecto al C-, H_A : $\mu_{C+} \neq \mu_{C-}$.

Tabla 6. Resultados del análisis estadístico de la expresión de citocinas presentes en C+ vs. C- por prueba t de student.

Distribución t student				
C+ vs. C-	$t_{calculada}$		$t_{crítica}$	valor de p
IL-4	2.62	>	2.07	0.05
IL-5	3.09	>	2.07	0.05
IL-13	1.58	<	2.07	0.05

En los casos de IL-4 e IL-5 la $t_{calculada}$ fue de 2.62 y 3.09 respectivamente, estos valores se encuentran cerca de una $p = 0.005$ y a comparación de la $t_{crítica}$ que fue 2.07 son más altos, lo que indica que p es menor que 0.05, por lo tanto rechazamos la

$H_0: \mu_{C+} = \mu_C$. en el nivel de significancia $\alpha = 0.05$, esto nos indica que existe diferencia significativa entre los niveles medios de las concentraciones de IL-4 e IL-5 expresadas en sobrenadantes de cultivo de células MN entre C+ (Concanavalina A) y C-, por lo tanto se acepta la $H_A: \mu_{C+} \neq \mu_C$.

Sin embargo, en el caso de IL-13 la $t_{calculada}$ fue de 1.58 a comparación de la $t_{crítica}$ que fue 2.07, lo que indica que estos dos valores se encuentran a una $p = 0.05$, por lo tanto aceptamos la $H_0: \mu_{C+} = \mu_C$ en el nivel de significancia 0.05. Esto nos indica que los niveles medios de las concentraciones de IL-13 expresadas en sobrenadantes de cultivo de células MN son semejantes en C+ (Concanavalina A) con respecto a C-, por lo tanto se rechaza la $H_A: \mu_{C+} \neq \mu_C$.

9.7 Índice de estimulación, expresada en veces X.

El paciente 1 con prueba cutánea positiva a *Candida albicans* (++) , presentó un máximo pico de expresión de IL-4 a las 72h con 19.5 veces mayor a la estimulación respecto a C+ y 13.2 veces superior la estimulación respecto a C-, el comportamiento de IL-13 mantuvo su expresión a las 24h, 48h, y 72h, con 0.3 veces menor la estimulación respecto a C+ e igual a la alcanzada con el C-, no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado (tablas A y B).

El paciente 2 con prueba cutánea positiva a *Alternaria alternata* (+++) y *Mucor racemosus* (+++), presentó para *Alternaria alternata* un máximo pico de expresión de IL-4 a las 48h con 7.4 veces superior a la estimulación respecto a C+ y 3.5 veces mayor la estimulación respecto a C-, la expresión de IL-13 fue a las 24h y 48h 1.8 veces superior a la estimulación respecto a C+ y una estimulación igual al C- durante toda la cinética, para IL-5 el máximo pico de expresión fue a las 72h con 3.2 veces superior a la estimulación respecto al C+ y 7 veces mayor la estimulación respecto al C- a las 48h (tablas C y D). Con respecto a *Mucor racemosus*, el máximo pico de expresión de IL-4 fue a las 48h con 1.8 veces superior a la estimulación respecto a C+ y una estimulación igual a 0.9 veces respecto al C- a las 24h, para IL-13 el máximo pico de expresión fue a las 48h con 1.8 veces superior a la estimulación respecto al C+ y 1 veces igual la estimulación respecto a C- a las 24h, 48h y 72h, no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado (tablas E y F).

El paciente 3 con prueba cutánea positiva a *Rhodotorula* (++++) y *Rhizopus stolonifer* (++++), presentó para *Rhodotorula* un máximo pico de expresión de IL-4 a las 48h con 0.7 veces igual a la estimulación sobre C+ y a las 24h con 2.6 veces

mayor la estimulación sobre C-, IL-13 presentó un máximo pico de expresión a las 48h con 1,1 veces superior a la estimulación sobre C+ y se comportó de igual manera a las 24h, 48h y 72h con 1 veces igual la estimulación respecto a C-, no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado (tablas G y H). Respecto a *Rhizopus stolonifer* presentó un máximo pico de expresión de IL-4 a las 72h con 3 veces mayor la estimulación respecto a C+ y 11.3 veces superior a la estimulación respecto a C-, no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado, IL-13 se comportó igual durante toda su cinética (24h, 48h y 72h) similar a la encontrada en C+ y C- (tablas I y J).

El paciente 4 con prueba cutánea positiva a *Penicillium notatum* (+++), *Cunninganella* (+++) y *Curvularia lunata* (++) , presentó para *Penicillium notatum* un máximo pico de expresión de IL-4 a las 48h con 2.7 veces superior a la estimulación respecto a C+ y 1.6 veces mayor la estimulación sobre C-, no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado con respecto a C-, para IL-13 el máximo pico de expresión fue a las 48h con 1.1 veces mayor la estimulación respecto a C+ y C- (tablas K y L). Para *Cunninganella* el máximo pico de expresión de IL-4 fue a las 48h con 0.2 veces menor la estimulación sobre C+ y 0.1 veces menor a la estimulación respecto a C-, para IL-5 el máximo pico de expresión fue a las 48h con 2.6 veces superior a la estimulación respecto a C+ y no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo respecto a C-, el pico máximo de expresión de IL-13 fue a las 48h con 1.1 veces superior a la estimulación respecto a C+ y C- (tablas M y N). Por último, para *Curvularia lunata* no se estimuló la síntesis de IL-4 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado respecto a C+ y C-, para IL-5 el máximo pico de expresión fue a las 48h con 0.2

Valoración de la respuesta inmune *in vitro* de hongos alergénicos asociados a rinitis alérgica

veces menor a la estimulación respecto a C+ y no se estimuló la síntesis de IL-5 sobre células MN activadas con los extractos fúngicos en el tiempo evaluado respecto a C-, para IL-13 el máximo pico de expresión fue a las 48h con 1.1 veces superior a la estimulación respecto a C+ y C- (tablas O y P).

Tabla 7. Resultados del índice de estimulación (tablas A-P).

Paciente 1				Paciente 1			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	1.8	0.8	19.5	IL-4	2.7	0.9	13.2
IL-5	0	0	0	IL-5	0	0	0
IL-13	0.3	0.3	0.3	IL-13	1	1	1

A) Índice de estimulación a *Candida albicans* (m/C+). B) Índice de estimulación a *Candida albicans* (m/C-).

Paciente 2				Paciente 2			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0.5	7.4	2.7	IL-4	0.3	3.5	1.1
IL-5	0	1.4	3.2	IL-5	0	7	0
IL-13	1.8	1.8	1	IL-13	1	1	1

C) Índice de estimulación a *Alternaria alternata* (m/C+). D) Índice de estimulación a *Alternaria alternata* (m/C-).

Paciente 2				Paciente 2			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	1.6	1.8	1.6	IL-4	0.9	0.8	0.7
IL-5	0	0	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1.7	1.8	1	IL-13	1	1	1

E) Índice de estimulación a *Mucor racemosus* (m/C+). F) Índice de estimulación a *Mucor racemosus* (m/C-).

Paciente 3				Paciente 3			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0.3	0.7	0.5	IL-4	2.6	2.5	1.8
IL-5	0	0	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1	1.1	1	IL-13	1	1	1

G) Índice de estimulación a *Rhodotorula* (m/C+). H) Índice de estimulación a *Rhodotorula* (m/C-).

Paciente 3				Paciente 3			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0.1	0.2	3	IL-4	0.9	0.6	11.3
IL-5	0	0	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1	1	1	IL-13	1	1	1

I) Índice de estimulación a *Rhizopus stolonifer* (m/C+). J) Índice de estimulación a *Rhizopus stolonifer* (m/C-).

Paciente 4				Paciente 4			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0.2	2.7	0	IL-4	0.2	1.6	0
IL-5	0	0.8	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1	1.1	0.9	IL-13	1	1.1	1

K) Índice de estimulación a *Penicillium notatum* (m/C+). L) Índice de estimulación a *Penicillium notatum* (m/C-).

Paciente 4				Paciente 4			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0	0.2	0	IL-4	0	0.1	0
IL-5	0	2.6	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1	1.1	1	IL-13	1	1.1	1.1

M) Índice de estimulación a *Cunninganella* (m/C+). N) Índice de estimulación a *Cunninganella* (m/C-).

Paciente 4				Paciente 4			
Citocina	24 horas	48 horas	72 horas	Citocina	24 horas	48 horas	72 horas
IL-4	0	0	0	IL-4	0	0	0
IL-5	0	0.2	0	IL-5	0	0	0
IL-13	1	1.1	1	IL-13	1	1.1	1.1

O) Índice de estimulación a *Curvularia lunata* (m/C+). P) Índice de estimulación a *Curvularia lunata* (m/C-).

9.8 Análisis de varianza de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmune a hongos alergénicos.

Tabla 8. Resultados del análisis estadístico de la expresión entre citocinas por medio de la distribución de Fisher.

Análisis de la varianza	Distribución de Fisher			
	F calculada		F crítica	valor de p
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m/C+)}{\sigma_{TOT} (IL-5_m/C+)}$	4.76	>	3.79	0.05
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m/C+)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m/C+)}$	14.9	>	8.89	0.005
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-5_m/C+)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m/C+)}$	3.14	<	3.79	0.05
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m/C-)}{\sigma_{TOT} (IL-5_m/C-)}$	3.9	>	3.79	0.05
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m/C-)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m/C-)}$	86.3	>	15.02	0.001
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-5_m/C-)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m/C-)}$	22	>	15.02	0.001

Analizar nuestros datos por medio de la distribución de Fisher nos permitió comparar la expresión entre las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 liberadas durante las diferentes respuestas inmunológicas *in vitro* a hongos, con respecto al C+ y C-. Se admitió como significancia estadística a una P = 0.05. La expresión de Interleucina 4 presente en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos sobre C+ y C- se encuentra más elevada, con respecto a la expresión de IL-13 e IL-5 sobre C+ y C-, esto

índica el predominio de la expresión de IL-4 en las primeras 72 horas de la respuesta inmunológica *in vitro* a hongos alergénicos, a diferencia de la expresión de IL-13 e IL-5.

No existió significancia estadística a una $P = 0.05$ entre la expresión de IL-5 presente en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alérgenos fúngicos sobre C+, con respecto a la expresión de IL-13 sobre C+. Al comparar la expresión de IL-5 con la de IL-13 respecto al control negativo, sí existió significancia estadística a una $P = 0.001$.

9.9 Expresión de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos.

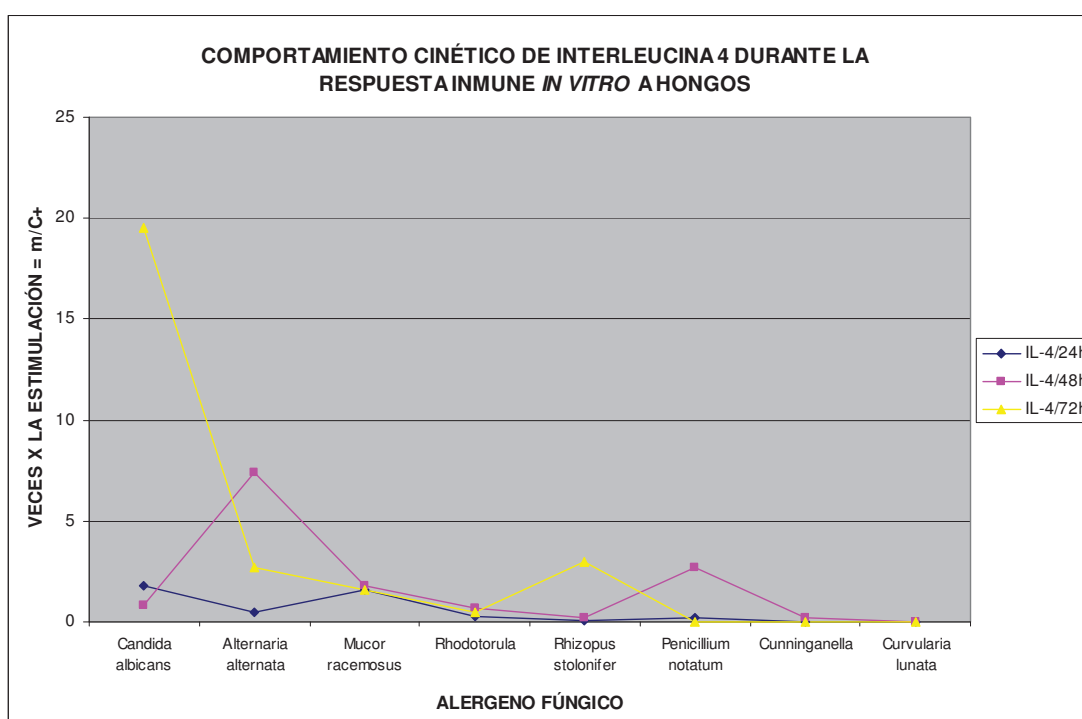


Figura 11. Expresión de IL-4 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida por un mitógeno policlonal.

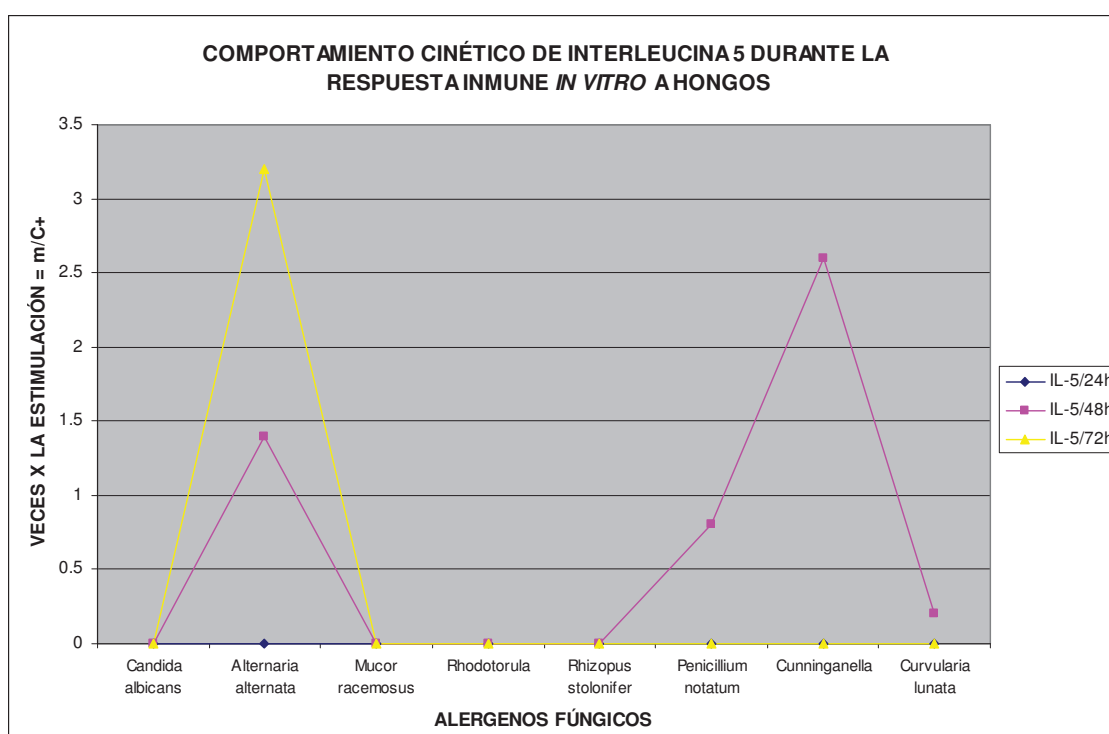


Figura 12. Expresión de IL-5 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida por un mitógeno policlonal.

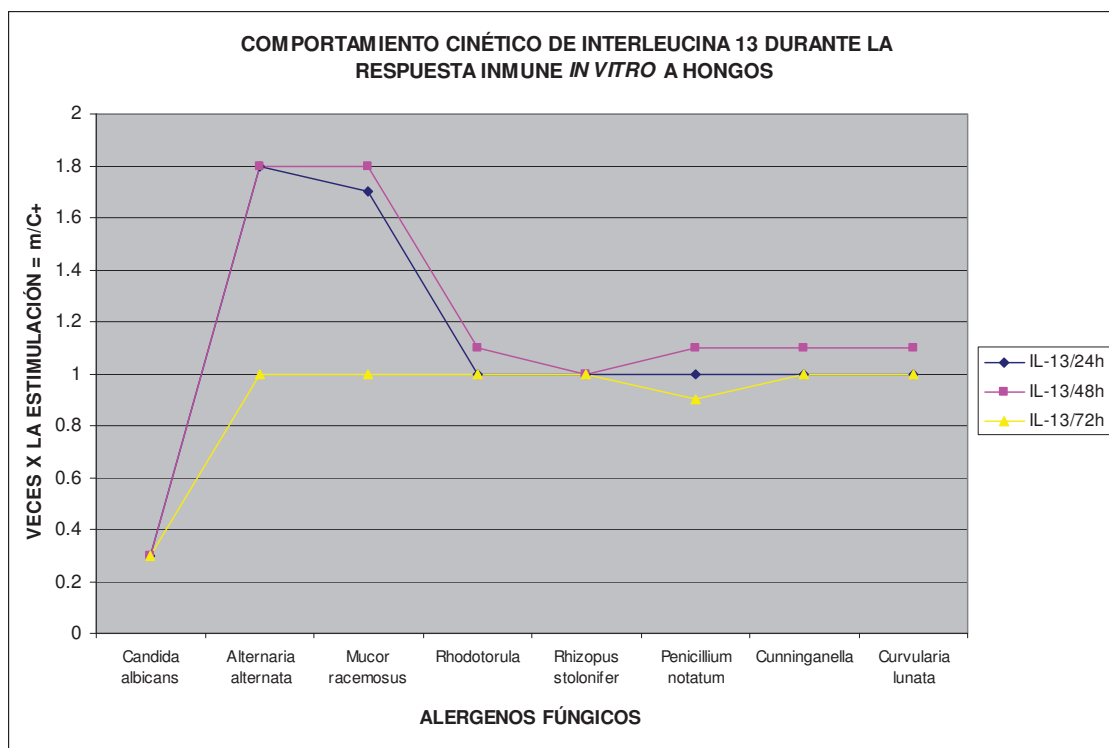


Figura 13. Expresión de IL-13 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida por un mitógeno policlonal.

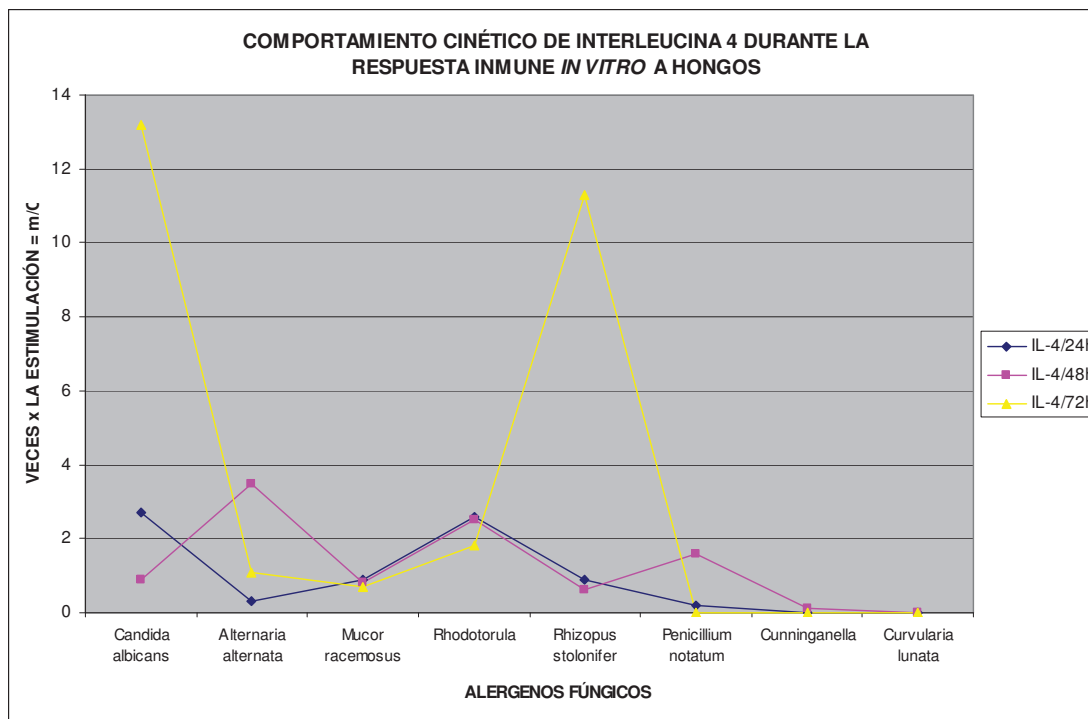


Figura 14. Expresión de IL-4 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida espontáneamente por células MN.

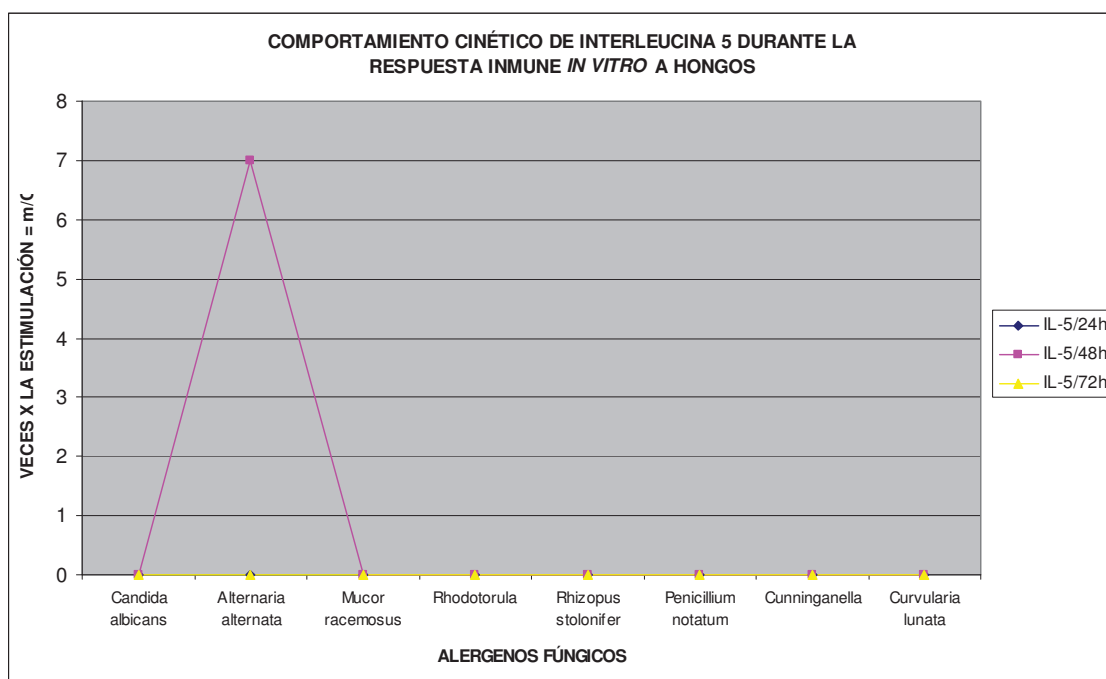


Figura 15. Expresión de IL-5 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida espontáneamente por células MN.

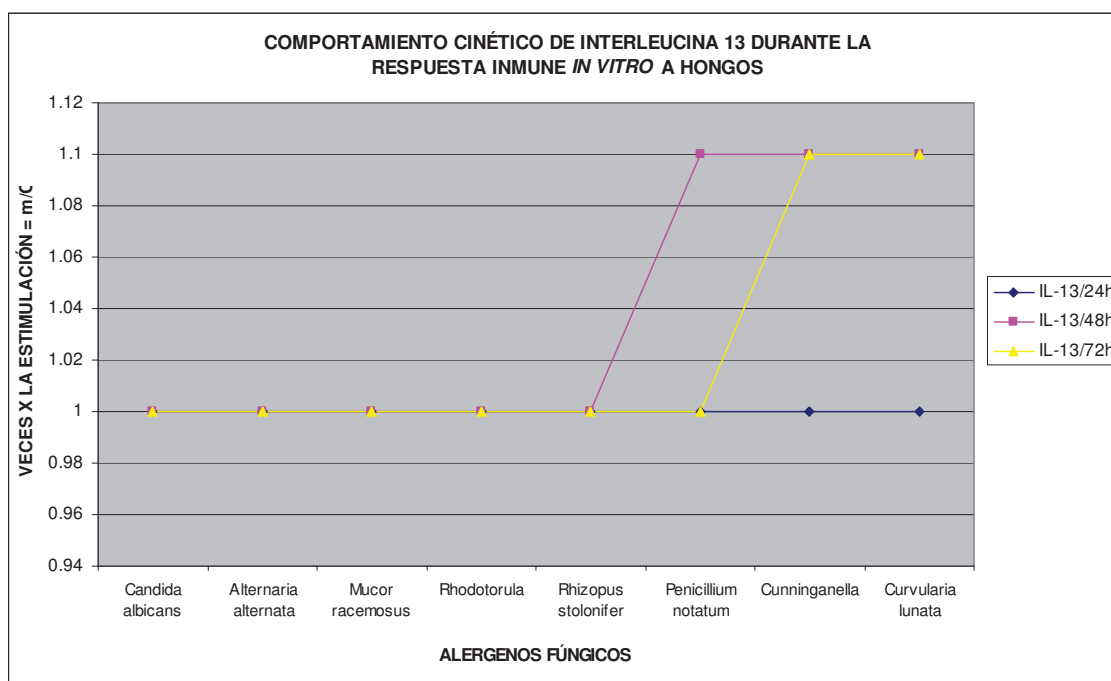


Figura 16. Expresión de IL-13 por células mononucleadas en las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida espontáneamente por células MN.

9.10 Cinética de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en 24h, 48h y 72 horas.

De la tabla 8 se obtuvieron los siguientes datos: el índice de estimulación de IL-4 con respecto a C-, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 0.95$, $S_{24h} = 1.11$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 1.25$, $S_{48h} = 1.22$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 3.51$, $S_{72h} = 5.45$. Para el índice de estimulación de IL-5 con respecto a C-, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 0$, $S_{24h} = 0$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 0.625$, $S_{48h} = 0.95$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 0.4$, $S_{72h} = 7.84$ y para el índice de estimulación de IL-13 con respecto a C-, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 1$, $S_{24h} = 0$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 1.04$, $S_{48h} = 0.05$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 1.025$, $S_{72h} = 0.05$.

También se obtuvieron los siguientes datos: el índice de estimulación de IL-4 con respecto a C+, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 0.56$, $S_{24h} = 0.72$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 1.73$, $S_{48h} = 2.47$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 3.41$, $S_{72h} = 6.61$. Para el índice de estimulación de IL-5 con respecto a C+, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 0$, $S_{24h} = 0$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 0.625$, $S_{48h} = 0.95$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 0.4$, $S_{72h} = 7.84$ y para el índice de estimulación de IL-13 con respecto a C+, presentó una $n_{24h} = 8$, $X_{24h} = 1.1$, $S_{24h} = 0.47$, $n_{48h} = 8$, $X_{48h} = 1.16$, $S_{48h} = 0.48$ y para $n_{72h} = 8$, $X_{72h} = 0.9$, $S_{72h} = 0.24$. Por lo tanto, se llevaron a cabo pruebas de distribución F , a un nivel de significancia en $\alpha = 0.05$ y con $K-1 = 3 - 1 = 2$ y $n - K = 24 - 3 = 21$ grados de libertad. La $H_o: \mu_{24} = \mu_{48} = \mu_{72}$ establece que no existe diferencia en la expresión de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 a las 24h, 48h y 72h, presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN, H_A : indica que por lo menos una de las medias de las concentraciones de citocinas a un tiempo determinado difiere de las otras.

Tabla 9. Resultados del comportamiento cinético de citocinas T_H2 en sobrenadantes de cultivo celular de 24h, 48h, y 72h respecto al C+.

Distribución F				
m/C+	t _{calculada}		t _{crítica}	valor de p
IL-4	0.98	<	3.49	0.05
IL-5	1.20	<	3.49	0.05
IL-13	1.68	<	3.49	0.05

Tabla 10. Resultados del comportamiento cinético de citocinas T_H2 en sobrenadantes de cultivo celular de 24h, 48h, y 72h respecto al C-

Distribución F				
m/C-	t _{calculada}		t _{crítica}	valor de p
IL-4	1.45	<	3.49	0.05
IL-5	2.14	<	3.49	0.05
IL-13	1.58	<	3.49	0.05

Los resultados de las tablas 10 y 11 indican que para una distribución *F* con $K-1 = 3 - 1 = 2$ y $n - K = 24 - 3 = 21$ grados de libertad, $p > 0.10$. Por tanto, rechazamos la H_A y aceptamos la H_0 : $\mu_{24} = \mu_{48} = \mu_{72}$. Concluimos, que la expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) con respecto al C+ y C-, puede darse a cualquier tiempo (24h, 48h o 72h), durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos.

10. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio las principales contribuciones son: 1) se comprobó la potencia alérgica que presenta *Alternaria alternata* sobre otras especies de hongos, al inducir un incremento en los niveles de expresión de IL-4 e IL-5 en sobrenadantes de cultivo de células MN, 2) determinar el índice de estimulación permite estimar la magnitud de la respuesta alérgica a extractos fúngicos, 3) en los sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por extractos fúngicos observamos que IL-4 es la principal citocina T_H2 liberada en la modulación de la respuesta alérgica a hongos y 4) la liberación de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no siguen un patrón de expresión regular a través del tiempo, durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos alergénicos.

Durante la valoración clínica del paciente con sospecha de alergia respiratoria IgE mediada frente a hongos, es fundamental la realización de pruebas *in vivo*. En México Martínez Ordaz VA y cols., (2002) y Tafolla Muñoz I., (2004), llevaron a cabo estudios sobre la sensibilización alérgica a hongos en pacientes con alergia respiratoria (rinitis alérgica y/o asma con o sin sinusitis) con edades entre 23.33 ± 13 años, en estos estudios las reactividades más frecuentes obtenidas para prueba cutánea a hongos con el método de Prick-Test fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Monilia*, *Mucor*, *Candida*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Helminthosporium*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Similares sensibilizaciones a hongos y rangos de edades fueron observadas en los pacientes (edades entre 27.5 ± 3.05 años) que participaron en nuestro estudio. De los 18 extractos fúngicos estandarizados que se probaron en las pruebas cutáneas, se encontraron respuestas de hipersensibilidad positivas a: *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Curvularia lunata*, *Rhodotorula*, *Cunninganella* y *Penicillium notatum*.

La determinación de mediadores solubles que intervienen en la modulación de la respuesta inmune, ejemplo las citocinas expresadas en procesos inflamatorios durante situaciones de enfermedad, ha tenido un papel importante en la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos. Repta-Ramírez S y cols., (2002) con el fin de comparar el grado de inflamación entre pacientes con sinusitis aguda, síndrome de astenia crónica y rinitis alérgica, determinaron las concentraciones de diversas citocinas (IL-8, TNF α y NGF) en el líquido de lavados nasales. Por otra parte, López Velásquez B y cols., (2004) observaron el comportamiento de las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 e IFN γ en suero de pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia. Estos estudios clínicos permiten evaluar el impacto que tiene la determinación de citocinas a partir de muestras biológicas de pacientes que presentan alguna enfermedad respiratoria alérgica. En relación con los hallazgos clínicos, en este trabajo se determinaron los niveles de expresión de citocinas determinantes en la aparición y perpetuidad de la respuesta alérgica, con este fin se estudiaron estas respuestas en las primeras 72 horas de reto *in vitro* con los alérgenos fúngicos a los que los pacientes resultaron sensibilizados *in vivo* (prueba cutánea positiva).

La variabilidad biológica que existe respecto a la respuesta de células MN de uno a otro individuo atópico, es un factor muy importante en la evaluación de la respuesta alérgica a aeroalérgenos; en nuestro caso particular a alérgenos fúngicos. Debemos tomar en cuenta que las células T CD4⁺ se han clasificado en dos subgrupos distintos: las células T_{H1} que producen IFN- γ , TNF- α , e IL-2, estas citocinas promueven el desarrollo de células T citotóxicas, macrófagos y estimulan la inmunidad celular, mientras que las células T_{H2} producen citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que inducen las respuestas inmunitarias humorales características de la atopía. (Hartel C y cols., 2005). Por lo tanto, evaluar la respuesta inmune en sobrenadantes de cultivo de células MN de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica, representa un modelo de estudio

interesante para comprender cómo las citocinas T_H2 pueden regular *in vitro* la respuesta alérgica a hongos y resulta de interés clínico a la hora de evaluar la terapia a seguir.

Sabariego Ruiz S y cols., (2004) y otros autores han observado que las respuestas alérgicas de hipersensibilidad de tipo 1 a alergenos fúngicos son más severas contra epítopes de *Alternaria alternata* que además de producir rinitis alérgica, se han asociado con episodios severos de asma (Jalonen M y cols., 1997; Sánchez H y Bush RK., 2001). En nuestro estudio, el paciente 2 resultó con prueba cutánea positiva a *Alternaria alternata* (+++), por lo cual obtuvimos y separamos sus células MN para activarlas con extracto de *Alternaria alternata* 1:20 p/v y poder valorar la respuesta inmune *in vitro* a este hongo, mediante la cuantificación de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) por ELISA. Observamos en los sobrenadantes de cultivo celular de 48h, que los niveles de IL-4 expresados ante este hongo fueron de 107 pg/mL, y que a excepción de los niveles de IL-4 expresados ante *Candida albicans* (paciente 1) con 166 pg/mL en sobrenadantes de cultivo celular de 72h, fueron las concentraciones más altas de IL-4 detectadas en nuestra valoración de la respuesta alérgica a hongos. Los niveles de expresión de IL-5 expresados ante *Alternaria alternata* en cultivo celular de 72h fueron de 19.75 pg/mL, siendo los más altos del estudio, estos datos experimentales nos muestran la potencia alérgica de *Alternaria alternata* sobre otros hongos alergénicos.

Por otra parte, los estudios realizados por Wecksler M. y cols., (1968), demuestran que Concanavalina A (Con A) es un importante mitógeno para linfocitos al igual que la PHA. La Con A induce la proliferación de los linfocitos T al fijarse a determinado receptor celular que contiene un manopiranosido (Ganem Báez FA y Martín González O., 2000). Debido a la respuesta mitogénica inducida por Con A, decidimos utilizarla en nuestro trabajo experimental, siendo parte de nuestro C+ (20 µL de Con A + 100 µL de suspensión celular 2×10^5 + 80 µL de medio RPMI 1640 + SFBI 10%). La adición de Con A a nuestros

medios de cultivo de células MN, nos permitió observar el comportamiento de expresión de ciertas citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) ante este mitógeno policlonal, con el fin de comparar la expresión de esas mismas citocinas con los inducidos para hongos alergénicos (estimulación alérgica específica) y aquellos que producirían espontáneamente C- (100 μ L de suspensión celular 2×10^5 + 100 μ L de medio RPMI 1640 + SFBI 10%). Los datos obtenidos de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 tanto del C+ como el C-, nos permitieron tener parámetros de referencia para nuestro ensayo experimental en medios de cultivo de células mononucleadas activadas con alérgenos fúngicos, y así poder valorar el comportamiento de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmune a hongos. Se llevaron a cabo pruebas t de student para establecer si existe diferencia en los niveles medios de expresión de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en sobrenadantes de cultivo de células MN estimuladas con alérgenos fúngicos respecto a los niveles de citocinas encontradas cuando las mismas células se enfrentaban a un mitógeno policlonal a cuando estas producían espontáneamente las citocinas *in vitro*. Se observó que los niveles medios de las concentraciones de IL-4 e IL-5 expresadas en sobrenadantes de cultivo de células MN son diferentes en C+ (Con A) con respecto a C-, sin embargo, la media de las concentraciones de IL-13 expresadas en sobrenadantes de cultivo de células MN son semejantes en C+ (Con A) con respecto a C-.

Una vez realizado el estudio estadístico sobre el comportamiento de expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en C+ y C-, procedimos a calcular el índice de estimulación, el cual nos permitió estimar la potencia de los extractos alergénicos para inducir citocinas importantes en la respuesta alérgica. Observamos que los niveles de expresión de IL-4 en *Candida albicans* tuvieron el máximo índice de estimulación en sobrenadantes de 72h respecto al C+ (19.5 veces), seguido de *Alternaria alternata* con un índice de estimulación con respecto al C+ en sobrenadantes de 48h (7.4 veces), estos datos

indican que la expresión de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de células MN activadas por alergenos fúngicos, son 19.5 y 7.4 veces mayor que la IL-4 expresada ante un mitógeno policlonal (concanavalina A: C+), lo cual nos permite considerar a estos hongos como alergénicos y que pueden estar directamente involucrados con la respuesta alérgica del huésped.

Respecto a IL-5: *Alternaria alternata* presentó un índice de estimulación de 3.2 en sobrenadantes de células MN estimulados con el alergeno fúngico por 72h respecto al C+, y un índice de estimulación de 7 con respecto al C-. *Alternaria alternata* es el hongo con más potencia alérgica (Sabariego Ruiz S y cols., 2004), ya que fue el único hongo en presentar índices de estimulación con respecto a la expresión de IL-5.

La IL-4 producida por linfocitos T CD4⁺, es la citocina T_H2 más importante en la modulación de la respuesta alérgica, puesto que su función fisiológica principal es la producción de IgE, esta interleucina estimula al linfocito B a dar un cambio morfofuncional a plasmocito, el cual sintetiza IgE específica contra el alergeno que indujo la sensibilización (Secrist H y cols., 1995; Palmer EM y Van Seventer GA., 1997; Robinson DS y cols., 2004). En nuestro estudio se comprueba que IL-4 es la principal citocina T_H2 liberada en la modulación de la respuesta alérgica a hongos. Los resultados del análisis de la varianza y distribución de Fisher nos permitieron comparar la expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13), liberadas durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos y constatar el hecho.

Por otra parte, se esperaba que en el presente trabajo, la expresión de IL-13 se comportara de manera semejante a la expresión de IL-4, durante la valoración de la respuesta inmune *in vitro* a hongos. Debido a que las células MN que separamos con el Ficoll-paque Plus (Linfocitos T y B, células NK y monocitos) presentan un grado de homología del 50% en sus receptores de membrana IL-4R α e IL-13R α y esta puede

inducirse en las primeras horas de la reacción alérgica. Durante la fase experimental, a pesar de esta homología la respuesta a las dos citocinas no es igual y esto pudiera estar relacionado en que la otra subunidad del receptor de IL-4 y de IL-13 en membrana celular pudiera jugar un papel importante en la señalización de respuestas a alérgenos de hongos (Lahita RG., 2000). Durante la cuantificación de estas citocinas por ELISA, observamos que las concentraciones fueron mucho más elevadas en IL-4 con respecto a la expresión de IL-13. Esto tiene una explicación, los monocitos presentan IL-4R en su membrana, sin embargo, los linfocitos T y B expresan IL-4R solo cuando están activados, en el caso de IL-13R solo se expresan en células B, esto parece indicar que la activación de células B y T ante alérgenos fúngicos estará modulada más por IL-4, que por IL-13 en las primeras 72 horas de la reacción alérgica y que el tiempo de respuesta y eventos como la maduración de afinidad de la citocina por los receptores debe ser abordado para estudios posteriores.

Durante la respuesta de hipersensibilidad de tipo 1 sabemos que la IL-4 desarrolla un papel muy importante en la producción de IgE específica contra el alérgeno durante la fase inicial o sensibilización (Kay AB., 2001; Chanez P y cols., 1999). La prueba exacta de Fisher nos permitió analizar la expresión de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) con respecto al C+ y C-, a través del tiempo (24h, 48h o 72h), durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos y observamos que la liberación de las citocinas T_H2 no sigue un mismo patrón de comportamiento, es decir que pueden ser liberadas a cualquier hora de la respuesta inmune a hongos alergénicos lo que está en relación con la heterogenicidad y complejidad de la respuesta inmune a hongos y con la variabilidad biológica de la respuesta del huésped, esto con respecto a los niveles de expresión de IL-4 e IL-13. Con respecto a los niveles de expresión de IL-5 en los sobrenadantes de cultivo de células MN estimuladas por alérgenos fúngicos, observamos una expresión muy baja de esta citocina durante la respuesta inmune a hongos, se esperaba un incremento de IL-5 en las primeras 48h, lo que explicaría su

importancia como citocina activadora potente de eosinófilos que actúan prolongando la respuesta alérgica durante la fase tardía (Dubuske LM., 2000; González Díaz SN y Arias Cruz A., 2002). Por otro lado, un hecho conocido que las respuestas a eosinófilos más potentes y la presencia de eosinófilos activados son típicos de la cronicidad y severidad de las enfermedades alérgicas respiratorias.

Por último, la respuesta inmune *in vivo* de las especies de hongos presentes en pacientes con rinitis alérgica, no siempre se relaciona positivamente con los hallazgos moleculares *in vitro*. Sin embargo, aún cuando la prueba cutánea sea un buen indicador de reacción de hipersensibilidad, la confirmación molecular de las especies causantes de sensibilización tiene un gran impacto en la instauración de una inmunoterapia adecuada.

11. CONCLUSIONES

La exposición prolongada a esporas, micelios, toxinas y metabolitos de hongos en el medio ambiente donde más tiempo permanece el paciente atópico, tiene resultados complejos con efectos inmunológicos, que parecen favorecer la sensibilización alérgica. Los pacientes con rinitis alérgica que participaron en nuestro estudio presentaron sensibilizaciones *in vivo* a los siguientes hongos: *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Curvularia lunata*, *Rhodotorula*, *Cunninganella* y *Penicillium notatum*.

Las respuestas alérgicas de hipersensibilidad de tipo 1 a alergenos fúngicos son más severas contra epitopes de *Alternaria alternata*, en los sobrenadantes de cultivo celular de 48h, los niveles de IL-4 expresados ante este hongo fueron de 107 pg/mL y los niveles de expresión de IL-5 en sobrenadantes de cultivo celular de 72h fueron de 19.75 pg/mL, siendo las concentraciones más altas de IL-4 e IL-5 detectadas en nuestra valoración de la respuesta alérgica a hongos, estos datos experimentales nos muestran la potencia alérgica de *Alternaria alternata* sobre otros hongos alergénicos.

El índice de estimulación es un parámetro importante que nos permite estimar la magnitud de la respuesta alérgica *in vitro* a hongos alergénicos.

En nuestro estudio se observó que la expresión de IL-4 es la principal citocina T_H2 liberada en la modulación de la respuesta alérgica a hongos, lo que resulta atractivo a la hora de diseñar el esquema de tratamiento.

En los ensayos realizados observamos que la liberación de las citocinas T_H2 no sigue un patrón de expresión regular a través del tiempo (24h, 48h o 72h), durante la respuesta inmune *in vitro* a hongos y por lo tanto, su liberación depende de múltiples factores que requieren ser abordados por otros estudios.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A. K., A. H. Lichtman y J. S. Pober. (2002). “Inmunología celular y molecular”. 4a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 460.
- Achatz G., H. Oberkofler, E. Lechenauer, B. Simon, A. Unger, D. Kandler, C. Ebner, H. Prillinger, D. Kraft and M. Breitenbach. (1995). “Molecular cloning of major and minor allergens of major *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*”. Mol Immunol. 32:213-227.
- Blanco J. L., M. E. García and V. P. Kurup. (1997). “Immunoreactivity of antigen extracts of *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources”. Rev Iberoam Micol. 14: 60-62.
- Busch R. K. and J. M. Portnoy. (2001). “The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases”. J. Allergy Clin Immunol. 107: 430-40.
- Bush R. K., H. Sánchez and D. Geisler. (1999). “Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2”. JACI. 104:665-671.
- Cardoso Alonso S. A. (2005). “Estudio comparativo de las enfermedades alérgicas respiratorias en adolescentes y niños de la ciudad de Morelia, Michoacán”. Tesis de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 85 p.
- Chanez P., A. M. Vignola, P. Vic, F. Guddo, G. Bonsignore and P. Godard. (1999). “Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects”. Am Respir Crit Care Med. 159:588-595.
- Chapman J. A., A. L. Terll, R. L. Jacobs, E. N. Charlesworth and E. J. Bardana. (2003). “Toxic mold: phantom risk vs. science”. Ann Allergy Asthma Immunol. 91:222-232.
- Condemi J. J. (2003). “Alergia e Inmunología: Programa de autoevaluación de conocimientos médicos MKSAP TOMO II”. 2da Edición. Editorial Intersistemas. 72-73.

- De Vogue M., A. J. Thaker, I. Curran, L. Zhang, G. Muradia, H. Rode and H. Vijay. (1996). "Isolation and exprerssion of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit". Int Arch Allergy Immunol. 111:385-395.
- Dreborg S., B. Agrell, T. Foucard, N. I. Kjellman, A. Koivikko and S. Nilsson. (1986). "A double-blind multicenter immunotherapy trial a children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarium* preparation". I. Clinical results Allergy. 41:131-40.
- Dubuske L. M. (2002). "Los antagonistas de los mediadores en el tratamiento de la enfermedad alérgica". Allergy and Asthma Proc. 16:5-16.
- Dubuske L. M. (2000). "El eslabón entre alergia y asma". Allergy and Asthma Proc. 14:1-6.
- Ferreira F. (2003). "Genetic engineering of fungal allergens". Alergol Immunol Clin. 18:116-117.
- Fireman P. (2000). "Conexión entre rinitis y asma: tratamiento de las enfermedades alérgicas de la vía respiratoria". Allergy and Asthma Proc. 14:43-53.
- Fischer T. J. (2005). "Alergia e Inmunología: Programa de autoevaluación de conocimientos médicos MKSAP". 3era Edición. 275-78.
- Ganem Báez F. A. y O. Martín González. (2000) "Lectina concanavalina A: obtención y purificación." Universo Diagnóstico. 1:1-41.
- García Tamayo F. (1997). "Fundamentos de inmunobiología; las citocinas, UNAM". 1era Edición, México. 347-393.
- García Caballero R. O. Nader y B. Morfin Maciel. (2001). "Correlación entre pruebas cutáneas positivas a hongos, IgE total, e IgE específica por ELISA y cultivos de hongos en el medio ambiente del paciente pediátrico alérgico". Revista Alergia México. 48:137-140.
- González Díaz S. N. y A. Arias Cruz. (2002). "Rinitis alérgica y asma: dos padecimientos ¿una misma enfermedad?" Revista Alergia México. 49:20-24.

- Harold S. N. (1996). "Administración adecuada de inmunoterapia específica en pacientes alérgicos". *Alergia e Inmunol Pediatr.* 5:160-165.
- Hartel C., N. Adam, P. Temming, M. Muller-Steinhardt and C. Schultz. (2005). "Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood". *Clinical and Experimental Immunology.* 142:446-453.
- Horst M., A. Hejjaoui, V. Horst, F. B. Michael and J. Bousquet. (1990). "Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract". *J. Allergy Clin Immunol.* 85:460-72.
- Huerta J. G. y M. Penagos. (2004). "Asma en niños". Editorial Intersistemas. México. 194.
- Ishizuka T. (2002). "Expresión del RNA mensajero de interleucina-5 en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con asma bronquial y eosinofilia". *Allergy and Asthma Proc.* 16: 8-12.
- Jalonen M., D. A. Stern, A. L. Wright, L. M. Taussing and F. D. Martínez. (1997). "*Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment". *Am J Respir Crit Care Med.* 155:1356-1361.
- Kay A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases". *N Eng J Med.* 344: 30-37.
- Lizaso M. T., B. E. García, B. Gómez, A. Zabalegui, M. J. Rodríguez and A. I. Tabar. (2003). "Treatment of allergy to mushrooms". *ANALES Suplemento 2, Vol. 26.*
- López Velázquez B., D. L. Bastida Segura, D. Escárcega Barbosa and M. I. Castrejón Vázquez. (2004). "Determinación de interleucinas e IgG4 en pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia". *Revista Alergia México.* 51:139-144.
- Martínez Ordaz R. V., C. B. Rincón-Castañeda, G. Esquivel López, J. G. Lazo-Sáenz, M. T. Llorenz Meraz y V. M. Velasco Rodríguez. (2002). "Fungoesporas en el hábitat del paciente asmático en una zona semidesértica en México". *Revista Alergia México.* 49: 2-7.

- McCann W. A., M. Cromie, F. Chandler, J. Ford and W. K. Dolen. (2002). "Sensitization to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in allergic fungal sinusitis". Ann Allergy Asthma Immunol. 89: 203-208.

- Montero Mora P., A. González Espinosa, G. A. Guidos Foguelbach, O. A. Tinajero Castañeda y S. Serrano Cuevas. (2003). "La remodelación en el asma: revisión de la literatura". Revista Alergia México. 50: 22-24.

- Nelson H. (1981). "Effects of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts". J. Allergy Clin Immunol. 67:64-9.

- O' Donnell D. R., and P. J. Openshaw. (1998). "Anaphylactic sensitization to aeroantigen during respiratory virus infection". Clin Exp. Allergy. 28:1501-1508.

- Palmer E. M., and G. A. Van Seventer. (1997). "Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell dependent costimulatory signals". J Immunol. 158:2654-2662.

- Pawankar R. (2003). "Exploring the role of leukotriene receptor antagonists in the management of allergic rhinitis and co-morbid asthma". Clin Exp Allergy Rev. 3:74-79.

- Pedraza Escalona M. M., y A. Rodríguez Romero. (2004). "Bases inmunológicas y moleculares de la alergenidad". Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas. 13:5-10.

- Pérez Sánchez A. G. (2004). "Prevalencia y sintomatología clínica relacionada de asma y rinitis alérgica en adolescentes de la ciudad de Morelia, Michoacán". Tesis de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 80 p.

- Pontón J., M. D. Moragues, J. Gené, J. Guarro y G. Quindós. (2002). "Hongos y actinomicetos alergénicos". Revista Iberoamericana de Micología.

- Quindós G. (2002). "Las micosis en el amanecer del Siglo XXI". Rev Iberoam Micol 19:1-4.

- Robinson D. S., M. Larché and S. R. Durham. (2004). "Tregs and allergic disease". The Journal of Clinical Investigation November. 114:1389-1397.

- Rodríguez Mosquera M. (2000). “Rinitis alérgica”. *Inf Ter Sist Nac Salud*. 24:1-8.
- Rojas Ramos E., N. Martínez Jiménez y A Reyes Salinas. (2003). “Teoría Th2 en alergia: actualidades y futuras direcciones”. *Revista Alergia México*. 50:64-70.
- Rosenbaum M., R. Esch and R Schwartzman. (1996). “Effects of mold proteases on the biological activity of allergenic pollen extracts”. *Am J Vet Res*. 57:1447-52.
- Sabariego Ruiz S., C. Díaz de la Guardia y F. Alba Sánchez. (2004). “Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería”. *Rev Iberoam Micol*. 21:121-127.
- Salvaggio J. E., H. A. Burge and J. A. Chapman. (1993). “Emerging concepts in mold allergy: what is the role of the immunotherapy?” *J. Allergy Clin Immunol*. 92:217-22.
- Sánchez Sánchez B. R., M. Gallardo Rodríguez, J. A. Navarro Chavarria y M. L. Cabrera Muñoz. (1999). “Sinusitis alérgica micótica: conceptos actuales”. *Revista Alergia México*. 46:145-150.
- Sanchez H. and R. K. Bush. (2001). “A review of *Alternaria alternata* sensitivity”. *Rev Iberoam Micol*. 18:56-59.
- Secrist H., R. H. Dekruyff and D. T. Umetsu. (1995). “Interleukin 4 production by CD4⁺ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type”. *J Exp Med*. 181:1081-1089.
- Stites P. D., A. I. Terr and T. G. Parslow. (2000). “Inmunología básica y clínica”. 9^a ed. México: Manual Moderno. 969-72.
- Stevens D. A., R. B. Moss, V. P. Kurup, A. P. Knutsen, P. Greenberger, M. A. Judson, D. W. Denhing, R. Cramer, A. S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish and G Mastella. (2003). “Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis-state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference”. *Clin Infect Disease*. 37:225-264.
- Tomás Bartra J. (2003). “Mesa redonda: Estado actual de la alergia a hongos”. *Alergol Inmunol Clin*. 18:106-121.

- Wecksler M., A. Levy and W. Jaffe. (1968). “Acción mitogénica de extractos de *Canavalia ensiformis* y Concanavalina A”. *Acta Cien Venez.* 19:154-156.
- Zendejas Cervantes L. H., A. Martínez Pérez, M. I. Castrejón Vázquez and A. J. Miranda Feria. (2003). “Evaluación de la calidad de vida del paciente con rinitis alérgica”. *Revista Alergia México.* 50:91-95.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: Valoración de la respuesta inmune *in vitro* de hongos alergénicos asociados a rinitis alérgica.

Investigador Titular: D en C. Alain R. Rodríguez Orozco. Especialista en Inmunología y Alergia.

Investigador Asociado: QFB Héctor Ruiz Reyes. Estudiante de la Maestría en Farmacología Básica.

Antecedentes:

El objetivo de la valoración de la respuesta inmune de extractos de hongos alergénicos en células mononucleadas de pacientes atópicos con diagnóstico de rinitis alérgica, permitirá comparar el comportamiento de expresión de citocinas T_H2.

Procedimiento: Si consiento participar sucederá lo siguiente:

1. Se realizarán pruebas de hipersensibilidad cutánea a extractos de hongos por el método Prick-test.
2. Se extraerá sangre periférica (5-10 mL), con el fin de obtener y aislar células mononucleadas.

Confidencialidad:

Toda la información será confidencial y será usada solo para efectos de la investigación. Mi identidad será mantenida en la medida que la ley lo permita.

Derecho a rehusar o abandonar el estudio.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar mi atención médica futura.

Consentimiento.

Consiento participar en el estudio, he tenido la oportunidad de leerlo.

Valoración de la respuesta inmune *in vitro* de hongos alergénicos asociados a rinitis alérgica

Nombre del paciente _____ Afiliación _____

Firma del paciente _____

Fecha: _____ Firma del médico _____

Testigo: _____

Testigo: _____