



Identificación de los alérgenos del polen de *Amaranthus palmeri* comparando el patrón de reconocimiento entre alérgicos y no alérgicos

Alejandro Rosas Alvarado,* José Montes Montes,* Ethel García Latorre**

RESUMEN

Antecedentes: *Amaranthus palmeri* es un importante productor de polen alérgico en México, y pese a que una alta proporción de sujetos son alérgicos a él, se ha estudiado poco. En este estudio se analizaron las diferencias en la respuesta celular y humoral de las proteínas del polen de *A. palmeri* en tres grupos: personas alérgicas a este polen, alérgicas a otros pólenes y no alérgicas.

Objetivos: identificar las proteínas del polen de *A. palmeri* que puedan ser sus alérgenos con base en el reconocimiento de los pacientes alérgicos.

Material y métodos: se analizó la respuesta celular mediante ensayos de linfoproliferación con ocho fracciones obtenidas a partir del extracto total del polen de *A. palmeri* en el rango de 14 a 103 kDa, y el reconocimiento por IgE mediante Western blot.

Resultados: en los tres grupos estudiados hubo respuesta celular y reconocimiento por IgE de algunas proteínas del polen de *A. palmeri*, pero los alérgicos a éste tuvieron, en general, las reacciones más intensas, además del reconocimiento preferencial de algunas de las proteínas.

Conclusiones: las diferencias en el reconocimiento de las proteínas de *A. palmeri* por parte de los tres grupos permiten sugerir como posibles alérgenos a las proteínas de 17, 20, 26 y 66 kDa.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*, alérgenos.

ABSTRACT

Background: *Amaranthus palmeri* pollen is an important allergenic agent in Mexico. A high proportion of subjects allergic to pollen grains are allergic to this species. In this study, we analyzed the different response of three groups: one of patients allergic to *A. palmeri*; one of patients allergic to other pollen species different from *A. palmeri*, and one of non-allergic subjects.

Objective: To identify proteins that are recognized preferentially by patients allergic to *A. palmeri* that could be considered as its allergens.

Material and methods: T cell response was determined by lymphoproliferative assays with eight protein fractions in the range of 14 to 103 kDa obtained by electroelution, and the total protein extract. IgE recognition was determined by Western blot.

Results: Even though some individuals in the three groups showed cellular responses to some of the protein fractions, as well as IgE recognition of the pollen proteins, the allergic subjects had the strongest responses on average. Preferential recognition of some proteins was evident in *A. palmeri* pollen allergic patients.

Conclusions: Differences among the three groups were not statistically significant. However, we found four proteins with molecular weights of 17.9, 20.1, 26.6 and 66.5 kDa, which can be proposed as allergens.

Key words: *Amaranthus palmeri*, allergen.

Las amarantáceas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo y comprenden varias especies productoras de polen alérgico. En México, las especies más importantes son: *Amaranthus palmeri*, *A. retroflexus* y

A. leucocarpus. El género *Amaranthus* crece como maleza, pero también puede ser cultivada como planta de ornato o para la elaboración de productos alimenticios en algunas regiones.^{1,2} *A. palmeri* abunda en las zonas templadas de México, y su temporada de polinización

* Servicio de Alergia. Hospital General de México, OD.

** Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Correspondencia: Dr. Alejandro Rosas Alvarado. Hospital General de México, OD, Servicio de Alergia. Dr. Balmis núm. 148, colonia Doctores, 06720, México, DF.
Correo electrónico: alex3rosas@yahoo.com.mx

Recibido: julio, 2008. Aceptado: septiembre, 2008.

Este artículo debe citarse como: Rosas AA, Montes MJ, García LE. Identificación de los alérgenos del polen de *Amaranthus palmeri* comparando el patrón de reconocimiento entre alérgicos y no alérgicos. Rev Alerg Mex 2008;55(6):215-21.

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

abarca de mayo a agosto.³ De los pacientes alérgicos al polen, una alta proporción son alérgicos al género *Amaranthus*. En el servicio de Alergia del Hospital General de México, en el año 2006, de un total de 2,235 pacientes a quienes se les realizaron pruebas cutáneas, 147 (6.7%) dieron positivo al extracto del polen de *A. palmeri*, con variaciones mensuales de 3.4 a 11.7%. En otros reportes bibliográficos, se ubica al alérgeno de *A. palmeri* entre los tres primeros en cuanto a frecuencia de positividad de los pólenes;⁶⁻¹¹ no obstante, es poco estudiado y sólo se le menciona en relación con su cruce antigénico con las chenopodiáceas^{4,5} y la frecuencia de positividad en las pruebas cutáneas.⁶⁻¹¹

La identificación de los alérgenos es un requisito para la estandarización de los extractos alérgicos y para el estudio del cruce antigénico. El reconocimiento por anticuerpos es una herramienta útil en el estudio de los alérgenos y se ha utilizado durante muchos años con este fin; en contraste, la respuesta celular pocas veces se usa con este propósito.¹²⁻¹⁴ Por tal razón, se valoraron ambos aspectos de la respuesta inmunitaria mediante ensayos de linfoproliferación con ocho fracciones obtenidas por electroelución, y el extracto total, y se reconocieron por IgE las proteínas del polen separadas electroforéticamente con Western blot en sujetos alérgicos al polen de *A. palmeri*, en alérgicos a otros pólenes y en no alérgicos, para determinar las proteínas más alérgicas con base en las diferencias de reconocimiento entre los tres grupos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Los pacientes se reclutaron en el servicio de Alergia del Hospital General de México, OD, después de haber sido informados del propósito de la investigación y de dar su consentimiento por escrito. Se incluyeron 18 pacientes con historia clínica compatible y con prueba cutánea (intradérmica) positiva con el extracto de *A. palmeri*. También se seleccionaron ocho sujetos alérgicos a otros pólenes diferentes de *A. palmeri* y seis individuos sanos sin antecedentes de enfermedad alérgica. Los principales síntomas de los pacientes alérgicos fueron: asma bronquial, rinitis o rinosinusitis. El estudio se realizó fuera de la temporada de polini-

zación de *A. palmeri* para detectar diferencias basales en el reconocimiento.

Obtención de las proteínas del polen

El polen adquirido a IBI (NC, EU) se desengrasó con éter etílico anhidro. Las proteínas se extrajeron mediante agitación durante cuatro horas en frío en PBS (solución amortiguada de fosfatos) a una proporción de 1:10 (peso/volumen). El extracto se aclaró por centrifugación y se filtró a través de una membrana de poro 0.45 µm. Después, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético y se lavaron con acetona fría tres veces. El botón se dejó secar y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Electroforesis de las proteínas

Las proteínas del polen se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida en gradiente de 10 a 15% de monómeros, de acuerdo con el método de Laemmli.¹⁵

Obtención de las fracciones para los ensayos de linfoproliferación

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron negativamente con 300 mM de cloruro de cobre para visualizar las proteínas. Se cortaron bandas o grupos de proteínas (dependiendo de su proximidad con las bandas contiguas), y se extrajeron del gel mediante electroelución. Las fracciones se electrodializaron para eliminar el cloruro de cobre y posteriormente se dializaron contra PBS. Por último, se esterilizaron por filtración (0.22 µm) y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Se obtuvieron ocho fracciones con una o más proteínas en el rango de 14 a 103 kDa (figura 1).

Ensayos de linfoproliferación

Se obtuvieron las células mononucleares de 20 mL de sangre heparinizada por sedimentación sobre ficoll-hypaque (Lymphopaque, Nycomed). Se cultivaron 2.5×10^5 células por pozo en placas de 96 pozos de fondo cóncavo (Nunc) con o sin antígeno (1 µg de proteína por pozo) en medio sintético (AIM-V, Gibco) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se utilizó concanavalina-A (Sigma Chemicals) como control de viabilidad. Después del tiempo de incubación (una semana para los cultivos estimulados con las proteínas del polen y 72 horas para los estimulados con Con-A)

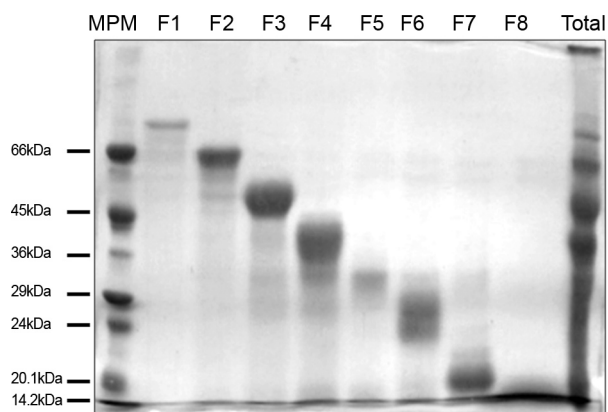


Figura 1. Ocho fracciones con una o más proteínas para los ensayos de linfoproliferación.

se agregaron 5 μ Ci/pozo de timidina tritiada (Amersham). Tras una incubación adicional de ocho horas, las células se congelaron a -20°C para, posteriormente, cosecharlas y cuantificar la síntesis de ADN mediante la determinación de la incorporación de la marca radiactiva con un contador de centelleo que se expresó en cuentas por minuto (cpm). Los índices mitogénicos se calcularon dividiendo las cpm de las muestras con antígeno o mitógeno entre las de los testigos. La respuesta se consideró positiva si el índice mitogénico era igual o mayor de 3.

Western blot

Las proteínas del polen separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin y col.¹⁶ Las membranas con las proteínas transferidas se cortaron longitudinalmente en tiras de 5 mm y se incubaron con los sueros de los pacientes y los testigos diluidos, en proporción de 1:15, durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. El reconocimiento por IgE de las proteínas del polen se determinó con un anticuerpo de conejo contra la IgE humana conjugado con peroxidasa mediante quimioluminiscencia con un equipo comercial (ECL kit, Amersham).

Para facilitar la comparación del reconocimiento por la IgE entre y dentro de cada uno de los grupos estudiados, se asignaron arbitrariamente unidades de reconocimiento (UR) de acuerdo con la siguiente

escala: 1 = muy débil, 2 = débil, 3 = moderado, 4 = fuerte, 5 = muy fuerte. De esta manera se le pudieron asignar valores numéricos al reconocimiento de cada proteína y promediar. La misma persona hizo todas las determinaciones para evitar sesgos interpersonales.

Identificación de los alérgenos

Para determinar las proteínas más alérgicas se correlacionaron los resultados del Western blot con los de los ensayos de linfoproliferación, y se graficaron los promedios de los índices mitogénicos y la suma de las unidades de reconocimiento de las proteínas perteneciente a cada fracción.

RESULTADOS

La respuesta linfoproliferativa de los pacientes alérgicos al polen de *A. palmeri* (grupo A) fue bastante heterogénea, pero la mayoría reconoció al menos tres de las fracciones, y seis de 14 mostraron índices mitogénicos mayores de 3 con todas las fracciones y con el extracto total. En contraste, en el grupo de pacientes alérgicos a otros pólenes sólo uno reconoció todas las fracciones y otro únicamente el extracto total, mientras que otro no identificó ninguna fracción. En el grupo de sujetos sanos (grupo C) sólo uno reconoció todas las fracciones y tres de los seis ninguna (cuadro 1).

Los pacientes del grupo A tuvieron una respuesta linfoproliferativa promedio más fuerte con las fracciones 4 y 7, con índice mitogénico de 6.6 y 6.8, respectivamente; mientras que la respuesta más débil, pero positiva, se observó con la fracción 1, con un índice mitogénico de 4.8. Por su parte, en el grupo B la respuesta promedio más fuerte se obtuvo con las fracciones 5 a 8 (índice mitogénico 8.2; 7.7; 7.5, y 7.1, respectivamente). En el caso del grupo C, la respuesta promedio fue ligeramente mayor a 3, con las fracciones 4 a 8, mientras que con las fracciones 1 a 3 la respuesta no fue significativa (índices mitogénicos menores de 3). Al igual que en los otros grupos, la respuesta más débil se obtuvo con la fracción 1.

En el caso del reconocimiento por la IgE específica, la respuesta también varió notablemente, pero fue mayor en ambos grupos de pacientes alérgicos (A y B), como se observa en la figura 2. De manera individual, algunas

Cuadro 1. Índices mitogénicos de los ensayos de linfoproliferación con el extracto total (ET) y las ocho fracciones de proteínas del polen de *Amaranthus palmeri* (F1 a F8).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	ET
Grupo A									
1	1.9	2.6	3.8	3.5	3.9	2.9	4.9	3.1	4.9
2	1.5	1.5	2.4	3.0	2.1	2.6	2.2	4.3	6.4
3	1.1	2.3	5.5	3.3	1.4	3.2	3.4	2.2	9.9
4	4.4	4.8	6.0	9.6	5.2	4.7	12.5	6.2	10.1
5	2.3	1.9	1.4	14.6	4.1	4.3	4.6	5.0	9.7
6	1.6	0.9	3.5	3.4	4.2	3.8	2.3	2.4	5.3
7	1.2	2.9	2.8	3.7	3.3	2.2	3.1	3.2	3.1
8	4.2	5.3	2.0	1.7	2.5	3.2	6.6	5.1	4.3
9	1.8	2.5	5.2	5.3	6.8	3.9	5.0	3.0	3.9
10	1.0	1.7	2.3	3.0	2.6	2.1	2.8	1.6	2.3
11	15.9	13.3	10.2	9.8	20.5	10.2	17.8	15.8	35.1
12	4.2	5.7	5.1	6.1	3.2	6.1	7.3	7.2	10.3
13	12.5	16.0	17.3	18.3	15.8	21.3	15.2	18.9	33.8
14	6.6	7.1	8.7	6.9	6.6	7.6	7.3	6.6	10.9
Promedio	4.30	4.89	5.44	6.59	5.87	5.58	6.79	12.13	10.71
Positividad	5/14	6/14	9/14	13/14	10/14	10/14	11/14	11/14	13/14
Grupo B									
1	1.2	6.5	9.1	9.4	11.1	7.4	10.2	9.1	8.5
2	1.0	1.1	0.8	1.5	0.9	1.0	1.0	1.6	1.2
3	0.7	0.9	2.0	2.1	2.2	1.9	1.6	1.7	3.1
4	2.9	2.2	1.9	2.2	4.9	4.3	3.2	4.0	6.8
5	5.3	9.2	6.0	15.9	19.2	26.3	21.3	19.2	35.4
Promedio	1.45	2.68	3.45	3.80	4.78	3.65	4.00	4.10	4.90
Positividad	1/5	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5	3/5	3/5	4/5
Grupo C									
1	0.9	2.5	2.4	2.9	3.4	2.6	4.0	2.9	3.9
2	2.0	1.7	0.9	0.8	1.0	0.9	2.7	2.6	2.1
3	2.2	3.5	4.6	7.8	7.1	8.1	5.3	5.4	8.6
4	3.9	4.1	4.9	9.3	8.8	8.6	7.3	8.8	14.5
5	0.8	0.6	0.8	0.7	0.8	0.9	0.7	0.9	2.8
6	0.8	0.9	0.9	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	2.0
Promedio	1.84	2.44	2.64	4.24	4.18	4.16	3.98	4.06	5.98
Positividad	1/6	2/6	2/6	2/6	3/6	2/6	3/6	2/6	4/6

Grupo A: pacientes alérgicos a *A. palmeri*; grupo B: pacientes alérgicos a otros pólenes; grupo C: sujetos sanos.

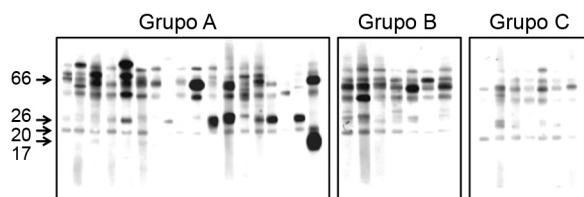


Figura 2. Reconocimiento de las proteínas de *A. palmeri* por la IgE en los tres grupos.

proteínas fueron reconocidas muy intensamente y otras débilmente, pero el reconocimiento más fuerte ocurrió con los sueros de los pacientes del grupo A. En cuanto a la frecuencia de reconocimiento de las diferentes proteínas por parte de los tres grupos (cuadro 2), se apreció que algunas proteínas son reconocidas por todos o casi todos los sueros. Por el contrario, hay algunas proteínas que sólo fueron reconocidas por el grupo A, aunque pocas veces.

DISCUSIÓN

No se encontró correlación entre la respuesta celular y el reconocimiento por IgE. Algunas fracciones dieron una buena respuesta celular, mientras que su reconocimiento por la IgE específica fue muy bajo (fracciones 6 a 8 en los tres grupos). En cambio, el reconocimiento de las proteínas de la fracción 2 fue de los más altos, aunque la respuesta linfoproliferativa fue escasa (figura 3).

Aunque los valores obtenidos con las distintas fracciones en los ensayos de linfoproliferación fueron muy variables, al comparar los promedios se determinó que ambos grupos de pacientes alérgicos tuvieron la respuesta celular más intensa con todas las fracciones y el extracto total; sin embargo, las diferencias entre los tres grupos no fueron estadísticamente significativas (prueba de Kruskal-Wallis). A pesar de esto, los resultados permiten sugerir como probables alérgenos a las proteínas de 66, 26, 20 y 17 kDa.

Aunque la fracción 2 indujo la respuesta celular más débil en los tres grupos estudiados, la proteína de 66 kDa de esta fracción fue reconocida por la IgE de la mayor parte de los sueros probados, y el reconocimiento por los pacientes alérgicos fue casi el doble del de los sanos.

Además, la fracción 5 fue de las que mostraron la respuesta celular más fuerte y la proteína de 26 kDa de ésta

Cuadro 2. Porcentaje de individuos que mostraron reconocimiento por IgE en los tres grupos

Proteína	A	B	C
103 kDa	44	14	0
86 kDa	94	100	100
73 kDa	94	100	100
66 kDa	88	100	85
62 kDa	94	85	100
53 kDa	33	14	14
44 kDa	94	100	85
38 kDa	33	0	0
35 kDa	27	42	14
28 kDa	77	71	85
26 kDa	61	85	71
20 kDa	100	100	100
17 kDa	16	0	0
14 kDa	5	0	0

Grupo A: pacientes alérgicos a *A. palmeri*; grupo B: pacientes alérgicos a otros pólenes; grupo C: sujetos sanos.

fue reconocida intensamente por la IgE de los sueros de los pacientes del grupo A, en comparación con los otros dos grupos; sin embargo, la más alta frecuencia de reconocimiento de esta proteína la tuvo el grupo B.

La proteína de 20 kDa de la fracción 6 induce una respuesta celular intensa y es reconocida por la IgE de todos los sueros probados.

Una proteína de 17 kDa fue identificada sólo por los sueros de dos pacientes alérgicos a *A. palmeri*, y en uno de ellos (número 18, figura 2, grupo A) se notó el mayor reconocimiento de todas las proteínas con todos los sueros probados.

El que una proteína induzca una fuerte linfoproliferación no necesariamente implica que su reconocimiento por los anticuerpos sea del mismo grado. La fracción 8 produjo una buena respuesta celular, pero la proteína de 14 kDa casi no fue reconocida por la IgE. Esto puede deberse a que la fracción 8 que migró con el frente de corrimiento contiene proteínas de bajo peso molecular junto con fragmentos de proteínas degradadas de mayor peso molecular, los cuales pueden inducir una respuesta celular, pero debido a la desnaturalización o degrada-

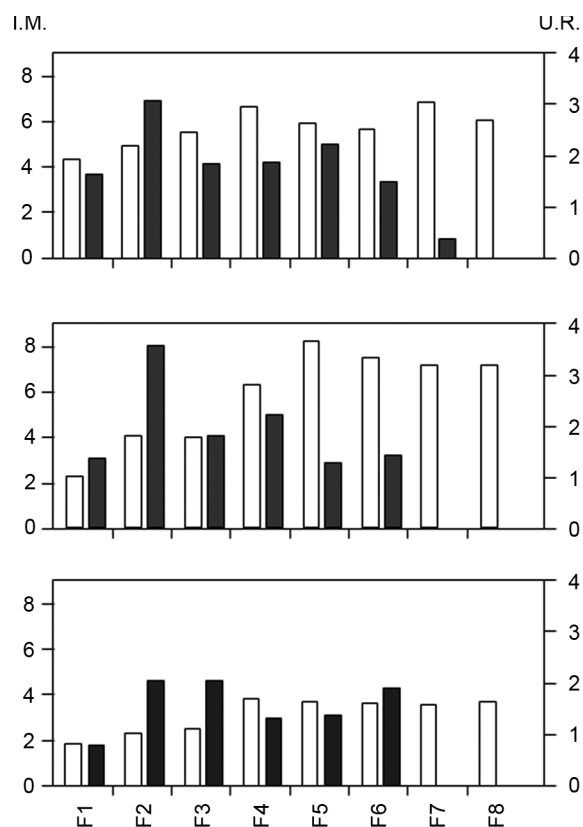


Figura 3. Promedios del reconocimiento de las proteínas de las 8 fracciones en los ensayos de linfoproliferación (expresada en índices mitogénicos IM) y por la IgE específica (expresada en unidades de reconocimiento UR).

ción, es posible que hayan perdido sus determinantes antigénicos.

La respuesta linfoproliferativa al estímulo con proteínas alergénicas generalmente no se ha usado para identificar alérgenos. En esta investigación se valoró la reactividad celular como un complemento al reconocimiento por la IgE para tratar de identificar las proteínas del polen de *A. palmeri*, que son más importantes desde el punto de vista de su alergenicidad.

No obstante, los resultados obtenidos en este tipo de pruebas deben interpretarse cuidadosamente, ya que como se observó, en los cultivos celulares de pacientes alérgicos con las diferentes fracciones no todos tuvieron una respuesta linfoproliferativa mayor a 3. Los linfocitos de sujetos sanos también pueden proliferar en respuesta a un estímulo con alérgenos, como lo muestran

los resultados obtenidos y como se ha reportado en la bibliografía;¹⁷ no obstante, hay quienes han propuesto la virtual ausencia de linfocitos T alérgico específicos en sujetos no alérgicos.^{18,19}

Upham y col.²⁰ encontraron linfoproliferación en respuesta a alérgenos inhalables en todos los sujetos estudiados, alérgicos o no. Ellos atribuyen las discrepancias en los resultados a la composición del medio de cultivo celular, ya que algunos constituyentes del suero empleado como suplemento pueden inhibir la síntesis de ciertas linfocinas. En este trabajo, al igual que en el de Upham, se utilizó el medio sintético sin suero (AIM-V, Gibco), lo que puede explicar las similitudes en los resultados.

A simple vista, la respuesta celular de ambos grupos de pacientes alérgicos es muy semejante, y la principal diferencia con respecto a la de los sujetos sanos radica en la magnitud. En ellos, la respuesta es hasta cierto punto predecible, ya que toda la gente (alérgica o no) está expuesta al polen. Es posible que se hubieran encontrado discrepancias más marcadas entre los tres grupos si además se hubieran cuantificado algunas citocinas como las típicas Th1 (IL-2, TNF β , IFN γ) o Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10).

Como ya se mencionó, el reconocimiento por IgE en los tres grupos estudiados es parecido, pero las pequeñas diferencias sugieren cuatro posibles alérgenos. Un aspecto interesante es el hecho de haber hallado IgE específica de las proteínas del polen de *A. palmeri* incluso en sujetos sanos, a diferencia de lo comunicado en otros trabajos. Sallusto y col.²¹ encontraron respuesta celular positiva e IgG específica contra las proteínas del polen de *Parietaria judaica* en sujetos alérgicos y no alérgicos; pero IgE sólo en los alérgicos. No obstante, Tame y col.,²² al analizar las diferencias entre los títulos de IgE y las subclases de IgG específicas contra *Der p 2* recombinante en individuos alérgicos y no alérgicos, hallaron IgE específica, aunque con títulos bajos, en personas no alérgicas.

La similitudes entre ambos grupos de alérgicos en la respuesta celular y humoral pueden deberse al cruce antigénico que hay entre las proteínas de los diferentes pólenes, lo cual dificulta la identificación de los alérgenos debido a que no es fácil establecer si la respuesta celular o los anticuerpos fueron dirigidos contra la pro-

teína *per se* o contra otra con determinantes antigénicos comunes.

Por último, en dos estudios independientes se identificaron seis proteínas alergénicas del polen de *Amaranthus retroflexus*: de 11, 14, 17, 30, 35 y 55 kDa. De éstas, sólo la de 17 kDa parece tener correspondencia con uno de los alérgenos identificados en esta investigación. Llama la atención que en el primero de los estudios, el de Lombardero,⁴ el objetivo fue determinar el grado de cruce antigénico entre *A. retroflexus*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, *Atriplex latifolia* y *Beta vulgaris* con sueros de alérgicos a *C. album*; y en el de Würtzen⁵ de *A. retroflexus*, *C. album*, *Salsola pestifer*, *Kochia scoparia*, con sueros de alérgicos a *S. pestifer*.

REFERENCIAS

- Mejía-Ortega J. Pólenes en alergia. En: Zambrano SA, editor. Inmunología. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1994;pp:235-47.
- Orozco-Suárez SA, Zamacona G. Estudio de la flora alérgica en el valle de México. Relación con la sensibilidad alimenticia de origen vegetal (4ª parte). Rev Alerg Mex 1992;39:163-7.
- Mejía-Ortega J. Familia Amaranthaceae. Alergia 1985;32:17-21.
- Lombardero M, Duffort J, Sellés JG. Cross-reactivity among *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae*. Ann Allergy 1985;54:430-6.
- Würtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H. Characterization of chenopodials (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. Allergy 1995;50:489-97.
- Del Río Navarro BE, Williams Gotti MJ, Rosas MA, Paredes Novelo C, Sienra Monje JJ, Castellanos A. Reactividad cutánea en conjuntivitis alérgica. Rev Alerg Mex 1992;39(3):59-61.
- Méndez JLA, Paz MD, Galindo GJA, Toriz MJE. Principales alérgenos en las enfermedades alérgicas más frecuentes. Alergia e Inmunol Pediat 1996;5(1):5-8.
- Méndez Juárez LA, Paz Martínez D, Galindo García JA, Toriz Martínez JE. Frecuencia de pruebas cutáneas positivas para enfermedades alérgicas en el Hospital Universitario de Puebla. Alergia e Inmunol Pediat 1996;5(2):54-56.
- Sienra MJJ, Lerma OL, Del Río NBE, Ávila CL, Montejo BM. Determinación de hipersensibilidad inmediata a pólenes en pacientes alérgicos del Distrito Federal. Rev Alerg Mex 2000;47(1):3-11.
- Bañuelos AAC, Montaña VBB, Campillo NMR, Mójica MMD, et al. Pruebas cutáneas, IgE sérica específica e IgE total en el diagnóstico de pacientes con rinitis alérgica perenne. Rev Alerg Mex 2003;50(4):147-53.
- Vargas OE, Castrejón VMI, Galicia TJ, Miranda FAJ. Alérgenos más frecuentes en pacientes alérgicos atendidos en un hospital de tercer nivel. Rev Alerg Méx 2004;51(4):145-50.
- Broman P, Moller E. Lymphocyte transformation by grass pollen allergens. Allergy 1984;39:297-308.
- Eisenbrey AB, Agarwal MK, Offord KP. Seasonal variation of *in vitro* lymphocyte proliferative response to ragweed antigen E. J Allergy Clin Immunol 1985;75:84-90.
- Olivé-Pérez DA. Respuesta blástica e IgE específica al polen de gramíneas. Significación biológica. Alergia 1980;27:171-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
- Buckley RH, Seymour F, Sanal SO, Ownby DR, Becker G. Lymphocyte response to purified ragweed allergens *in vitro*. I. Proliferative response in normal, newborn, agammaglobulinemic, and atopic subjects. J Allergy Clin Immunol 1977;59:70-78.
- Rawle FC, Mitchell EB, Platts-Mills TAE. T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, antigen p 1: comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. J Immunol 1984;133:195-201.
- O'Brien RM, Thomas WR, Wootton AM. T cell responses to purified major allergens from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 1992;29:1021-31.
- Upham JW, Holt BJ, Baron-Hay J. Inhalant allergen-specific T-cell reactivity is detectable in close to 100% of atopic and normal individuals: covert responses are unmasked by serum-free medium. Clin Exp Allergy 1995;25:634-42.
- Sallusto F, Quintieri F, Pugliese O. T-cell and antibody response to *Parietaria judaica* allergenic fractions in atopic and nonatopic individuals. Allergy 1993;48:37-44.
- Tame A, Sakiyama Y, Kobayashi I. Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-Der p 2 antibodies in allergic and non allergic patients measured with recombinant allergen. Clin Exp Allergy 1996;26:43-49.