



Expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a alérgenos fúngicos en individuos sensibilizados

Héctor Ruiz Reyes,* Alain R Rodríguez Orozco,* Salvador Sánchez Nafarrate*

RESUMEN

Antecedentes: la determinación de citocinas T_H2 ha sido un gran apoyo para la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos alérgicos.

Objetivo: valorar el comportamiento de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a alérgenos fúngicos.

Material y métodos: se obtuvieron células mononucleadas (*Ficoll-paque* $d = 1.077$) de cuatro sujetos con rinitis alérgica y prueba cutánea positiva a hongos, éstas fueron activadas con extractos fúngicos a los que cada sujeto resultó positivo en la prueba cutánea y posteriormente se determinaron por ELISA IL-4, IL-5 e IL-13 a las 24, 48 y 72 horas.

Resultados: los niveles de expresión de IL-4 en sobrenadantes de cultivo celular fueron más elevados respecto a IL-5 e IL-13 ($p < 0.05$). La liberación de interleucinas fue distinta en magnitud respecto al tiempo y a la especie fúngica a la que el individuo resultó sensible.

Conclusiones: IL-4, pero no IL-5 ni IL-13 mantuvieron su expresión durante el reto con alérgenos fúngicos *in vitro* en las primeras 72 horas. IL-4 debe estudiarse como biomarcador para estimar la alergenidad a hongos en sujetos sensibilizados.

Palabras clave: interleucina 4, interleucina 5, interleucina 13, alérgenos fúngicos, respuesta inmunitaria, rinitis alérgica.

ABSTRACT

Background: Determination of T_H2 cytokines profile have arisen interest to understand the pathophysiology of allergic diseases.

Objective: To analyze the expression of IL-4, IL-5 e IL-13 during the immune response to allergic fungi in sensitized patients with allergic rhinitis.

Material and method: Mononuclear cells (*Ficoll-paque* $d = 1.077$) were isolated from four patients with allergic rhinitis and positive skin prick test to allergic fungi and subsequently activated with fungal allergic extracts. The supernatants were collected and the levels of IL-4, IL-5 and IL-13 were determined by enzyme-linked immune assay.

Results: The levels of IL-4 in supernatants were higher than IL-5 levels and IL-13 levels ($p < 0.05$) during the first 72 hours of challenge with fungal allergens *in vitro*. The expression of above mentioned cytokines was different attending time course response and fungal species in sensitized patients.

Conclusions: IL-4, but not IL-5 and IL-13 either, showed a sustained expression during 72 hours after the challenge to allergic fungi *in vitro*. IL-4 could be studied as biomarker to estimate the allergenicity to fungi in sensitized patients.

Key words: interleukin 4, interleukin 5, interleukin 13, fungal allergens, immune response, allergic rhinitis.

Uno de los eventos más importantes durante la respuesta inflamatoria alérgica a aeroalérgenos es la inmunomodulación mediada por citocinas. Las células T_H2 producen citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que inducen las respuestas inmunitarias humores características de la atopía.^{1,2} En la actualidad la hipersensibilidad inmediata

a hongos plantea serios retos en el diagnóstico y aún más en el tratamiento específico mediante inmunoterapia, debido, entre otros factores, a que los extractos comerciales disponibles hasta el momento no son muy eficaces, tienen con frecuencia una baja actividad alérgica, existe una gran variabilidad antigénica en las cepas fúngicas de donde se obtienen los extractos, además de la falta

* División de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Morelia, Michoacán, México.

Correspondencia: Dr. Alain R Rodríguez Orozco. División de Posgrado, Facultad de Medicina Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Rafael Carrillo esquina Salvador González Herrejón s/n, Bosque Cuauhtémoc, Colonia Centro, CP 58000. PO Box 136, Morelia, Michoacán, México.

Correo electrónico: arorozco@hotmail.com
Recibido: marzo, 2008. Aceptado: mayo, 2008.

Este artículo debe citarse como: Ruiz RH, Rodríguez OAR, Sánchez NS. Expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a alérgenos fúngicos en individuos sensibilizados. Rev Alerg Mex 2008;55(5):181-8.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicas.com.mx

de conocimiento de las reactividades cruzadas entre las diferentes especies fúngicas.^{3,4} La variabilidad de la respuesta inmunitaria a hongos alergénicos se ha estudiado poco en nuestro medio y actualmente no se dispone de biomarcadores clínicos para evaluar esta alergenicidad. El establecimiento de estos biomarcadores pudiera resultar atractivo para decidir dar inmunoterapia contra hongos en individuos con rinitis alérgica y rinosinusitis alérgica, resistentes al tratamiento y con prueba cutánea positiva a hongos alergénicos.

Este trabajo estuvo encaminado a la caracterización de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 como marcadores inflamatorios asociados con la evolución de la reacción alérgica a hongos alergénicos en individuos sensibilizados que padecen rinitis alérgica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron cuatro pacientes (27.5 ± 3.05 años) con diagnóstico de rinitis alérgica y prueba cutánea positiva a hongos alergénicos, que asistieron a consulta de alergología del Hospital Vasco de Quiroga de Morelia, Michoacán. Ninguno de los pacientes elegidos había recibido inmunoterapia ni tratamiento farmacológico.

Pruebas de hipersensibilidad cutánea a hongos (método *Prick-test*)

Para la realización de las pruebas cutáneas se utilizaron 18 extractos fúngicos en concentración de 1:20 p/v (Allerstand, México DF): *Monilia* sp, *Helminthosporium sativum*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Ulocladium* sp, *Epicozum 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 alérgenos fúngicos se utilizaron lancetas Duotip-Test estériles (Lincoln Diagnostic, Inc. Decatur, Illinois 62525 EUA), y se aplicó la técnica por rotación a 360° para la penetración del alérgeno a la piel de la cara flexora del antebrazo. Se usaron como controles positivo y negativo, fosfato de histamina y solución amortiguadora de fosfatos respectivamente. Las reacciones positivas se interpretaron como: + (la roncha puede o no manifestarse, si aparece, 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), ++ (roncha de 5 a 6 mm, y el área del eritema usualmente abarca 10 mm), +++ (roncha de 7 a 9 mm, y el área del eritema abarca cerca de 20 mm), ++++ (cualquier reacción con una roncha de 10 mm o pseudópodos pronunciada aun cuando el área del eritema puede o no ser tan grande como la reacción +++). Se interpretaron como positivas las pruebas que originaban una pápula de 3 mm o más respecto al control negativo de la prueba cutánea.

Obtención de células mononucleadas (método *Ficoll-paque d = 1.077*)

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica de cada uno de los pacientes atópicos con prueba cutánea positiva a hongos y se depositaron en tubos de vidrio estéril con anticoagulante EDTA. La separación de células mononucleadas (CMN) se realizó por el método de selección Ficoll-paque plus (Amersham Biosciences, USA), con gradiente de densidad 1.077.⁵ Se determinó la viabilidad de CMN por exclusión con azul de tripano al 4% y lectura en hemocitómetro, se aceptó la viabilidad celular igual a 95% como adecuada para la realización de los ensayos. La suspensión celular se ajustó a una concentración final de 1×10^6 células/mL con medio RPMI 1640 completo + suero fetal de bovino inactivado al 10% (SFBI 10%, Gibco, Grand Island NY, EUA).

Obtención de sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas con extractos fúngicos

Las células mononucleadas (CMN) de cada paciente se sembraron en cajas estériles de 96 pozos de fondo plano (Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, EUA), a 2×10^5 células/100 mL por pozo en medio RPMI-1640 completo + SFBI 10%. Las células se trataron con los extractos fúngicos a los que el sujeto atópico resultó positivo en la prueba cutánea, a una concentración de 1:20 p/v, que fue seleccionada en ensayos clínicos previos. El control negativo consistió en CMN no tratadas con extracto fúngico suspendidas en medio RPMI 1640 + SFBI 10%, y el control de estimulación con mitógeno policlonal consistió en CMN suspendidas en medio RPMI 1640 + SFBI 10% a las que se le añadió concanavalina A (con A) (5 mg/mL). Las placas de cultivo celular se incubaron

a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5% (CO₂ Incubator, SHEL LAB, EUA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de IL-4, IL-5 e IL-13 en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por extractos fúngicos

Los sobrenadantes de cultivo celular se recolectaron a las 24, 48 y 72 horas en tubos eppendorf de 1 mL. Se utilizaron kits de ELISA (Human Biotrak, ELISA system, Amersham Biosciences, EUA) para la determinación de IL-4, IL-5 e IL-13 y la lectura de estas citocinas se realizó en el microprocesador ELISA PLUS, Control Lab, EUA.

Análisis estadístico

Para estimar la magnitud de la respuesta alérgica *in vitro* a hongos, se determinó el índice de estimulación de la muestra (expresada en veces X); 1) con respecto al control con mitógeno policlonal (CMP) concanavalina A, y 2) con respecto a control negativo (C-) células no tratadas.

Se utilizó el análisis de la variancia y distribución de Fisher para comparar los niveles de expresión entre IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a

hongos alérgicos, y para interpretar la expresión de las citocinas a las 24, 48 y 72 horas.

RESULTADOS

Las principales reacciones de hipersensibilidad cutánea positivas ante la exposición a alérgenos fúngicos en los pacientes alérgicos con diagnóstico de rinitis alérgica se observan en el cuadro 1.

Cuadro 1. 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>Cunninghamella</i>	+++
	<i>Penicillium notatum</i>	+++

El paciente 1 con prueba cutánea positiva a *Candida albicans* (++) mostró un pico máximo de expresión de IL-4 a las 72 horas, ésta fue 19.5 veces mayor a la estimulación respecto a células tratadas con un mitógeno policlonal (CMP) y 13.2 veces superior la estimulación respecto a control negativo (C-).

El paciente 2 tuvo con prueba cutánea positiva a *Alternaria alternata* (+++) y *Mucor racemosus* (+++); para *Alternaria alternata* tuvo un pico máximo de expresión de IL-4 a las 48 horas que fue 7.4 veces superior a la estimulación respecto a CMP y 3.5 veces mayor la estimulación respecto a C-; para IL-5 el pico máximo de expresión fue a las 72 horas y éste fue 3.2 veces superior a la estimulación respecto al CMP y 7 veces mayor a la estimulación respecto al C- a las 48 horas. Con respecto a *Mucor racemosus*, el pico máximo de expresión de IL-4 fue a las 48 horas y fue 1.8 veces superior a la estimulación respecto a CMP.

El paciente 3, con prueba cutánea positiva a *Rhodotorula* (+++++) y *Rhizopus stolonifer* (++++), para *Rhodotorula* tuvo un pico máximo de expresión de IL-4 a las 24 horas, que fue 2.6 veces mayor la estimulación sobre C- e IL-13, mostró un pico máximo de expresión

Índice de estimulación sobre mitógeno policlonal	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-4 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-4 del CMP}}$
Índice de estimulación sobre mitógeno policlonal	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-5 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-5 del CMP}}$
Índice de estimulación sobre mitógeno policlonal	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-13 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-13 del CMP}}$
Índice de estimulación sobre control negativo	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-4 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-4 del control negativo}}$
Índice de estimulación sobre control negativo	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-5 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-5 del control negativo}}$
Índice de estimulación sobre control negativo	=	$\frac{\bar{x} \text{ Concentración de IL-13 de la muestra}}{\bar{x} \text{ Concentración de IL-13 del control negativo}}$

a las 48 horas, 1.1 veces superior a la estimulación sobre CMP. Respecto a *Rhizopus stolonifer*, el paciente mostró un pico máximo de expresión de IL-4 a las 72 horas que fue tres veces mayor la estimulación respecto a CMP y 11.3 veces superior a la estimulación respecto a C-.

El paciente 4, con prueba cutánea positiva a *Penicillium notatum* (+++), *Cunninghamella* (+++) y *Curvularia lunata* (++), tuvo para *Penicillium notatum* un pico máximo de expresión de IL-4 a las 48 horas que mostró ser 2.7 veces superior a la estimulación respecto a CMP y 1.6 veces mayor la estimulación sobre C-. Para *Cunninghamella* el pico máximo de expresión de IL-13 fue a las 48 horas, 1.1 veces superior a la estimulación respecto a CMP y C-. Por último, *Curvularia lunata*

para IL-13 mostró el pico máximo de expresión a las 48 horas, 1.1 veces superior a la estimulación respecto a CMP y C-. La expresión de citocinas en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por alérgenos fúngicos mostró que los índices de estimulación de IL-4 respecto al CMP y C- estuvieron más elevados que los índices de estimulación de IL-13 e IL-5 respecto al CMP y C- (cuadro 2). Durante la valoración de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en sobrenadantes de 24, 48 y 72 horas, se observó que las citocinas no siguen un mismo patrón regular de expresión en las primeras 72 horas de respuesta a alérgenos fúngicos en individuos sensibilizados (cuadro 3). En las figuras 1, 2 y 3 se observa la expresión de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) en cultivos de células mononucleadas, durante

Cuadro 2. Variabilidad en la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 inducida durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a extractos de hongos alérgicos evaluados

Análisis de variancia	Distribución de Fisher		p	
	F calculada	F crítica		
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m / CPM)}{\sigma_{TOT} (IL-5_m / CPM)}$	4.76	>	3.79	0.05
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-4_m / CPM)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m / CPM)}$	14.9	>	8.89	0.005
$\frac{\sigma_{TOT} (IL-5_m / CPM)}{\sigma_{TOT} (IL-13_m / CPM)}$	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

$\sigma_{TOT} IL-4_m$, $IL-5_m$ o $IL-13_m$ = variancia total de las interleucinas expresadas en las muestras.

$\sigma_{TOT} IL-4_{CMP}$, $IL-5_{CMP}$ o $IL-13_{CMP}$ = variancia total de las interleucinas expresadas con el control mitógeno policlonal (concanavalina A).

$\sigma_{TOT} IL-4_{C-}$, $IL-5_{C-}$ o $IL-13_{C-}$ = variancia total de las interleucinas expresadas con CMN no ratadas [control negativo = C-].

Cuadro 3. Expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en sobrenadantes de cultivo activados por alérgenos fúngicos respecto al mitógeno policlonal (CMP) y el control negativo (C-)

	Distribución de <i>F</i>		<i>p</i>
	<i>t</i> calculada	<i>t</i> crítica	
M/CMP			
IL-4	0.98	< 3.49	0.05
IL-5	1.20	< 3.49	0.05
IL-13	1.68	< 3.49	0.05
m/C-			
IL-4	1.45	< 3.49	0.05
IL-5	2.14	< 3.49	0.05
IL-13	1.58	< 3.49	0.05

m/CMP: muestra/células tratadas con mitógeno policlonal; m/C-: muestra/células no tratadas.

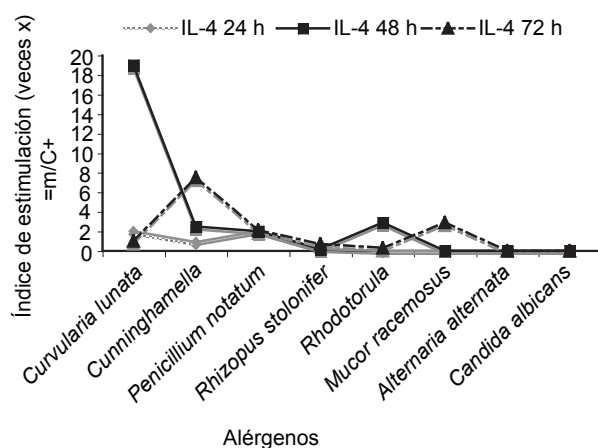


Figura 1. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-4 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-4 expresada por células mononucleadas estimuladas con un mitógeno policlonal (concanavalina A: 5 mg/mL) [C+]. El experimento es representativo de una serie de tres.

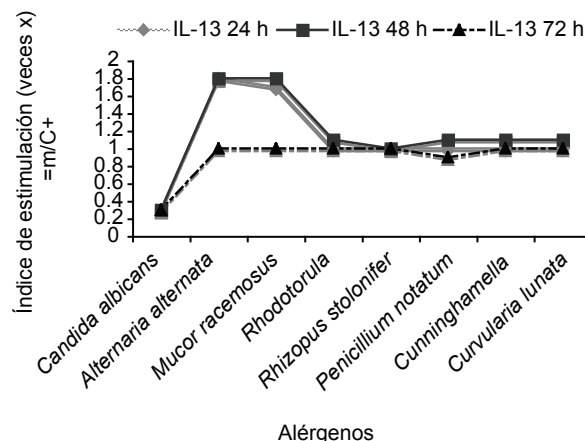


Figura 3. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-13 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-13 expresada por células mononucleadas estimuladas con un mitógeno policlonal (concanavalina A: 5 mg/mL) [C+]. El experimento es representativo de una serie de tres.

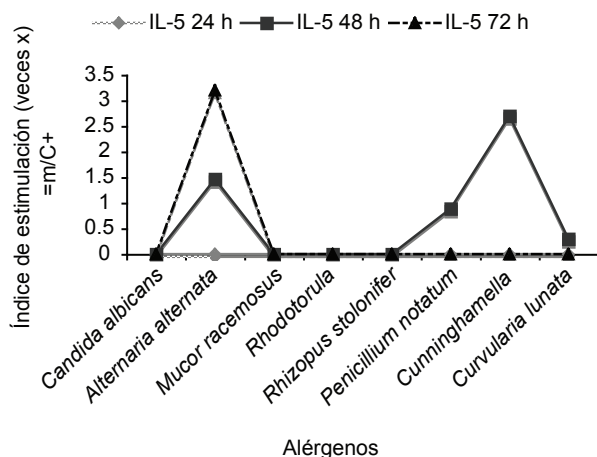


Figura 2. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-5 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-5 expresada por células mononucleadas estimuladas con un mitógeno policlonal (concanavalina A: 5 mg/mL) [C+]. El experimento es representativo de una serie de tres.

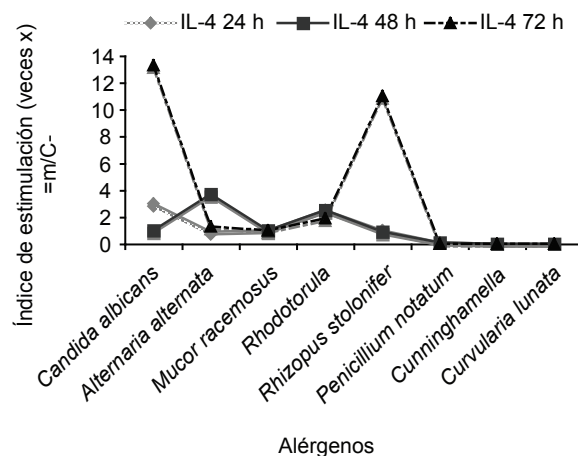


Figura 4. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-4 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-4 inducida espontáneamente por células mononucleadas (C-). El experimento es representativo de una serie de tres.

las primeras 72 horas de reto con los extractos fúngicos respecto a la síntesis inducida por el mitógeno policlo-

nal (concanavalina A); mientras que las figuras 4, 5 y 6 muestran la expresión de estas citocinas en células

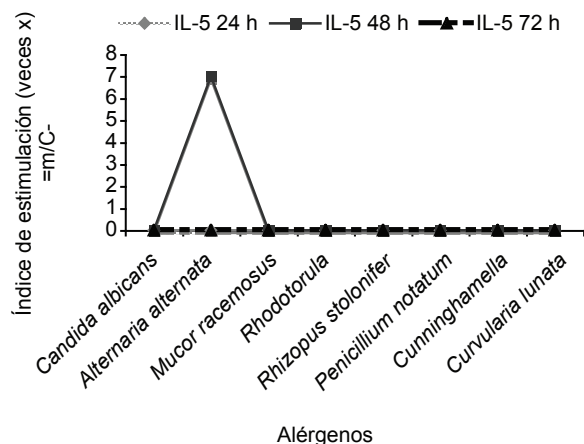


Figura 5. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-5 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-5 inducida espontáneamente por células mononucleadas (C-). El experimento es representativo de una serie de tres.

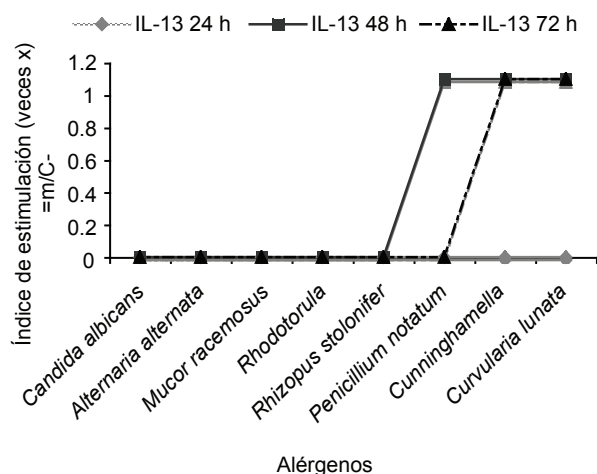


Figura 6. Los puntos muestran los índices de estimulación de la síntesis de IL-13 por células mononucleadas estimuladas con extractos fúngicos (m) a los que los individuos resultaron sensibles, respecto a la producción de IL-13 inducida espontáneamente por células mononucleadas (C-). El experimento es representativo de una serie de tres.

tratadas con extractos fúngicos con respecto a la síntesis inducida espontáneamente por células mononucleadas (control negativo).

DISCUSIÓN

Durante las pruebas cutáneas con hongos se encontraron respuestas de hipersensibilidad positivas a: *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Curvularia lunata*, *Rhodotorula*, *Cunninghamella* y *Penicillium notatum*. Otros estudios mexicanos han reportado similares respuestas positivas de hipersensibilidad a hongos.^{6,7}

La determinación de mediadores solubles que intervienen en la modulación de la respuesta inmunitaria, como las citocinas expresadas en procesos inflamatorios durante situaciones de enfermedad, ha tenido un papel importante en la comprensión de diversos procesos fisiopatológicos alérgicos. En el 2002 Repta,⁸ con el fin de comparar el grado de inflamación entre pacientes con sinusitis aguda, síndrome de astenia crónica y rinitis alérgica, determinó las concentraciones de diversas citocinas (IL-8, TNF α y NGF) en el líquido de lavados nasales. Por otra parte, López y col.,⁹ en 2004, observaron el comportamiento de las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 e IFN γ en el suero de pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia. Estos estudios clínicos permitieron evaluar el impacto de la determinación de citocinas implicadas en la magnitud de la respuesta alérgica de pacientes con alergias respiratorias como marcadores de evolución clínica de la enfermedad. En el presente trabajo se determinaron los niveles de expresión de citocinas determinantes en la aparición y perpetuidad de la respuesta alérgica en cultivos de células mononucleadas obtenidas de cada uno de los pacientes alérgicos, y que fueron enfrentados a extractos alérgicos de hongos a los que dichos pacientes resultaron sensibilizados *in vivo* (prueba cutánea positiva).

Observamos que los mayores niveles de expresión de IL-4 se obtuvieron en *Candida albicans* a las 72 horas de cultivo de células mononucleadas (CMN) respecto al mitógeno policlonal (CMP) (19.5 veces), seguido de *Alternaria alternata* con un índice de estimulación con respecto al CMP que mostró una estimulación máxima (7.4 veces); estos datos indican que la expresión de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de CMN activadas por alérgenos fúngicos fue 19.5 y 7.4 veces mayor que la IL-4 inducida por un mitógeno policlonal (concanavalina A), lo cual permite considerar a estos hongos muy

alergénicos, directamente implicados con la respuesta alérgica del huésped.

Respecto a IL-5, *Alternaria alternata* mostró un índice de estimulación máxima de 3.2 veces sobre CMP a las 72 horas de cultivo, y un índice de estimulación siete veces superior con respecto al control negativo en igual periodo. Sabariego y col., en 2004, observaron que las respuestas alérgicas de hipersensibilidad de tipo 1 a alérgenos fúngicos son más severas contra epítopes de *Alternaria alternata* que, además de producir rinitis alérgica, se han asociado con episodios severos de asma.^{10,11,12} En nuestro estudio *Alternaria alternata* fue el único hongo capaz de inducir una fuerte respuesta de expresión de IL-5, citocina implicada en la respuesta inflamatoria tardía.

Por otra parte, se esperaba que la expresión de IL-13 se comportara de manera semejante a la de IL-4, durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a hongos, debido a que las células mononucleadas muestran un grado de homología del 50% en sus receptores de membrana IL-4R α e IL-13R α de alta afinidad y que las cadenas de ambos receptores pueden inducirse en las primeras horas de la reacción alérgica. A pesar de esta homología la respuesta inducida de ambas citocinas no fue similar, esto pudiera estar relacionado con el hecho de que las otras subunidades del receptor estén mayormente implicadas en la señalización de respuestas a alérgenos de hongos. Durante la cuantificación de estas citocinas por ELISA, las concentraciones de IL-4 fueron mucho más elevadas con respecto a la IL-13. Los monocitos muestran IL-4R en su membrana; sin embargo, los linfocitos T y B expresan IL-4R sólo cuando están activados; en el caso de IL-13R sólo se expresan en células B, esto parece indicar que la activación de células B y T ante alérgenos fúngicos estará modulada más por la expresión de 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 pudieran ser importantes para estimar la magnitud de la respuesta alérgica y deben ser estudiados en ensayos posteriores.

La IL-4 producida por linfocitos T fue la citocina T_H2 más importante en la modulación de la respuesta alérgica a hongos y se ha relacionado directamente con la producción de IgE específica contra el alérgeno

que indujo la sensibilización.^{13,14} Podemos admitir que IL-4 fue un marcador más estable que IL-5 e IL-13 durante la respuesta alérgica a hongos en los pacientes evaluados.

La prueba exacta de Fisher permitió analizar la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 con respecto al control con mitógeno policlonal y control negativo, a través del tiempo (24, 48 o 72 horas), durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a hongos, y se observó que la liberación de las citocinas no sigue un patrón regular de comportamiento, es decir, que pueden ser liberadas en diferentes tiempos una vez que el paciente se ha enfrentado al hongo al que resulta alérgico; estos hallazgos están en relación con la heterogenicidad y complejidad de la respuesta inmunitaria a hongos y con la variabilidad biológica de la respuesta del huésped.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio las principales contribuciones son: se comprobó la potencia alérgica de *Alternaria alternata* sobre otras especies de hongos, al inducir altos niveles de expresión de IL-4 e IL-5 en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas retadas con alérgenos fúngicos. El índice de estimulación de la producción de citocinas T_H2, particularmente IL-4, puede ser útil para estimar la magnitud de la respuesta alérgica a extractos fúngicos *in vitro*. En los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por extractos fúngicos observamos que IL-4 es la citocina T_H2 que se expresa más regularmente en la modulación de la respuesta alérgica a hongos. La liberación de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no sigue un patrón de expresión regular a través del tiempo durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a hongos alergénicos.

Si tomamos estos cuatro casos estudiados como una pequeña serie aceptamos como limitantes y como recomendaciones para estudios posteriores que es necesario el uso de alérgenos recombinantes (estandarizados) tanto para las pruebas por escarificación como para los estudios de estimulación *in vitro*, y que también deben analizarse las reactividades cruzadas entre los alérgenos fúngicos que desencadenan los resultados reportados. Esto ofrecería la oportunidad de estudiar el papel de

nuevas moléculas importantes en la fisiopatología de la rinitis alérgica relacionada con hongos alergénicos, aun cuando en posteriores trabajos nos hemos propuesto descartar causas de liberación inespecífica de estas citocinas, situación que no descartamos en este estudio preliminar. Estos pacientes demostraron sensibilización a los mismos hongos alergénicos *in vivo* e *in vitro*. En los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por extractos fúngicos, IL-4 fue un biomarcador que se expresó con consistencia durante el reto con alérgenos fúngicos en individuos sensibilizados, no así IL-5 ni IL-13. Elevar el número de casos evaluados y plantear un estudio mayor en donde analicemos en forma más estricta la regulación de la expresión de IL-4 como biomarcador de alergenidad es una estrategia recomendable para trabajos de investigación futuros en esta área.

Agradecimientos

Al jefe del departamento de posgrado de la Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas, Dr. Ignacio Chávez de la UMSNH, Maestro en Ciencias Médicas Víctor Manuel Farías Rodríguez por todo el apoyo recibido durante esta investigación; a la Doctora en Ciencias Anel Gómez Tapia, por permitirnos utilizar el laboratorio de investigaciones de la clínica 80 del IMSS, Unidad de Epidemiología, Morelia, Michoacán, para la realización de las pruebas de ELISA.

REFERENCIAS

- Hartel C, Adam N, Temming P, Muller-Steinhardt M, et al. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol* 2005;142:446-53.
- Rojas Ramos E, Martínez Jiménez N, Reyes Salinas A. Teoría Th2 en alergia: actualidades y futuras direcciones. *Rev Alerg Mex* 2003;50:64-70.
- Harold SN. Administración adecuada de inmunoterapia específica en pacientes alérgicos. *Alerg Inmunol Pediatr* 1996;5:160-5.
- Ruiz Reyes H, Rodríguez Orozco AR. Alérgenos fúngicos: importancia de la estandarización de alérgenos fúngicos y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Alerg Mex* 2006;53:144-9.
- Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods* 1980;36:109-11.
- García Caballero RO, Nader, Morfin Maciel B. 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. *Rev Alerg Mex* 2001;48:137-40.
- Martínez Ordaz RV, Rincón-Castañeda CB, Esquivel López G, Lazo-Sáenz JG y col. Fungosporas en el hábitat del paciente asmático en una zona semidesértica en México. *Rev Alerg Mex* 2002;49:2-7.
- Repta Ramírez S. Citocinas en el líquido del lavado nasal en la sinusitis aguda, rinitis alérgica y sujetos con síndrome de astenia crónica. *Allergy Asthma Proc* 2002;16:17-22.
- López Velázquez B, Bastida Segura DL, Escárcega Barbosa D, Castrejón Vázquez MI. Determinación de interleucinas e IgG4 en pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia. *Rev Alerg Mex* 2004;51:139-44.
- Sabariego Ruiz S, Díaz de la Guardia C, Alba Sánchez F. Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería. *Rev Iberoam Micol* 2004;21:121-7.
- Jalonen M, Stern DA, Wright A, Taussing LLM, et al. *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1356-61.
- Sánchez H, Bush RK. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:56-9.
- Robinson DS, Larché M, Durham SR. Treas and allergic disease. *J Clin Invest* 2004;114:1389-97.
- Secrist H, Dekruyff RH, Umetsu DT. Interleukin 4 production by CD4⁺ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. *J Exp Med* 1995;181:1081-9.