

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR B
E INMUNOLOGIA

EL SISTEMA HLA EN EL ASMA:
ASOCIACION DEL GENOTIPO DRB1*01-DQB1*0501 CON EL ASMA
ALÉRGICO A *ARTEMISIA VULGARIS*

TESIS DOCTORAL
ALBERTO TORIO RUIZ
2003

Memoria presentada para optar al título
de Doctor en Biología

Autor: Alberto Torío Ruiz

Directores: Dra. María Rocío Álvarez López

Dr. Manuel Muro Amador

La Dra. Dña. María Rocío Álvarez López, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “El sistema HLA en el asma: Asociación del genotipo DRB1*01-DQB1*0501 con el asma alérgico a *Artemisia vulgaris*”, ha sido realizado por el Licenciado en Biología D. Alberto Torío Ruiz bajo mi dirección, y corresponde fielmente a los resultados. Una vez redactada la presente Memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en Murcia a diez de noviembre de dos mil tres.

Fdo. Dra. M^a. Rocío Álvarez

El Dr. D. Manuel Muro Amador, Facultativo del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

CERTIFICA: Que el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “El sistema HLA en el asma: Asociación del genotipo DRB1*01-DQB1*0501 con el asma alérgico a *Artemisia vulgaris*”, presentado por el D. Alberto Torío Ruiz, ha sido realizado bajo mi dirección, y reúne, a mi entender, las condiciones precisas para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia a diez de noviembre de dos mil tres.

Fdo. Dr. M. Muro Amador

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Rocío Álvarez López y al Dr. Manuel Muro Amador, por el planteamiento y dirección de esta tesis, y por las muchas horas de desinteresada ocupación empleadas en la realización de este trabajo.

A la Dra. Inmaculada Sánchez-Guerrero, del Servicio de Alergia del Hospital Rafael Méndez de Lorca, y al Dr. Juan Pagán, del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, por su colaboración en la selección y obtención de las muestras de los pacientes.

A mis compañeros residentes del Servicio de Inmunología: Jesús Ontañón, Alfredo Minguela, Luis Marín, Rosa Moya, Antonella Buttazzo, Trinidad Hernández y Olga Montes por su inestimable colaboración y apoyo en todo momento.

Al Dr. Juan Rosique por su colaboración en el desarrollo y análisis de las técnicas de ELISA realizadas en esta tesis.

A todo el personal del Servicio de Inmunología por su colaboración, y especialmente al personal perteneciente a las secciones de HLA y celular durante la realización de este trabajo: María Carmen García, María José Sanchís e Inmaculada García, por su apoyo y amistad.

A la Dra. Luisa María Villar y al Dr. Pedro González del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, por su colaboración en las técnicas de purificación de proteínas.

Al personal de las casas Alergia e Inmunología Abelló y Pharmacia-Upjohn, por su colaboración en la obtención de reactivos imprescindibles para la realización de este trabajo.

A mi familia y amigos, que aunque no han tenido nada que ver con la realización de esta tesis, tengo mucho que agradecerles.

Los trabajos presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A. Torío, I. Sánchez-Guerrero, M. Muro, N. Herrero, J. Pagán, A. Minguela, L. Marín, MR. Moya-Quiles, MJ. Sanchís, MR. Álvarez-López. "*Analysis of HLA-Class I and Class-II phenotypic distribution in atopic and non atopic asthmatic patients*". European Journal of Immunogenetics, 27: 81-85. 2000.

A. Torío, I. Sánchez-Guerrero, M. Muro, LM. Villar, A. Minguela, L. Marín, MR. Moya-Quiles, O. Montes-Ares, J. Pagán, MR. Alvarez-López. "*HLA Class II allele frequencies in atopic asthma. Association between DRB1*01-DQB1*0501 and Artemisia vulgaris allergic asthma*". Human Immunology, 64: 811-815. 2003.

A. Torío, I. Sánchez-Guerrero, LM. Villar, M. Muro, A. Minguela, L. Marín, MR. Moya-Quiles, O. Montes-Ares, J. Pagán, MR. Alvarez-López. "*HLA-DRB1 and -DQB1 genotypes in the proliferative response to Artemisia vulgaris allergens*". Sometido.

También han sido presentadas 4 comunicaciones en congresos internacionales y 3 en nacionales.

ABREVIATURAS

aas	aminoácidos
Ac	anticuerpo
AcMo	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxiribonucleico
Ag	antígeno
APC	célula presentadora de antígeno
BSA	albúmina de suero bovina
CD	<i>cluster differentiation</i> -grupo de diferenciación
cpm	cuentas por minuto
DIG	digoxigenina
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfatos
EEM	error estándar de la media
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	enzimo-inmunoanálisis
FE	factor etiológico
FP	factor preventivo
HLA	antígeno leucocitario humano
HSP	proteína de choque térmico
Ig	inmunoglobulina
IL	interleucina
IP	índice de proliferación
kDa	kilodalton
MCC	medio de cultivo completo
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
NK	<i>natural killer</i> -células asesinas naturales
OPD	1,2-fenilendiamina
PBS	solución tamponada de fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PHA	fitohemaglutinina
PNPP	p-nitrofenil fosfato
PWM	mitógeno pokeweed
RAST	test radioalergosorbente
RFLP	polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción
RR	riesgo relativo
SSO	oligonucleótidos específicos de secuencia
SSP	cebadores específicos de secuencia
SPT	<i>skin prick test</i> -prueba cutánea de Prick
TCR	receptor de la célula T
Th	linfocitos T cooperadores
TNF	factor de necrosis tumoral
UB	unidad biológica
UI	unidad internacional
UR	unidad relativa
UV	ultravioleta

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Asma y sistema HLA

1.1. Definición del asma.....	1
1.2. Clasificación del asma.....	2
1.2.1. Asma extrínseco o alérgico.....	3
1.2.2. Asma intrínseco o no alérgico.....	4
1.3. Patogénesis del asma.....	5
1.4. Genética y asma.....	8
1.4.1. Subunidad β del receptor de alta afinidad para la IgE.....	8
1.4.2. Agrupamiento de genes de citocinas en el cromosoma 5.....	9
1.4.3. Otros genes.....	10
1.5. Incidencia del asma.....	11
1.6. Terapéutica del asma.....	12
1.7. El sistema HLA.....	14
1.7.1. Estructura génica	14
1.7.2. Estructura y función de las moléculas HLA.....	17
1.7.2.1. Estructura de las moléculas HLA de clase I.....	17
1.7.2.2. Estructura de las moléculas HLA de clase II.....	19
1.7.3. Polimorfismo	20
1.7.4. Asociación con enfermedad.....	21

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2: Análisis de las frecuencias HLA de clase I y II en pacientes con asma intrínseco y extrínseco

2.1. Introducción.....	25
2.2. Pacientes y grupos de estudio.....	26
2.2.1. Grupo asma extrínseco o alérgico.....	27
2.2.2. Grupo asma intrínseco o no alérgico.....	27
2.2.3. Grupo control.....	27
2.3. Materiales y métodos.....	27
2.3.1. Pruebas cutáneas.....	27
2.3.2. Tipificación HLA de clase I.....	29
2.3.2.1. <i>Materiales y reactivos empleados en el tipaje HLA de clase I.....</i>	<i>29</i>

2.3.2.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica.....	30
2.3.2.3. Ensayo de microlinfocitotoxicidad.....	30
2.3.3. Tipificación HLA de clase II.....	32
2.3.3.1. Reactivos para la extracción del ADN.....	32
2.3.3.2. Reactivos utilizados en PCR-SSOP.....	33
2.3.3.3. Extracción de ADN.....	36
2.3.3.4. Técnica de PCR-SSOP.....	37
2.3.4. Análisis estadístico.....	42
2.4. Resultados.....	43
2.5. Discusión.....	46

CAPÍTULO 3: Comparación de las frecuencias HLA de clase I y II en los pacientes con asma extrínseco

3.1. Introducción.....	50
3.2. Grupos de estudio.....	55
3.3. Métodos.....	55
3.3.1. Reactivos utilizados en PCR-SSP.....	55
3.3.2. Técnica de PCR-SSP.....	55
3.3.3. Análisis estadístico.....	57
3.4. Resultados.....	58
3.4.1. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Olea europaea</i>	58
3.4.2. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Alternaria alternata</i>	58
3.4.3. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Phleum pratense</i>	59
3.4.4. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Salsola kali</i>	60
3.4.5. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	62
3.4.6. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Artemisia vulgaris</i>	63
3.4.7. Asmáticos extrínsecos alérgicos a <i>Parietaria judaica</i>	65
3.4.8. Asmáticos extrínsecos alérgicos a epitelio de gato.....	65
3. 5. Discusión.....	67

CAPÍTULO 4: Análisis de la respuesta a los alergenos de *Artemisia vulgaris* dependiente del haplotipo HLA-DRB1*01-DQB1*0501

4.1. Introducción.....	71
4.2. Materiales y métodos.....	73
4.2.1. Muestras para las determinaciones séricas.....	73

4.2.2. Cuantificación de inmunoglobulinas por nefelometría.....	73
4.2.3. Cuantificación de IgE específica anti <i>Artemisia vulgaris</i>	74
4.2.4. Purificación de proteínas de <i>Artemisia vulgaris</i>	75
4.2.4.1. Reactivos utilizados en la purificación de proteínas.....	75
4.2.4.2. Precipitación de proteínas.....	76
4.2.4.3. Separación cromatográfica.....	76
4.2.4.4. Inmunotransferencia.....	76
4.2.4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	77
4.2.5. Cuantificación de inmunoglobulinas por enzimo-inmunoanálisis..	77
4.2.5.1. Reactivos usados en las técnicas de enzimoinmunoanálisis.....	79
4.2.5.2. Cuantificación de IgE e IgG anti Ag 13 y Art v 2.....	79
4.2.5.3. Cuantificación de IgE en sobrenadante de cultivo.....	81
4.2.6. Estudios <i>in vitro</i> de proliferación y producción de IgE	82
4.2.6.1. Selección de pacientes y controles.....	82
4.2.6.2. Experimentos de cultivos celulares <i>in vitro</i>	83
4.2.6.3. Reactivos empleados en los cultivos celulares.....	83
4.2.6.4. Congelación y descongelación celular.....	84
4.2.6.5. Ensayos de proliferación.....	85
4.2.6.6. Cultivos de producción de inmunoglobulinas.....	87
4.2.7. Análisis estadístico.....	88
4.3. Resultados.....	88
4.3.1. Resultados de las inmunoglobulinas séricas.....	88
4.3.2. Resultados de los cultivos de proliferación.....	90
4.3.3. Resultados de los cultivos de producción de IgE.....	94
4.4. Discusión.....	95

CAPÍTULO 5: Discusión final y conclusiones.....100

CAPÍTULO 6: Referencias bibliográficas.....107

CAPÍTULO 1

ASMA Y SISTEMA HLA

1.1. Definición del asma

El asma es una enfermedad crónica que a pesar de ser conocida desde la antigüedad y afectar a millones de personas en todo el mundo, los intentos por definirla han tenido poco éxito hasta fechas recientes.

En 1959 se celebró el *Simposium Ciba* con el propósito de redefinir las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, especialmente enfisema, asma y bronquitis crónica. La definición que resultó de dicho simposium enfatizaba la reversibilidad de la obstrucción de las vías aéreas, así se definió el asma como "la condición de los sujetos que experimentan estrechamiento de las vías aéreas bronquiales, que cambia en severidad en cortos periodos de tiempo, bien de forma espontánea o mediante tratamiento y no es debido a enfermedad cardiovascular. Las características clínicas son: respiración jadeante, que puede ser paroxística o persistente, sibilancias y, en la mayoría de los casos, mejoría con tratamiento broncodilatador, incluyendo corticoides" (Ciba foundation, 1959).

En 1962 el comité de estandarización diagnóstica de la *American Thoracic Society* incluyó en la definición la presencia de hiperreactividad bronquial (American Thoracic Society, 1962). Posteriormente, un comité conjunto de la *American Thoracic Society* y el *American College of Chest Physicians* propuso en 1975 la siguiente definición: "el asma es una enfermedad caracterizada por un incremento de la respuesta de las vías respiratorias a varios estímulos y que se manifiesta por el retraso de la expiración forzada el cual cambia en severidad bien espontáneamente, bien como resultado del tratamiento" (American College of Chest Physicians and American Thoracic Society, 1975).

En los años 80 se introduce el concepto de inflamación, dando en 1987 la *American Thoracic Society* la siguiente definición: "el asma es un síndrome clínico caracterizado por un aumento de la respuesta de las vías traqueobronquiales frente a una variedad de estímulos. Los síntomas principales del asma son los paroxismos de disnea, sibilancias y tos, que pueden variar desde moderados y a veces indetectables, hasta intensos o muy graves (estatus asmático). La manifestación fisiológica primaria de esta

hiperrespuesta es una obstrucción de vías aéreas que puede observarse como una fluctuación espontánea en la intensidad de la obstrucción, como una mejoría significativa de la severidad de la obstrucción tras la administración de broncodilatadores o corticoides, o como un aumento de la obstrucción producida por fármacos u otros estímulos. Histológicamente, los pacientes con asma fatal presentan evidencias de edema de la mucosa bronquial, infiltración de la mucosa o de la submucosa por células inflamatorias, especialmente eosinófilos, descamación del epitelio y obstrucción por moco en las vías aéreas periféricas" (American Thoracic Society, 1987).

También en 1991 un comité del *National Institute of Health* afirma que el asma es una enfermedad caracterizada por tres factores, la obstrucción reversible de las vías aéreas, parcial o completamente, la inflamación de las vías aéreas y la hiperreactividad bronquial (National Institute of Health, 1991).

Una definición más reciente publicada por el *National Heart, Lung and Blood Institute* en 1997 incluye el papel de diversos tipos celulares, siendo definido como "un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas en el cual varios tipos y elementos celulares toman parte, en particular mastocitos, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. En individuos susceptibles, esta inflamación causa episodios recurrentes de sibilancias, disnea, estrechamiento de las vías bronquiales, y tos, particularmente por la noche o a primera hora de la mañana. Estos episodios están habitualmente asociados con una amplia, aunque variable, obstrucción del flujo aéreo que con frecuencia es reversible tanto espontáneamente como con tratamiento. La inflamación también se asocia con la hiperreactividad bronquial a una variedad de estímulos" (NIH/National Heart, Lung and Blood Institute, 1997).

1.2. Clasificación del asma

Aunque existen varias clasificaciones del asma, habitualmente se distinguen dos formas atendiendo a su diferente etiología y características clínicas: asma extrínseco o alérgico y asma intrínseco o no alérgico.

1.2.1. Asma extrínseco o alérgico

El asma extrínseco o alérgico es aquel que se asocia a la inhalación de alérgenos que interactúan con la IgE presente en los receptores de alta afinidad de los mastocitos de la mucosa bronquial (International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma, 1992). Esta enfermedad debuta generalmente entre los cuatro y cuarenta años, aunque ha sido diagnosticada en ancianos (Apter y col., 1988). Se estima que el 90% de los niños y más del 50% de los adultos asmáticos pertenecen a esta forma de asma. El diagnóstico de asma extrínseco se establece por una correlación de los síntomas con la exposición a los neumoalérgenos, que se confirma mediante pruebas cutáneas positivas. También se encuentra IgE total sérica aumentada, presencia de IgE específica antialérgico, y eosinofilia en sangre o esputo.

Generalmente se produce por exposición a alérgenos inhalantes, estando entre los neumoalérgenos más frecuentemente implicados los pólenes de árboles, arbustos y hierbas, las hifas y esporas de mohos, los ácaros del polvo y la caspa de animales domésticos. La mayoría de los alérgenos conocidos son proteínas de entre 3 y 80 kDa, sin que compartan estructura, función o características químicas comunes que puedan explicar la habilidad de estas moléculas para desencadenar una respuesta de IgE. Para que conserven la capacidad alérgica deben permanecer en su forma nativa, conservando la estructura tridimensional y los epítomos de unión de IgE. En aproximadamente la mitad de estas proteínas se conoce su función biológica, destacando las enzimas catabólicas (hialuranidasas, fosfolipasas y diversas proteasas) junto con otras proteínas tipo albúminas, hemoglobinas o citocromos. También es de reseñar la alta reacción cruzada presente en muchos de estos alérgenos, causada por estructuras conservadas evolutivamente. Una consecuencia de esta reactividad cruzada es la sensibilización a alérgenos a los que el paciente no ha sido expuesto (Liebers y col., 1996). El *Allergen Nomenclature Sub-Committee* de la *International Union of Immunological Societies* regula la normativa que estas proteínas deben cumplir para ser incluidos como alérgenos, condiciones que incluyen la descripción de al menos una parte de su secuencia aminoacídica (Marsh y col., 1986; King y col., 1994). Los alérgenos se denominan con las tres primeras letras del género seguidas de la primera letra de la especie a la que pertenecen, y de un número que identifica al alérgeno en

particular. Así, el alérgeno de 38 kDa del polen de la *Ambrosia artemisiifolia* se denomina Amb a 1, denominación que lo distingue de otros alérgenos de la misma especie o de los de la especie *Ambrosia trifida* (Amb t).

En general, el pronóstico de los pacientes con asma extrínseco es mejor que en el asma intrínseco, siendo los síntomas más leves y de mejor respuesta al tratamiento con broncodilatadores. Es frecuente que estos pacientes presenten historia de enfermedades alérgicas (rinitis, urticaria, eczema) y en un porcentaje elevado existe historia familiar de atopia.

1.2.2. Asma intrínseco o no alérgico

En el asma intrínseco los síntomas no pueden atribuirse a ninguna sustancia capaz de inducir la producción de IgE (International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma, 1992). Así, en general las concentraciones de IgE sérica están dentro de los rangos normales, no existiendo además IgE específica hacia los alérgenos comunes. Resulta difícil establecer un punto de corte para considerar normales o elevadas las concentraciones de IgE sérica, ya que los valores siguen una distribución unimodal en la población. En general, los individuos con asma alérgico tienen concentraciones séricas de IgE más elevadas que los pacientes con asma intrínseco, pero no es infrecuente encontrar a pacientes con asma alérgica que presentan concentraciones de IgE total extremadamente bajas. No obstante, diferentes estudios han encontrado que los pacientes con asma intrínseco tienen concentraciones de IgE sérica total superiores a las detectadas en los sujetos sanos no atópicos (Burrows y col., 1989; Bentley y col., 1992; Sánchez-Guerrero y col., 1997). Las pruebas cutáneas también son negativas en los pacientes con asma intrínseco, y en caso de ser positivos no se corresponden con factores precipitantes del asma. Tampoco suele haber historia personal o familiar de enfermedades alérgicas, aunque sí se observa una eosinofilia aumentada que suele ser superior a la de los extrínsecos. Estos pacientes son normalmente de mayor edad que los asmáticos extrínsecos, cuyos síntomas aparecen antes de los cuatro años de edad o después de los cuarenta años, y en general muestran una clínica más severa que afecta con una mayor frecuencia a las mujeres (Bentley y col., 1992). Mientras algunos estudios estiman que la frecuencia de asmáticos

intrínsecos es del 10% del total de asmáticos (Godard y col., 1997), en otros este porcentaje se eleva hasta una cifra superior al 30% (Wüthrich y col., 1995).

Desde que Rackermann enunció su clasificación del asma (Rackermann, 1947), ha existido polémica sobre la relación de esta forma de la enfermedad y la atopia. Algunos autores han sugerido que el asma intrínseco representa una forma de autoinmunidad, o autoalergia, que se desencadena como consecuencia de una infección respiratoria, en especial vírica, que a menudo la precede (Cartier y col., 1982; Doward y col., 1988). Es un hecho bien conocido que la infección del tracto respiratorio superior provoca un agravamiento del asma, llegando a demostrarse que el 85% de los ataques de asma en niños y el 44% en adultos están precedidos de infecciones respiratorias. De especial importancia son los rinovirus, aunque también destacan otros virus como el virus respiratorio sincitial, los de la influenza o parainfluenza y los adenovirus (Pattemore y col., 1992; Johnston, 1998; Busse y col., 1997). Otros autores consideran que los asmáticos intrínsecos son en realidad enfermos alérgicos en los que no se ha conseguido identificar el antígeno causante. En este sentido hay una serie de trabajos que consideran que si bien el asma intrínseco tiene un perfil clínico diferente, no tiene una entidad inmunopatológica distinta (Humbert y col., 1999). Sugieren que también podría ser una enfermedad mediada por IgE, aunque en este caso el antígeno responsable es desconocido y la producción de IgE sería localizada, en lugar de generalizada como ocurre en la atopia. Las alteraciones biológicas detectadas en las vías aéreas de los pacientes con asma intrínseco son muy similares, si no idénticas, a las encontradas en el asma alérgico, lo que no permite asumir que ambas entidades clínicas sean distintas. La única característica exclusiva del asma intrínseco es la ausencia de sensibilización IgE mediada por antígenos conocidos y, en consecuencia, su diagnóstico sólo podrá realizarse por exclusión. El término asma intrínseco significa que se ignora la causa del proceso, pero aceptar que se trata de una enfermedad con entidad propia presupone asumir que se conocen todas las causas y todos los mecanismos que pueden inducir el asma (Prieto y Gutiérrez, 1998).

1.3. Patogénesis del asma

Tal como se ha reflejado en las definiciones del asma enunciadas anteriormente, los tres componentes esenciales de la patología asmática son: la inflamación de las vías

aéreas, la obstrucción reversible de las mismas y la hiperreactividad bronquial. En todos estos procesos intervienen un gran número de células, entre las que destacan los mastocitos, los eosinófilos y los linfocitos T. En la figura 1.1 se esquematizan las interacciones entre los distintos tipos celulares.

En el primer estadio de la fase inflamatoria se produce la inhalación alérgica, o la estimulación viral, donde los antígenos son presentados en el contexto de las moléculas HLA por las APC a los linfocitos Th2, que segregan IL-4 e IL-13 propiciando el cambio de isotipo de IgM a IgE en los linfocitos B. Hay una serie de factores que favorecen la presencia predominante de Th2 sobre Th1, como son los antígenos solubles, las bajas dosis de antígeno en la inmunización y que la célula presentadora sea el linfocito B. Para la síntesis de IgE, el linfocito B requiere una segunda señal, que coopera con la de la IL-4, y que depende de los contactos adhesivos con el linfocito T vía CD40 (en el linfocito B) y su ligando CD40L (presente en el linfocito T activado) (Romagnani, 2000).

El siguiente contacto con el antígeno estimula los mastocitos por medio del receptor de IgE de alta afinidad, produciendo su desgranulación y liberación de histamina y metabolitos del ácido araquidónico como leucotrienos y prostaglandinas, que dan lugar a edema y broncoconstricción de la mucosa respiratoria. También se liberan factor activador de plaquetas y bradiquininas, los cuales causan cambios en la mucosa bronquial (contracción de la musculatura lisa, edema e hipersecreción) que son los responsables de la obstrucción bronquial (Jarjour y col., 1997).

En el segundo estadio de la inflamación se produce invasión de células inflamatorias atraídas por mediadores quimiotácticos. Aunque la infiltración eosinofílica es característica del asma (alérgico y no alérgico), no es específica de esta enfermedad. Los eosinófilos activados liberan productos altamente tóxicos, como la proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinofílica, la neurotoxina derivada del eosinófilo y radicales libres de oxígeno, eicosanoides, citocinas y factores de crecimiento, que inducen el desprendimiento de las células epiteliales, la hiperrespuesta bronquial, el aumento de la permeabilidad vascular, y la contracción del músculo liso bronquial. Los eosinófilos desempeñan también un importante papel en el proceso de remodelación de las vías aéreas mediante la liberación de factores de crecimiento, elastasa y metaloproteasas que estimulan a los fibroblastos (Weller y col., 1991). La mi-

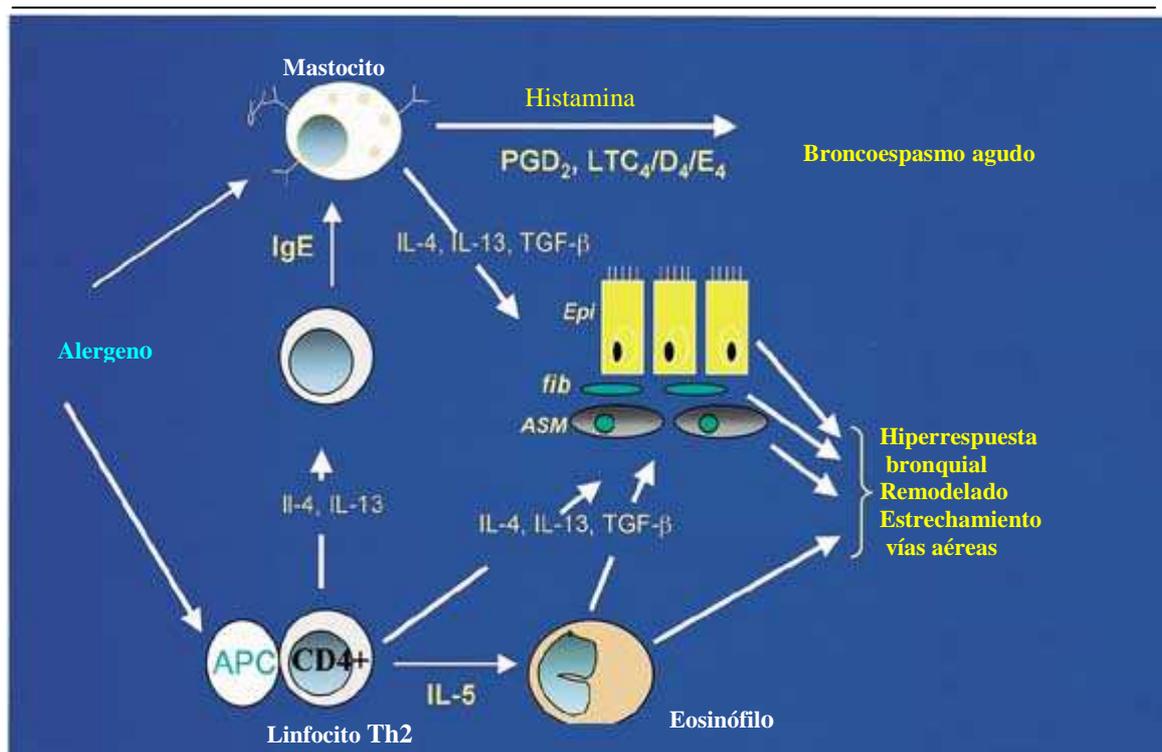


Figura 1.1. Esquema de las distintas interacciones entre mastocitos, eosinófilos, linfocitos Th2 y B, que tienen como resultado el estrechamiento y remodelación de las vías aéreas, la hiperrespuesta bronquial, y el broncoespasmo. LT: leucotrienos, Epi: células epiteliales, Fib: fibroblastos, ASM: músculo liso de vías aéreas. Modificado de Larché y col., 2003.

gración de los eosinófilos está regulada por linfocitos Th2 activados de la mucosa respiratoria, los cuales se caracterizan por elaborar las citocinas (IL-3, -4, -5, GM-CSF) que los atraen y activan. El perfil de las células inflamatorias y la expresión genética de sus citocinas es similar en las diversas formas de asma, como el asma alérgica, no alérgica, ocupacional e inducida por medicamentos. Además, este desequilibrio hacia una respuesta Th2 parece que ya está presente en los primeros meses de vida (Yabuhara, 1997). La inflamación crónica puede ser inducida o exacerbada por una nueva exposición a los alérgenos, agentes ocupacionales, polucionantes atmosféricos o infecciones respiratorias (Walker y col., 1991).

La hiperreactividad bronquial se define como la tendencia del árbol bronquial a la respuesta broncoconstrictora excesiva frente a estímulos de diversa índole (metacolina, histamina, ejercicio, hiperventilación). En los asmáticos, además de los factores mencionados, la exposición a los alérgenos a los que son sensibles puede también incrementar de manera considerable la reactividad bronquial. También se cree que la acentuada reactividad bronquial de los pacientes asmáticos está relacionada con diversas anomalías del sistema nervioso autónomo que regulan la apertura y el cierre del árbol bronquial (Undem y Carr, 2002).

1.4. Genética y asma

La participación de un componente hereditario en la respuesta alérgica del asma, ya se propuso desde los primeros estudios de Cooke y col. en 1916, quienes observaron un agrupamiento familiar de las enfermedades atópicas. Los estudios familiares y en gemelos han demostrado repetidamente una influencia genética en el desarrollo de la atopia (Blumenthal y col., 1981; Hanson y col., 1991). Sin embargo, la atopia es una enfermedad de origen genético heterogéneo, que muestra un patrón hereditario que no puede ser clasificado de mendeliano simple, puesto que no se ha encontrado un único gen causante de la enfermedad, sino que es una enfermedad con carácter poligénico, ya que se han descrito asociaciones con un conjunto de genes que parecen conferir susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Cuando la base bioquímica o fisiológica de una enfermedad genética no se conoce por completo, los métodos de identificación de genes relacionados con la enfermedad se realizan mediante dos estrategias básicas: la aproximación por genes candidatos y la búsqueda por todo el genoma.

En el caso concreto del asma y usando la estrategia basada en el estudio de genes candidatos, se han podido seleccionar algunos genes claramente implicados en el proceso asmático, como son los genes que codifican la subunidad β del receptor de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI- β), el agrupamiento de genes de citocinas del cromosoma 5 o los del sistema HLA (que se describen en apartados posteriores). En la estrategia de búsqueda por todo el genoma, se utilizan secuencias de ADN polimórficas, como los microsatélites, y mediante análisis de ligamiento se pueden identificar regiones cromosómicas que cosegregan con el fenotipo de la enfermedad. Posteriormente se puede buscar el gen relacionado con la enfermedad en la región concreta por clonación posicional o por estudio directo de los genes candidatos localizados en la zona de interés.

1.4.1. Subunidad β del receptor de alta afinidad para la IgE

La región cromosómica 11q13 fue la segunda implicada en la patogenia de la atopia, a raíz de un análisis de ligamiento en el que se utilizaron 17 marcadores genéticos distribuidos por todo el genoma (Cookson y col., 1989), insistiendo en una

hipótesis anterior de un patrón de herencia autosómica dominante para la atopia (Cookson y col., 1988). Posteriormente, se localizó el gen que codifica la cadena β del receptor de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI- β) en dicha zona (Sandford y col., 1993). Desde entonces, diversos estudios han intentado encontrar evidencias de ligamiento con varios marcadores localizados en 11q13. Mientras que en algunos estudios se han encontrado resultados positivos en varias poblaciones (Collée y col., 1993; van Herwerden y col., 1995), otras investigaciones no han podido confirmar este ligamiento (Amelung y col., 1998). Un estudio en la población española tampoco encontró ligamiento (Castro y col., 1998). Posteriores investigaciones se han centrado en un polimorfismo descrito en el exón 6 (Ile181Leu) (Shirakawa y col., 1994). Mientras que algunos estudios han asociado alguna variante con el asma (Hill y col., 1995), otros no han proporcionado evidencia de esta relación (Duffy y col., 1995; Hall y col., 1996).

1.4.2. Agrupamiento de genes de citocinas en el cromosoma 5

En la región 5q31-q33 se encuentran muchos genes relacionados con la respuesta inmunitaria en general, y con la atopia en particular. Entre ellos, se encuentran los genes de la IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12 e IL-13; además están los genes de los receptores beta-1 y beta-2 adrenérgicos; factores estimuladores de colonias (GM-CSF y CSF-1 R) y otros como el receptor de endotoxinas (CD14) y el factor liberador de interferón. El gen de la IL-4 ha sido el que más se ha estudiado, encontrándose primeramente un ligamiento con la IgE elevada (Marsh y col., 1994). También se encontró que en diversas poblaciones la IgE total elevada, la hiperreactividad bronquial y el asma, se asociaban con marcadores localizados alrededor del grupo de genes de la IL-4 y del gen del receptor beta 2 adrenérgico (Bleecker y col., 1996; Marsh, 1997). Otro grupo que investigó el polimorfismo en la región promotora de los genes de la IL-4 y de la IL-10, encontró una asociación entre un polimorfismo del promotor de la IL-4 (C590T) y títulos altos de IgE total (Rosenwasser y col., 1996). El análisis de la expresión del gen puso en evidencia una mayor transcripción de la proteína en los individuos que poseían dicha variante, coincidiendo con los datos de IgE (Rosenwasser y col., 1997). Estudios más recientes en la población europea y española, excluyen la contribución de esta variante a la regulación de los valores de IgE (Dizier y col., 1999) y señalan la falta de asociación de un marcador intrónico del gen de la IL-4 con la

enfermedad atópica por sensibilización a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Torres-Galván y col., 1999).

1.4.3. Otros genes

Aparte de los mencionados anteriormente, hay otra serie de genes que han sido investigados en relación con la susceptibilidad a enfermedades alérgicas. Así, en el cromosoma 12 ha sido motivo de interés el gen del IFN γ . Se han descrito varios estudios donde se ha encontrado un fuerte ligamiento para dos grupos de marcadores cercanos al gen del IFN γ (Marsh, 1997). El ligamiento más fuerte se observó con el marcador D12S97, en una muestra de 131 familias americanas (Holgate y col., 1997). Contrariamente a estos resultados positivos, existe otro estudio con pacientes venezolanos y australianos, donde no se hallan polimorfismos en los cuatro exones del gen del IFN γ ni en las regiones que lo flanquean, afirmando que se trata de una región extraordinariamente conservada y que muestra muy poca variabilidad (Hayden y col., 1997).

Los genes de la cadena alfa y delta del TCR se localizan en el cromosoma 14. Se han descrito asociaciones entre sensibilización a determinantes alérgicos purificados y microsatélites del gen de la cadena alfa del TCR en dos estudios familiares (Wilkinson, 1996; Cookson, 1996). Por el contrario no se han encontrado indicios de ligamiento entre los procesos alérgicos y la cadena beta del TCR cuyo gen se sitúa en el cromosoma 7.

En el cromosoma 16 se codifica la molécula alfa del receptor de la IL-4. Se ha publicado la existencia de una mutación en esta cadena que consiste en la sustitución de una glutamina por una arginina en la posición 576 (Glu576Arg) que le hace hipersensible a la IL-4, esta mutación se encuentra con mayor frecuencia en enfermos alérgicos que en controles (Moffatt y Cookson, 1996).

1.5. Incidencia del asma

En las últimas décadas se ha producido un gran incremento en la prevalencia del asma y otras enfermedades alérgicas, sobre todo en los países más industrializados y en

la población nacida después de 1960. Así, la prevalencia del asma llega a superar el 12% en países como Australia y Nueva Zelanda, mientras que se describía como del 2.1% en el caso de España (Burney, 1997). Sin embargo, otros estudios más recientes reflejan una prevalencia mayor en España, sobre un 4-5% de media. Prevalencia que varía entre las distintas comunidades, desde un 2.7% en las Islas Baleares hasta un 8.4% en Asturias, y que en la Región de Murcia es del 5.3% (Libro Blanco de la SEAIC, 1999). Algunas de las explicaciones a este fenómeno que se han propuesto lo achacan a factores contaminantes, incluyendo el humo del fumador pasivo. Sin embargo, este incremento es más acusado en países donde la calidad del aire ha mejorado, y donde la calidad de vida, condiciones sanitarias y de alimentación han progresado.

En el año 1989 el Dr. Strachan, lanzaba la "hipótesis higiénica" para explicar el aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas. Según esta hipótesis, las infecciones en los primeros meses de vida, transmitidas por contacto poco higiénico con hermanos mayores, o adquiridas prenatalmente de una madre infectada por sus hijos anteriores disminuían el riesgo de padecer enfermedades alérgicas (Strachan, 1989). Este estudio se basaba en datos epidemiológicos obtenidos por él mismo, y que demostraban que tener "fiebre del heno" se relacionaba con el número de hijos y la posición que ocupaba el niño en la familia.

Como ya se ha explicado en un apartado anterior, la respuesta alérgica es mediada por la IgE en una respuesta Th2. Durante el embarazo existe una polarización del sistema inmune hacia respuestas tipo Th2 dirigidas a proteger a la placenta de los efectos potencialmente tóxicos del IFN- γ (Raghupathy, 1997). Si cuando se entra en contacto con un alérgeno el sistema inmune está inmaduro, o sea polarizado hacia respuestas Th2 porque no hubo contacto previo con gérmenes, la probabilidad de desarrollar asma es mayor. Por el contrario, si ya hubo exposición previa a antígenos y por tanto respuestas Th1, el riesgo de asma será menor. Este planteamiento apoya la idea de que el momento de la exposición a un alérgeno sería crucial para el desarrollo de la enfermedad y, de forma teórica, la hipótesis higiénica explicaría el aumento de la prevalencia de asma en las últimas décadas.

Existen estudios posteriores avalando esta teoría y que tienen su base en evidencias epidemiológicas (Martínez y col., 1995). Uno de los casos más interesantes para estudiar esta hipótesis es el provocado por la reunificación de Alemania, donde se

ha encontrado una prevalencia más baja de asma, hiperreactividad bronquial y rinitis alérgica en niños y adultos en la Alemania del Este comparada con la del Oeste (Von Mutius y col., 1994). Curiosamente los nacidos antes de 1960 tenían un riesgo similar de enfermedades alérgicas en las dos Alemanias (Heinrich y col., 1998). Sin embargo, en otro estudio posterior ya se ha observado un aumento de la prevalencia de hiperreactividad bronquial en zonas rurales de Alemania del Este, pudiendo ser éste el primer signo de un posterior incremento de la prevalencia de asma por la "occidentalización" de la Alemania oriental (Heinrich y col., 2002).

El asma es un síndrome con varios factores genéticos y ambientales, y es posible que la higiene sea uno de los factores que contribuya a la expresión de la enfermedad.

1.6. Terapéutica del asma

En el tratamiento de los pacientes alérgicos se suelen emplear dos estrategias terapéuticas distintas. Por un lado, se utilizan inhibidores específicos que bloquean la síntesis o los efectos de los mediadores inflamatorios producidos por los mastocitos, tales como los corticoides, antihistamínicos o broncodilatadores. Mientras que también son ampliamente empleados los tratamientos de inmunoterapia, que consisten en la administración de dosis crecientes de un extracto que contenga los alérgenos a los que el enfermo es sensible, con el objetivo de cambiar la respuesta de anticuerpos IgE a una respuesta de IgG. Esta inmunoglobulina, al unirse al alérgeno, evita que éste active las vías efectoras mediadas por la IgE.

La inmunoterapia específica fue introducida para el tratamiento del asma en 1918 por el Dr. Robert A. Cooke, y su uso todavía es objeto de controversia. Aunque se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de la rinitis, los resultados no son tan concluyentes en el caso del asma (Bousquet y Michel, 1994). Además de que el tratamiento con extractos potentes conlleva el riesgo de una reacción sistémica. Como consecuencia, en algunos países como el Reino Unido, la inmunoterapia no se utiliza para el tratamiento del asma (Bousquet, 1999). Sin embargo, en nuestro entorno éste es un proceso empleado habitualmente. En la actualidad se emplean extractos estandarizados que reducen el riesgo de reacciones sistémicas, y el clonaje de varios de

los genes de alérgenos comunes ha permitido la disponibilidad de alérgenos recombinantes, que también han sido empleados en inmunoterapia (Chapman y col., 2002).

Una inmunoterapia más dirigida es la que emplea la vacunación con péptidos específicos derivados de los alérgenos. Este procedimiento induce la anergia de los linfocitos T, sin provocar reacciones anafilácticas ya que la IgE sólo reconocería el antígeno intacto. Aunque se trata de un tratamiento experimental, existen varios estudios con resultados esperanzadores (Norman y col., 1996; Texier y col., 2000). El principal problema de este tratamiento específico se encuentra en que las respuestas de cada individuo a los péptidos alérgicos están restringidas por los alelos de clase II que posee. Como consecuencia, sería necesario disponer de un amplio espectro de péptidos para tratar a toda la población alérgica, o realizar una selección de los péptidos a emplear en la vacunación en función del tipaje HLA de clase II presente en los pacientes.

Como se ha indicado en el apartado anterior, la ausencia de infecciones puede ser un factor que favorezca el desarrollo de la alergia. Estrategias que induzcan una respuesta "protectora" Th1 reducirían el riesgo de desarrollar enfermedades atópicas (Holt y col., 1999). Resultados dispares se han obtenido en ensayos de vacunación con el bacilo Calmette-Guérin (Shirakawa y col., 1997; Strannegard y col., 1998). Con el mismo objetivo se han empleado secuencias de ADN inmunoestimuladoras, como son los oligonucleótidos que poseen residuos de citosina-guanosina sin metilar (CpG ODN), que inducen potentes respuestas Th1 (van Uden y Raz, 1999). Estas secuencias son frecuentes en los microorganismos, y los vertebrados las reconocen como señales inmunoestimuladoras del sistema inmunitario innato activando las células NK, macrófagos, células dendríticas, y linfocitos T y B. Como consecuencia se desarrolla una fuerte respuesta Th1, principalmente debida a las interleuquinas 12 y 18, producidas por las células presentadoras de antígeno, y el IFN- γ secretado por las células NK. Aunque los resultados en modelos animales han sido muy prometedores, no está claro el efecto a largo plazo que pudieran tener en el tratamiento de los pacientes alérgicos, ya que una respuesta Th1 podría provocar el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Wohlleben y Erb, 2001; Horner y Raz, 2002)

Otras vías de actuación en las que existen líneas de investigación se centran en inhibir el efecto de ciertas citoquinas, como IL4, IL5 e IL13, por medio de fármacos que inhiben su síntesis, o por Ac que bloquean estas moléculas o sus receptores (Barnes, 1999). Otra estrategia en la que se han desarrollado varios ensayos es el empleo de Ac anti-IgE, como el monoclonal murino humanizado rhuMAb-E25 (omalizumab), que reduce el nivel de IgE específica y las respuestas tempranas y tardías a los alérgenos inhalados (Corne y col., 1997; Holgate y col., 1998; Busse y Neaville, 2001).

1.7. El sistema HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad, en humanos HLA (del inglés *Human Leucocyte Antigens*), es un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano y supone aproximadamente un 0.1% (1/750) del genoma humano. La función de las moléculas de MHC es unir fragmentos peptídicos derivados de los agentes patógenos y presentarlos en la superficie celular para que sean reconocidos por los linfocitos T. Aunque fueron descubiertas en los años 30 por el papel que desarrollaban en el rechazo de los trasplantes, muchos de los genes localizados en el MHC (>15%) se ha visto que tienen importantes funciones en la biología del sistema inmunitario, mientras que otros genes incluidos en el complejo no tienen ninguna función inmunológica, o si la tienen no es aún conocida.

La principal utilidad clínica del tipaje del HLA sigue siendo el papel que desarrollan estos genes en el trasplante, tanto para la selección de donantes y receptores, como para la identificación de anticuerpos anti-HLA (*crossmatch*). Sin embargo, también se emplea para la identificación de individuos en pruebas de paternidad y para el diagnóstico de enfermedades asociadas al HLA (apartado 1.7.4).

1.7.1. Estructura génica

El sistema HLA es una extensa región del genoma que se subdivide en tres subregiones: clase I, II y III, tal como se representa en la figura 1.2. Aunque clásicamente se definía como una región que constaba de 4 millones de pares de bases localizados en el brazo corto del cromosoma 6, entre 6p21.31 y 6p21.32, actualmente se

considera que la región podría constar de hasta 8 millones de pares de bases, debido a una serie de genes homólogos a clase I que se encuentran teloméricos a la región de clase I y otros genes centroméricos a la región de clase II implicados en la presentación antigénica (Rhodes y Trowsdale, 1999).

La región de clase I se encuentra más cercana al telómero, incluyendo los genes HLA de clase I clásicos definidos serológicamente: HLA-A, -B, -C, también llamados de clase Ia, junto con los genes no clásicos: HLA-E, -F, y -G, o de clase Ib.

Se conocen, al menos, 18 secuencias distintas dentro de los genes de clase I, seis de las cuales dan lugar a la cadena pesada de un gen de clase I y codifican los antígenos de clase Ia. Otros tres genes HLA-E, -F, -G codifican moléculas funcionales, y en las 12 secuencias restantes habría 4 pseudogenes de longitud completa y 8 pseudogenes truncados (Geraghty, 1993). El HLA-G se expresa en el trofoblasto y líneas celulares que proceden de tejidos de placenta, y se cree que su función puede estar asociada con la supervivencia del feto semialogénico, ya que se une a los receptores inhibidores de las células NK (LIR-1, LIR-2 y KIR2DL4) e inhibe la función citotóxica de estas células (Gonen-Gross y col., 2003). HLA-E también desempeña un papel especializado en el reconocimiento celular de NK, y puede ser capaz de presentar péptidos a un subtipo de células NK-T citotóxicas restringidas por HLA-E (Moretta y col., 2003).

Un gen HLA de clase I consta de 8 exones, que tras la transcripción y traducción dan lugar a una proteína de 340 aminoácidos. Los exones 2, 3 y 4 codifican las regiones extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente. El exón 5 codifica la región transmembrana, y los exones 6, 7 y 8 codifican la región citoplásmica. En las secuencias que codifican los aas 60 a 100 del dominio $\alpha 1$, y 150 a 200 del dominio $\alpha 2$ se concentra la mayor variación polimórfica, ya que éstas son las zonas de unión de los péptidos.

Hacia el centrómero se encuentra la región HLA de clase III, que ocupa una extensión de unos 800 kb y contiene más de 30 genes diferentes. A pesar de que las proteínas codificadas por los genes de esta región no tienen relación con la función de los antígenos de HLA clase I y II, en esta zona se encuentran genes que tienen importantes funciones dentro del sistema inmunitario, puesto que aquí están situados los genes de varios componentes del complemento (C4, C2 y factor B), los del factor de necrosis tumoral (TNF- α y - β), los de la familia de las proteínas de choque térmico

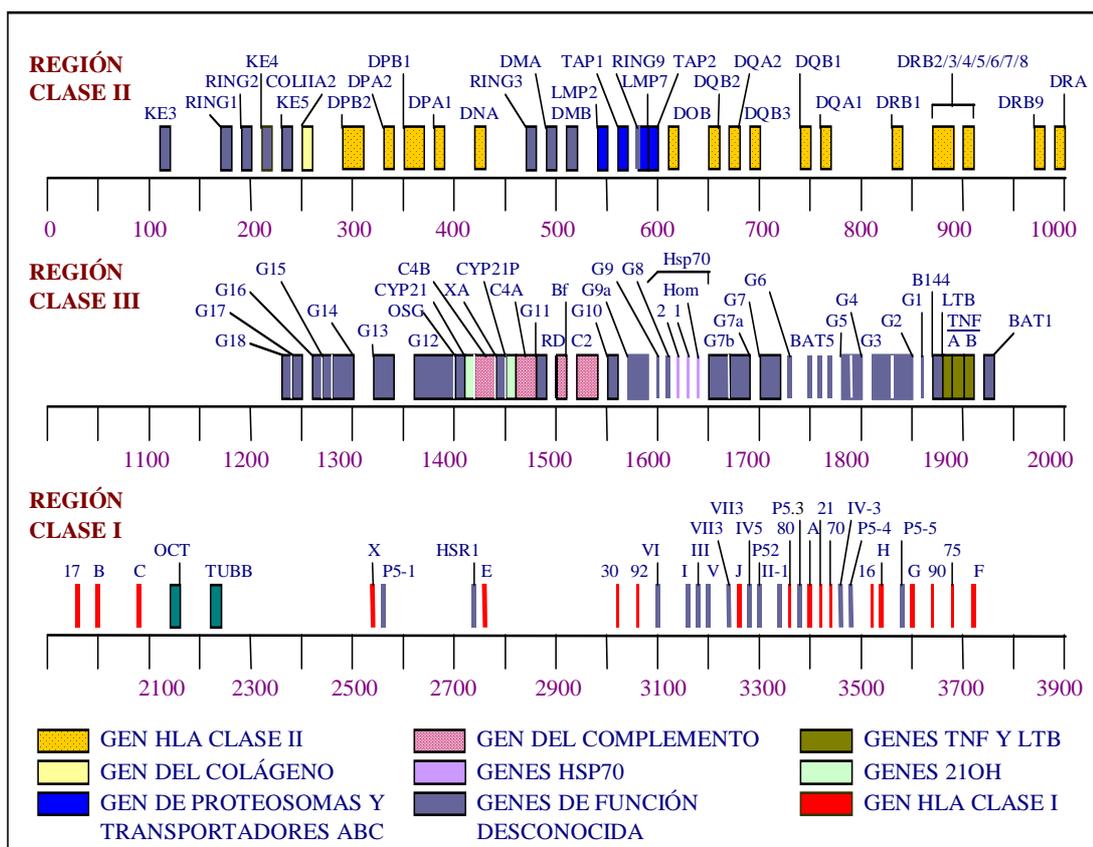


Figura 1.2. Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad.

HSP70 (*heat shock protein*; HSP70-1, -2, -HOM), y también el gen de la enzima esteroidea 21-hidroxilasa (CYP21P). Algunos de los genes presentes en esta región podrían explicar la relación existente entre el HLA y determinadas enfermedades.

La región de clase II está en posición más centromérica, abarcando aproximadamente 1 millón de pares de bases. Incluye los genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas presentadoras de antígeno de HLA clase II: HLA-DR, -DQ y -DP, junto a otra serie de genes que participan en el procesamiento y presentación de los péptidos por moléculas HLA de clase I o II, como son los genes TAP1 y TAP2, LMP2 y LMP7, y HLA-DMA y -DMB.

La subregión DR contiene un único gen para la cadena α (HLA-DRA), mientras que el número de genes de cadena β varía según la especificidad DR (HLA-DRB1-5), de modo que algunas combinaciones son específicas de haplotipo, ya que pueden ocurrir varios reordenamientos dentro de este locus (Kawai y col., 1989; Rollini y col., 1985). Hasta fechas recientes se ha considerado a la cadena α como monomórfica, aunque ya se han descrito 3 alelos. Sin embargo, es la cadena β la que determina la

especificidad DR, estando descritos más de 300 alelos. En esta subregión existen también 4 pseudogenes (HLA-DRB6-9). La subregión DP contiene 2 grupos de genes (DPA y DPB) que codifican las cadenas α y β , respectivamente. La cadena α muestra un polimorfismo limitado, en tanto que la β es altamente polimórfica y determina el antígeno DP. En los individuos heterocigotos el heterodímero α/β puede emparejarse en *cis* o en *trans*, es decir, α y β de un mismo cromosoma, o bien la cadena α de un cromosoma y la cadena β del otro, por lo que pueden formarse 4 moléculas de DP de clase II distintas. La subregión DQ es similar a la DP y también pueden formarse emparejamientos en *cis* o en *trans*.

El típico gen HLA de clase II para la cadena α consta de 5 exones. Los exones II y III codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Concentrándose el polimorfismo en el exón II (Marsh y Bodmer, 1995), que es el responsable de codificar la estructura de unión al péptido antigénico. La estructura del gen de la cadena β es muy similar, excepto para el dominio citoplásmico que contiene 2 ó 3 exones codificantes.

1.7.2. Estructura y función de las moléculas HLA

La función principal de las moléculas codificadas por el MHC es la de facilitar la exposición de péptidos en la superficie de las células para permitir su reconocimiento de efectores inmunes como los linfocitos T por medio del TCR. Mientras las moléculas de clase I se encuentran en la membrana de todas las células nucleadas, las de clase II tienen una distribución más limitada al sistema inmunitario (linfocitos B, APC, linfocitos T activados, etc.), aunque en ciertas condiciones pueden expresarse en más tejidos.

1.7.2.1. Estructura de las moléculas HLA de clase I

Las moléculas HLA de clase I son glucoproteínas de membrana que constan de una cadena pesada α de 45 kDa (340 aas) que se une mediante enlaces no covalentes a la β_2 -microglobulina, que es una cadena ligera no polimórfica de 12 kDa (100 aas). Esta cadena ligera posee una estructura de dominio de Igs, siendo codificada en el

cromosoma 15. Se mantiene unida a la cadena pesada por interacciones con los tres dominios de la cadena α y su función es la de estabilizar todo el conjunto propiciando que la molécula de clase I adquiera la estructura terciaria adecuada (figura 1.3).

La región extracelular de la cadena α tiene cerca de 300 aas, la porción transmembrana posee 25 aas, y la región citoplásmica con el extremo carboxilo terminal tiene unos 30 aas. La porción extracelular de la cadena pesada consta de 3 dominios de igual longitud, denominados $\alpha 1$ (1-90), $\alpha 2$ (91-182) y $\alpha 3$ (183-274), siendo las regiones más distales, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, las que tienen restos de carbohidratos. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ están orientados de manera que interactúan uno con otro y forman una hendidura o bolsillo limitado por 2 regiones en α -hélice, que formarían las paredes, y 8 segmentos en conformación de hoja plegada β , que correspondería al suelo de la hendidura, formando un plano sostenido por el tercer dominio $\alpha 3$, a su vez unidos a la $\beta 2$ -microglobulina. Este dominio $\alpha 3$ tiene un plegamiento del tipo de dominio de Igs y es la fracción de unión al receptor CD8 del linfocito T. El dominio $\alpha 3$ es menos polimórfico que los otros dos dominios, donde se localizan las regiones hipervariables (Arnett y col., 1995). Los péptidos que se pueden unir a las proteínas de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 aas. Normalmente, el bolsillo está ocupado por un péptido propio, que posteriormente es desplazado por el péptido antigénico extraño. De hecho, es necesario que el bolsillo esté ocupado con un péptido para que se produzca el ensamblaje correcto de las moléculas de clase I. Cada molécula HLA es capaz de presentar a los linfocitos T un elevado número de péptidos endógenos diferentes. La forma y la distribución de carga en el bolsillo define que grupo de péptidos pueden ser presentados. Al secuenciar este grupo de péptidos, se ha visto que pueden ser presentados los que tienen posiciones de anclaje definidas por una variación limitada de aas dentro del péptido. La mayoría de los péptidos presentados por las moléculas de clase I se generan por la actividad proteolítica de las proteínas relacionadas con el procesamiento y transporte de péptidos en el citosol: LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2. Aunque también existen datos que apuntan la posibilidad de que péptidos de origen exógeno sean presentados por HLA de clase I mediante dos vías, citoplásmica y no citoplásmica (Raychaudhuri y col., 1993).

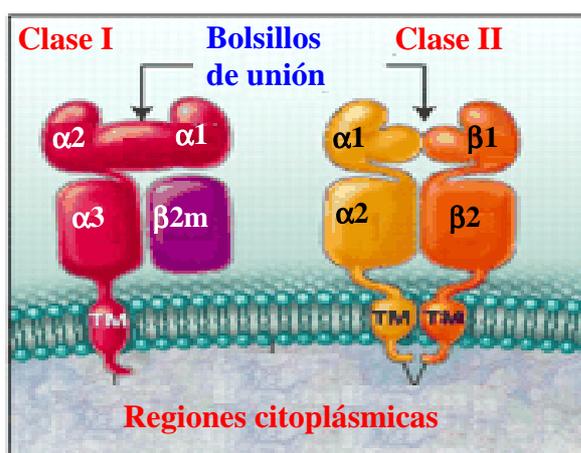


Figura 1.3. Estructura de las moléculas HLA clase I y II. TM: Región transmembrana. Modificado de Rhodes y Trowsdale, 1999.

1.7.2.2. Estructura de las moléculas HLA de clase II

La estructura terciaria de las moléculas de clase II es similar a la de clase I, aunque está compuesta por 2 cadenas polipeptídicas glucosiladas unidas no covalentemente con estructura de tetrámero en la membrana (figura 1.3). La cadena α tiene un peso molecular de 31 a 34 kDa, y la β de 26 a 29 kDa. Cada cadena está formada por 4 dominios, uno aminoterminal y distal a la membrana celular ($\alpha 1$ y $\beta 1$) de 90 aas que forma la estructura de unión al péptido, uno proximal ($\alpha 2$ y $\beta 2$) de 95 aas, homólogos a las regiones constantes de las inmunoglobulinas, un péptido conector (12 aas), una región transmembranal de 23 aas, y una pequeña región intracitoplasmática de 8-15 aas. Las distintas cadenas α contienen 2 sustituciones de hidratos de carbono, mientras que las cadenas β sólo presentan una ramificación de oligosacáridos (Brown y col., 1988; Schwartz, 1991).

La estructura terciaria de la molécula de clase II ha sido estudiada por cristalografía de rayos X en distintas moléculas de DR (Sakihama y col., 1995; Dessen y col., 1997; Murthy y col., 1997). Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ se repliegan para formar 8 filamentos en conformación hoja plegada β , que soportan 2 α -hélices. Las α -hélices y las hojas plegadas β forman las paredes y el suelo del bolsillo de unión al péptido. Los residuos polimórficos se concentran en las regiones terminales de los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\beta 1$. El polimorfismo genético de las moléculas de clase II determina

la superficie química del bolsillo, siendo el responsable principal de la especificidad y afinidad de la unión del péptido y el reconocimiento celular. Cada molécula de clase II es capaz de presentar un elevado número de péptidos diferentes, de una longitud de entre 13 y 17 aas. El conjunto del complejo HLA de clase II-péptido es reconocido por los linfocitos CD4, donde el péptido suele ser de origen exógeno en contraste al carácter endógeno de los de clase I.

1.7.3. Polimorfismo

Los genes de HLA de clase I y II implicados en la presentación antigénica son altamente polimórficos y existen cientos de alelos presentes en las distintas poblaciones. Este polimorfismo se concentra en los dominios $\alpha 1$ y 2 de las moléculas de clase I, y $\alpha 1$ y $\beta 1$ de las moléculas de clase II. Ya que son estos dominios donde se forma el bolsillo de unión de los péptidos, permitiendo que las diferentes versiones alélicas de estas moléculas se unan a un variado conjunto de péptidos. Debido a este gran polimorfismo la heterocigosidad es de un 90% y la mayoría de los alelos tienen una frecuencia menor de 0.15, estando descritos en la actualidad más 490 alelos para HLA-B, 250 para HLA-A, 119 para HLA-C, 315 para HLA-DRB1, 53 para HLA-DQB1 y 99 para HLA-DPB1 (Marsh y col., 2002).

La mayoría de los genes polimórficos codifican proteínas que varían sólo en uno o unos pocos aas. En el caso de las proteínas del MHC estas variaciones pueden llegar a ser de hasta 20 aas. Este polimorfismo se ha originado tanto por mutaciones puntuales, como por recombinación de secuencias de diferentes alelos, y por conversión génica en la que una secuencia es reemplazada en parte por otra de un gen homólogo. La hipótesis más aceptada para explicar el origen y conservación de este polimorfismo se basa en la ventaja selectiva que permitiría sortear las estrategias evasivas de los agentes patógenos. Así, se supone que poseer una amplia gama de moléculas presentadoras ampliaría las posibilidades de unión y presentación de una gran variedad de antígenos derivados de patógenos, al contrario de lo que ocurriría con un polimorfismo más limitado que podría hacer susceptible a toda la población a cambios en un agente infeccioso a los que no pudieran responder.

Estudios familiares demuestran que la recombinación en esta región es rara (<1%), concentrándose en algunos puntos del genoma denominados puntos calientes (*hot spots*), como la zona TAP/LMP. En cambio, existe una notable ausencia de recombinación en la región DR/DQ para la cual no hay una clara explicación (Cullen y col., 1995). Así, un conjunto completo de alelos se heredan habitualmente como una unidad, denominada haplotipo. Ciertas combinaciones de alelos se heredan juntos más frecuentemente de lo esperado por el azar según el equilibrio de Hardy-Weinberg. Este es el caso del haplotipo HLA A30-B18-DR3 que tiene una frecuencia en la población murciana de 0.035, mientras que el valor esperado en la combinación de dichos antígenos al azar sería mucho menor, de únicamente 0.001 (Muro y col., 2001). Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento, y depende de la población estudiada. El desequilibrio puede ser consecuencia de la selección natural a favor o en contra de una combinación génica específica, o puede ser que la población no haya alcanzado aún su equilibrio. También se ha sugerido que estas relaciones estables entre los alelos representan haplotipos ancestrales (Arnaiz y col., 1997).

1.7.4. Asociación con enfermedad

Además del control de la respuesta inmunitaria en la aceptación de los trasplantes, se sabe que el sistema HLA participa en la etiología de muchas enfermedades, especialmente enfermedades autoinmunes aunque también existen asociaciones con enfermedades de etiología no inmunológica (Nepom y col., 1991; Thorsby, 1997). En la tabla 1.1 se recogen las asociaciones más significativas encontradas.

Alguna de las asociaciones se cree que pueden deberse a que la patología esté directamente relacionada con los productos de alelos particulares dentro de este complejo, como ocurre en las deficiencias del complemento, la hiperplasia adrenal congénita con el gen de la 21-hidroxilasa, y también en los defectos de las proteínas TAP y el transactivador de clase II (CIITA), que provocan el síndrome del linfocito desnudo al no expresarse en membrana las moléculas de clase I y II, respectivamente (Raghavan 1999; DeSandro y col., 1999).

Otras asociaciones son el resultado de un desequilibrio de ligamiento entre el marcador HLA y un loci dentro de la región. Esto ha ocurrido en el caso de la narcolepsia, donde la mutación del gen HCRTR2 que causa la enfermedad se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los alelos HLA-DQB1*0602 y DQA1*0102 (Li y col., 1999). De forma similar en la hemocromatosis, una de las mutaciones del gen HFE provoca el defecto de la proteína se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el alelo HLA-A3, al que fue primeramente asociada esta enfermedad (Ajioka y col., 1997).

La mayoría de las asociaciones descritas se refieren a enfermedades autoinmunes. El mecanismo que subyace en estas asociaciones no se conoce exactamente, aunque se han propuesto algunos modelos, incluyendo anticuerpos frente a microorganismos que presentarían reacciones cruzadas con ciertas moléculas HLA (Baines y col., 1992), y el mimetismo molecular de la respuesta T a antígenos virales con autoantígenos (Wucherpfennig y col., 1995).

En algunos casos, la asociación de ciertos antígenos con la enfermedad es tan grande que el tipaje HLA puede confirmar el diagnóstico de la sospecha de la enfermedad, como ocurre con la narcolepsia y los alelos HLA-DR2, -DQB1*0602, o la espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27.

Tabla 1.1. Asociaciones descritas entre la presencia de varios alelos HLA y enfermedades autoinmunes (modificado de Klein y Sato, 2000).

Enfermedad	Marcador HLA	RR
Espondilitis anquilosante	B27	87.4
Artropatía reactiva	B27	37.0
Artritis reumatoide	DR4	4.2
Síndrome de Behçet	B51	3.8
Lupus eritematoso	DR3	5.5
Diabetes mellitus tipo 1	DR3	3.3
	DQB1*0201	2.4
	DR4	6.4
	DQB1*0302	9.5
	DR2	0.19
	(DRB1*1501/DQB1*0602)	
Enfermedad de Addison idiopática	DR3	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	3.7
Enfermedad de Hashimoto	DR11	3.2
Tiroiditis post-parto	DR4	5.3
Enfermedad celiaca	DQB1*0201/DQA1*0501	10.8
	DR7,11	6.0-10.0
	DR7, DQB1*0201	
	DR11, DQA1*0501	
Dermatitis herpetiforme	DR3	15.9
Miastemia gravis	DR3	2.5
	B8	3.4
Síndrome de Goodpasture	DR2	15.9
Esclerosis múltiple	DR2	4.1
	(DRB*1501/DQB1*0602)	
Pénfigo vulgar (en judíos Ashkenazi)	DR4	14.4
Psoriasis vulgaris	Cw6	13.3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En la práctica y desde el punto de vista clínico los signos y síntomas del asma atópico (extrínseco) y no atópico (intrínseco) son muy similares, pero mientras la causa del primero está relacionada con la sensibilización y respuesta IgE, se desconocen los mecanismos implicados en la etiopatogenia del asma intrínseco. Dado que se han descrito ciertas asociaciones entre el asma atópico y el sistema MHC, y puesto que las infecciones son una causa frecuente del agravamiento de la enfermedad, puede pensarse que las moléculas que codifica dicho sistema puedan estar también de algún modo asociado al desarrollo del asma no atópico. Es posible incluso que si existe alguna relación permita diferenciar ambas formas de la enfermedad.

Bajo esta hipótesis, el presente estudio se planteó con el objetivo general de encontrar algún factor genético que permita diferenciar entre estas dos entidades clínicas, y con los siguientes objetivos concretos:

1. Definir las frecuencias de antígenos HLA, clase I y clase II, en una muestra representativa de pacientes con asma alérgico y no alérgico de la Región de Murcia, y determinar si existe algún alelo asociado con la susceptibilidad o protección relacionado con una u otra forma de asma.
2. Estudiar la relación entre los alelos de clase II y las respuestas individuales de los pacientes con asma alérgico definidas por las pruebas cutáneas.
3. Analizar la capacidad de los posibles alelos que puedan aparecer asociados con la respuesta *in vivo* a alérgenos concretos, para mediar en la respuesta humoral y celular de individuos portadores o no de un alelo o haplotipo particular.

CAPÍTULO 2

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS HLA DE CLASE I Y II EN PACIENTES CON ASMA INTRÍNSECO Y EXTRÍNSECO

2.1. Introducción

El sistema HLA se ha asociado como factor de predisposición o protección a diversas enfermedades, tal como se ha reflejado en el capítulo anterior. En el caso del asma, aunque su relación con el sistema HLA es objeto de estudio desde hace más de treinta años, el papel que desarrollan este grupo de genes en relación con esta enfermedad permanece controvertido.

Los primeros trabajos en este sentido aparecen en la década de los 70. En uno de ellos realizado en el año 1972, ya se indicaba el efecto de los antígenos HLA clase I en la alergia a *Ambrosia artemisiifolia* (Levine y col., 1972). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos que han estudiado la relación entre los antígenos HLA y el asma extrínseco o intrínseco. Sin embargo, pocos estudios han logrado demostrar una asociación directa entre algún tipo de asma y los antígenos HLA. Algunas de las asociaciones significativas que se han descrito son: la asociación del asma extrínseco con el antígeno B8 (Hafez y col., 1984), o con el antígeno Bw61 en una población del noreste de China (Wang y col., 1988), o la disminución estadísticamente significativa de los antígenos B5 y B35 en una población de pacientes asmáticos griegos (Apostolakis y col., 1996). No obstante, hay una serie de estudios que contradicen estos resultados, pues a pesar de que encuentran diferencias en las frecuencias de los distintos antígenos, no alcanzan significación estadística (Turton y col., 1979; Brady y col., 1981; Amelung y col., 1992). La mayoría de estudios que han descrito asociaciones significativas entre el asma extrínseco y los antígenos HLA se refieren a respuestas antígeno específicas (Howell y Holgate, 1995). Uno de los trabajos más interesantes a este respecto, es el realizado por Blumenthal en pacientes alérgicos al polen de *Ambrosia artemisiifolia* (Blumenthal y col., 1992). En dicho estudio la presencia de determinados antígenos HLA se asocia con distintas manifestaciones alérgicas. De modo que el haplotipo B8-C4A*0-C4B*1-DR3 se asocia con los pacientes que padecen

asma, mientras que el haplotipo B7-C4A*3-C4B*1-DR2 se encuentra asociado a la presencia de rinitis sin que exista asma.

En el asma intrínseco, donde el factor desencadenante aparentemente no está relacionado con la presencia de alérgenos y las infecciones son la mayor causa de un agravamiento en la enfermedad (Pattemore y col., 1992; Wang y Forsyth, 1998), existe la posibilidad de que el repertorio de moléculas HLA del paciente sean en parte responsables del ataque o defensa por agentes infecciosos concretos y que por tanto jueguen un papel importante en el desarrollo del asma. De hecho, algo similar es lo que ocurre en algunas enfermedades infecciosas como la malaria y la lepra, donde ciertos alelos HLA se encuentran asociados con el desarrollo de la enfermedad o bien ejercen un efecto protector (Minayaga y col., 1981; Hill y col., 1991). En los primeros estudios desarrollados se sugería una asociación del asma intrínseco con el antígeno público Bw6 (Brostoff y col., 1976; Rachelefsky y col., 1976). Sin embargo, en otros estudios posteriores los resultados eran opuestos, ya que encuentran una disminución del antígeno Bw6 en los asmáticos intrínsecos (Hafez y col., 1984). Por otra parte, existen otros estudios donde no se encontraron asociaciones significativas (Morris y col., 1980; Caraballo y col., 1990).

Hay que tener en cuenta que en la mayoría de estos estudios no se consideraba el papel que pudieran tener los antígenos del locus HLA-C, sin que tampoco se determinaran muchos de los "splits" existentes en los antígenos de los loci HLA-A y -B. Además, no siempre se empleaban técnicas de biología molecular para tipar los alelos de clase II. El propósito de nuestro trabajo fue estudiar las frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA de clase I (A, B y C), y determinar las frecuencias genotípicas de los alelos de clase II (DR y DQ) en una población de enfermos asmáticos de la Región de Murcia, para comprobar si existía algún antígeno asociado a estos tipos de asma.

2.2. Pacientes y grupos de estudio

Para el estudio de los antígenos HLA clase I y II se seleccionaron dos grupos de pacientes y un grupo de controles sanos, tal como se describe a continuación.

2.2.1. Grupo asma extrínseco o alérgico

Todos los pacientes asmáticos fueron seleccionados considerando la definición de la *American Thoracic Society* (American Thoracic Society, 1987), según sus síntomas clínicos, tales como historia de tos seca, disnea y/o sibilancias. El examen físico y las pruebas de función pulmonar demostraban una espirometría normal o con alteración ventilatoria obstructiva, reversible por encima del 20% tras la administración de β -agonistas en aerosol.

Este grupo de pacientes asmáticos atópicos estaba constituido por un total de 102 pacientes (55 mujeres y 47 hombres), con una media de edad de 23 años. Todos los pacientes tenían historia clínica sugestiva de asma bronquial con crisis de respuesta broncoconstrictiva después de exposición a alérgenos y una o más pruebas cutáneas positivas a los alérgenos comunes en nuestra región.

2.2.2. Grupo asma intrínseco o no alérgico

Constituido por un grupo de 87 pacientes (61 mujeres y 26 hombres), con una media de edad de 44 años. Este grupo de pacientes desarrollaba síntomas después de infecciones del tracto respiratorio, pero sin historia de broncoespasmos inducidos por alérgenos, ni de atopia familiar y pruebas cutáneas negativas a los alérgenos comunes en la Región de Murcia.

2.2.3. Grupo control

Un total de 150 donantes sanos de la misma región, sin historia de asma o atopia (83 mujeres y 67 hombres), con una media de edad de 49 años, fueron usados como grupo control.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Pruebas cutáneas

Se ha empleado la prueba cutánea de la punción (SPT) modificada por Pepys (Pepys, 1975). La prueba se realiza colocando una pequeña gota de cada extracto

alergénico y de soluciones control sobre la superficie volar del antebrazo. Las gotas se depositan con una separación de dos cm entre sí. Luego se hace pasar una lanceta a través de la gota y se inserta en la superficie epidérmica y se eleva suavemente la punta de la lanceta para levantar una pequeña porción de epidermis sin provocar hemorragia. Posteriormente, se retira la lanceta y la solución en exceso se absorbe suavemente con un pañuelo de papel. Para cada prueba se utiliza una lanceta diferente con el fin de no mezclar los extractos. Este método permite introducir 3×10^{-6} mL de cada solución de prueba en la epidermis.

La batería de alérgenos estaba compuesta por los más representativos en la región:

- *Dermatophagoides pteronyssinus*
- *Dermatophagoides farinae*
- *Alternaria alternata*
- *Cladosporium herbarum*
- *Penicillium notatum*
- *Aspergillus fumigatus*
- *Mucor racemosus*
- Polen de *Phleum pratense*
- Polen de *Cynodon dactylon*
- Polen de *Platanus hybrida*
- Polen de *Olea europaea*
- Polen de *Parietaria judaica*
- Polen de *Artemisia vulgaris*
- Polen de *Salsola kali*
- Polen de *Plantago lanceolata*
- Epitelio de perro
- Epitelio de gato
- Epitelio de conejo

Estos extractos fueron suministrados por Dome Hollister Stier (Warwickshire, UK). Como control negativo se empleó suero fisiológico y como control positivo una

solución de histamina a 10 mg/mL (Dome Hollister). La lectura de la prueba se realizó a los 20 minutos, considerando como positivas aquellas pruebas con tamaño igual o superior a las producidas con la solución de control positivo.

2.3.2. Tipificación HLA de clase I

El procedimiento utilizado se basa en la citólisis mediada por anticuerpos específicos que se produce en presencia de complemento (Terasaki y col. 1974). Para la tipificación, en los micropozos de una placa de Terasaki se colocan múltiples antisueros que reaccionan frente a la mayoría de antígenos HLA conocidos. Sobre las placas de Terasaki se depositan los linfocitos del individuo a tipificar, separados por un gradiente de centrifugación. Los antisueros que contienen anticuerpos que reconocen diferentes especificidades HLA, se van a unir a los antígenos correspondientes presentes en la membrana de dichas células, formando complejos antígeno-anticuerpo capaces de fijar el complemento, de modo que después de la incubación con complemento se lisarán dichas células. Finalmente, se agrega un colorante vital que tiñe las células lisadas por el antisuero y complemento, mientras que el colorante no penetra en las células vivas permaneciendo sin teñir. En el microscopio de contraste de fases se determina el porcentaje de células lisadas por cada antisuero y se puede así asignar el fenotipo correspondiente sobre la base de los patrones de reacción.

3.2.1. Materiales y reactivos empleados en el tipaje HLA de clase I

Bolitas de cristal (Brand, Alemania) para desfibrinar la sangre.

Placas de Terasaki de 60 pocillos (Costar, USA).

Suero salino fisiológico estéril (Laboratorios Grifols SA, Barcelona).

Medio de separación de células mononucleares Lymphoprep (Nicomed Pharma, Oslo, Noruega).

Azul tripán al 0.5% (Sigma, St Louis, USA) en solución salina para comprobar la concentración y la viabilidad celular.

Antisueros de diversas especificidades procedentes tanto de nuestro laboratorio, como de intercambio con los laboratorios de histocompatibilidad participantes en los Talleres nacionales, junto a sueros comercializados por las empresas reseñadas en la tabla 2.1.

Complemento de conejo (Diagnóstica Longwood, Zaragoza).

Eosina Amarilla al 5% (Merck, Darmstadt, Alemania).

Formaldehído 35-40% (Merck), ajustado a pH 7.2.

2.3.2.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica utilizadas para el tipaje serológico HLA y los distintos cultivos realizados *in vitro* se separaron siguiendo la técnica descrita por Boyüm (Boyüm, 1968). Tras su extracción la sangre se desfibrina con bolitas de cristal (1 bolita por cada mL de sangre), se diluye a la mitad con suero salino fisiológico y se deposita sobre el medio de separación Lymphoprep evitando romper la interfase. Las muestras se centrifugan durante 25 minutos a 600xg, y el anillo de células mononucleares formado en la interfase se recupera por aspiración. Esta suspensión celular se lava 3 veces por adición de suero fisiológico y centrifugación a 400xg durante 5 minutos para garantizar la eliminación de restos del medio de separación. Las células obtenidas se resuspenden rutinariamente en suero salino y la concentración adecuada se ajusta después de proceder al recuento y la comprobación de la viabilidad con azul tripán en cámara Neubauer (Supe-Rior, Alemania).

2.3.2.3. Ensayo de microlinfocitotoxicidad

En nuestro estudio se utilizaron 3 placas de Terasaki preparadas con los antisueros descritos en la tabla 2.1, que permitían determinar 16 especificidades de HLA-A, 29 de HLA-B y 8 de HLA-C. Una vez ajustada la suspensión celular a 3 mill/mL y con una viabilidad superior al 95% para asegurarse una correcta interpretación de los resultados, se dispensa con la jeringa individual 1 μ L de la suspensión de células en cada pocillo de la placa de Terasaki correspondiente, incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante este periodo de incu-

Tabla 2.1. Antiseros utilizados en la determinación de especificidades HLA de clase I (locus HLA-A, -B, -C) por microlinfocitotoxicidad.

Especificidad	Antiseros empleados	Especificidad	Antiseros empleados
A1	Mur 130A, Ma-Bi837, Sant 7428	B51(5)	Mur 423A, Ctm 8
A2	Mur 889A, Ctm 22, Mal 815	B52(5)	BI 151, BI 152
A3	Mur 568, Fre 8932, Bio 112046	B53	PF1070, MaBo904, Bio14734
A9	Bio 130822	B7	Ctm 7, Mur 836A
A23 (9)	Ctcv 296, Cultek 293	B8	Mur 826A, Fgr 568
A24 (9)	Mur 10A, Mur 527A	B44	Hryc 131, Mur 864
A10	PF 2464	B45	PF 458AA, I.Ana 251-1
A25 (10)	Fre 8926, Mur 446A, Mal 803	B13	Fre 7750, Ctm 3
A26 (10)	PF 066AA, Mur 246A, Bio 2001	B14	Mur537A, Mur913, Mur127A
A34 (10)	Cultek 258, PF 366A, PF 442A	B15	Fre 8912, Cultek 356
A66 (10)	PF 769, Cultek 296, Bio 2001	B62 (15)	Mur 635A, Bh 26202H
A11	Mur 232, Mur 441A	B63 (15)	I. Ana 402-2, PF 960A
A28	Fre 3001, PF 1045	B16	Fre 8709
A29	Ctcv 306, Ctm 51	B38 (16)	Mal 803, DL 3035
A30	Mur 564A, Cjc 90/4,Sant 7193	B39 (16)	I.Ana 703-1, Mur 966
A31	Sant 7193, I.Ana 448-2, PF 1047	B17	Alf.D 250-1
A32	Mur Belmonte, Fre 9009	B57 (17)	Mur 441A, Mur 752A
A33	DL 225, I.Ana 745-2, I.Ana 737-5	B58 (17)	Mal 806, Mur 576A
Cw1	Cultek 363, Bio 292	B18	Mur 825A, Mur 471
Cw2	Cultek 242, I.Ana 245-1	B49	Ma-Bj865, PF 983
Cw3	PF 775, Bio 122559	B50	PF 980, Pri 256
Cw4	Bh 25403R, Cultek 937	B55	Mal 815, PF 967, I.Ana 445-1
Cw5	Cultek 291, Bio 2181	B56	Fre 8997, PF 387AA
Cw6	PF 508A, Fre 8759	B27	Bio 112011, Mur 540
Cw7	Alf.D 405-1, PF 035AA	B35	Mur 332A, Mur 131A
Cw8	Cornet, Alf. D 427-1	B37	Fre 4220, PF 28XF
Control +	Mur 648A, Mur Concepción	B40	Cultek 277
Control -	Suero AB	B60 (40)	Cultek 337, I.Ana 721-1
Bw4	Mur 551A, Ctm 5	B61 (40)	Cjc 277, Mur 171A
Bw6	Mur 653A, Bio 1001	B41	PF 995, Cultek 184
		B42	Bio 665, I.Ana 460-1
		B48	PF 1061, I.Ana 419-1
		B73	Bio 637, PF 862

Antiseros generados en nuestro laboratorio (Mur) y procedentes de intercambio con otros laboratorios:

BI: Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya; Cjc: Hospital Juan Canalejo, A Coruña; Ctcv: Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, Valencia; Ctm: Centro de Transfusiones de Madrid; Fgr: Hospital Virgen de las Nieves, Granada; Hryc: Hospital Ramón y Cajal, Madrid; Ma- y Mal: Hospital Carlos Haya, Málaga; Pri: Hospital Doce de Octubre, Madrid; Sant: Hospital Marqués de Valdecilla, Santander.

Casa comerciales proveedoras de antiseros:

Alf.D: Alfa diagnóstica (USA); Bh: Hoechst Ibérica, Barcelona; Bio: Biotest, Dreieich (Alemania); Cornet y suero AB: Sigma; Cultek: Madrid; DL: Diagnóstica Longwood, Zaragoza; Fre: Fresenius, Bad Homburg (Alemania); I.Ana: Inmuno Analyzer, Madrid; PF: Pel Freeze, Brown Deer (USA).

bación, se realiza la preparación del complemento de conejo según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se añaden 5 μL de complemento de conejo en cada pocillo con una jeringa multicanal, con el que se incuban durante 1 h. A continuación, se añaden 3 μL de eosina al 5% en cada pocillo, se aguarda 5 minutos y se añaden 9 μL de formaldehído al 30% pH 7.2. Se mantienen un mínimo de 1 h para dejar que las células se depositen en el fondo del pocillo, y se leen en un microscopio de contraste de fases. En el microscopio, al teñir con eosina, las células vivas aparecen pequeñas, brillantes y refringentes, mientras que las células muertas aparecen de mayor tamaño y de color rojo debido a que la eosina penetra en ellas.

2.3.3. Tipificación HLA de clase II

Para la realización del tipaje HLA de clase II se han empleado técnicas de biología molecular, que permiten una mayor resolución y especificidad que las técnicas serológicas. Primeramente se debe realizar la extracción del ADN de las muestras a analizar, para después amplificarlo por medio de una reacción de PCR. A partir de este punto se pueden emplear diversas estrategias de tipaje, como son la incubación con endonucleasas de restricción (polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción o RFLP), la detección con sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (SSOP) y la amplificación con cebadores específicos de secuencia (SSP). En nuestro caso se empleó preferentemente la técnica de PCR-SSOP desarrollada en nuestro laboratorio.

2.3.3.1. Reactivos para la extracción del ADN

Proteinasa K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

Tampón de lisis con 0.32M sacarosa (Merck), Tris-HCl 10mM (Sigma) pH 7.5, MgCl 5mM (Merck), Triton X100 1% (Merck).

Tampón de PCR w/o iónico con 50mM KCl (Sigma), 10mM Tris-HCl (Sigma) pH 8.3, 2.5mM MgCl₂ (Merck), 0.1 mg/mL gelatina (Merk), 0.45% Tween-20 (Sigma), 0.45% NP-40 (Fluka, Buchs, Suiza).

2.3.3.2. Reactivos utilizados en PCR-SSOP

A. Amplificación

Cebadores o primers específicos para amplificar el exón 2 de los genes DRB1 y DQB1, cuya secuencia se muestran en la tabla 2.2. La secuencia de los mismos fueron recogidas de publicaciones anteriores (Mach y col., 1991; Mehra y col., 1991), añadiendo SSOs del 11° y 12° Talleres Internacionales de Histocompatibilidad (Sasazuki y Kimura, 1992; Fernandez-Viña y Bignon, 1996), siendo fabricados por Amershan Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) y la DNAgency (Philadelphia, USA).

Tampón de PCR 10X (Boehringer Mannheim), suministrado por el proveedor de la ADN polimerasa junto con ésta.

Solución de dNTPs (Amershan Pharmacia Biotech) con 100mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP.

Taq ADN polimerasa a 5U/μL (Boehringer Mannheim).

Tubos de 0.2 mL y tapones (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), empleados como soporte de la amplificación en el termociclador.

Tabla 2.2. Cebadores utilizados para la amplificación del exón 2 de DRB1 y de DQB1.

Identificación del cebador	Secuencia de ADN 5' → 3'
2DRBAMP-A	CCCCACAGCACGTTTCTTG
2DRBAMP-B	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT
2DQBAMP-A	CATGTGCTAACTTCACCAACGG
2DQBAMP-B	CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC

B. Visualización de los amplificados

Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma), utilizada para la realización de los geles.

Marcador de peso molecular de ADN ØX174 digerido por HaeIII (Sigma) resuspendido en solución de azul de bromofenol a una concentración de 1 μg/μL.

Solución de azul de bromofenol, empleado para teñir los amplificadores y realizar la carga en los geles de agarosa, con azul de bromofenol al 0.25% (Sigma), 0.25% de Xilenocianol (Sigma) y 30% de glicerol (Merck).

Solución de bromuro de etidio (Sigma) a concentración de 500 µg/mL, utilizado para la detección de los amplificadores de PCR en geles de agarosa.

Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X, con Trizma base 44.5mM (Sigma), ácido bórico 49.5mM (Merck) y EDTA 1mM (Sigma), empleado como tampón de electroforesis.

C. Desnaturalización y transferencia a membrana de nylon

Membranas de nylon cargadas positivamente (GeneScreen Plus, DuPont, Boston, USA).

Papel Whatman (3MMChr, Maidstone, UK).

Solución de desnaturalización de los amplificadores, con NaOH 0.4N (Sigma), EDTA 25mM (Sigma).

Tampón TE con Tris-HCl 10mM (Sigma) pH 7.6, EDTA 1 mM (Sigma) pH 8.

D. Marcaje de las sondas

Etanol (Merck).

Kit de marcaje de oligonucleótidos (DIG oligonucleotide 3' Labeling kit, Boehringer Mannheim), que incluye las soluciones de CoCl₂, glicógeno, digoxigenina-11-ddUTP, tailing buffer y la enzima transferasa terminal.

Solución de precipitación con CILi 4M (Merck).

Solución EDTA 0.5M (Sigma) pH 8.

Sondas SSO utilizadas para analizar el polimorfismo genético de los loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1, recogidas en la tabla 2.3. El origen de las secuencias y su fabricación son los mismos que los reflejados anteriormente para los cebadores.

Tabla 2.3. Secuencia nucleotídica de las sondas utilizadas para la tipificación de HLA-DRB1 y -DQB1, y las especificidades identificadas.

Oligo	Secuencia de ADN de 5' a 3'	Especificidades
L11	TTCAAACCTTAAGCTGCCAC	DR1
N77	TCTGCAGTAGTTGTCCACC	DR3
H33	CTCTTGGTGATAGAAGTATC	DR4
G11	CTTATACTTACCCTGCCAC	DR7
L74	GTGTCCACCAGGGCCCGCC	DR8
Y26	CTGTGCAGATACCGCACCC	DR9
V11	CTCAAACCTTAACCTCCTCC	DR10
E58	CCAGTACTCCTCATCAGGC	DR11
L37	AGCGCAGGAGCTCCTCCTG	DR12
E71	GGCCCGCTCGTCTTCCAGG	DR1, DR4, DR11, DR13
K71	CGCCCGCTTGTCTTCCAG	DR13
H60	GTTCCAGTGCTCCGCAGCA	DR14
N37	AGCGCACGTTCTCCTCCTG	DR3, DR13, DR14
7011	GACATCCTGGAGCAGGCG	DR15
7014	GAAGACAGGCGCGCCGCG	DR12, DR16
D1	ACACAACCTACGAGGTGGCGT	DQB1*0501,0502,0503,0601,0602,0603
D2	GCTGGGGCTGCCTGCCGCCG	DQB1*02
D3	TGGGGCGGCTTGACGCCGAG	DQB1*0401,0402
D4	GGCGGCCTGTTGCCGAGTAC	DQB1*0501,0604
D5	GGCGGCCTAGCGCCGAGTAC	DQB1*0502
D6	AGGGGCGGCCTGACGCCGAG	DQB1*0503,0601
D7	AGGGGCGGCCTGATGCCGAG	DQB1*0602,0603
D8	GCTGGGGCCGCCTGCCGCCG	DQB1*0302
D9	TGGGGCCGCCTGACGCCGAG	DQB1*0301,0303
D10	CGCGTGCGTTATGTGACCAG	DQB1*0601,0301
D11	GAGCGCGTGCGGGGTGTGAC	DQB1*0501,0502,0503,0402
D12	GGGACCGAGCTCGTGCGGGG	DQB1*0401
D13	TGCGTCTTGTGACCAGATAC	DQB1*0302,0303,0602
D14	TGCGTCTTGTAAACCAGACAC	DQB1*0603,0604
D15	GCGGCCTGTTGCCGAGTA	DQB1*0501,0604,0605

E. Hibridación y detección de la señal de hibridación

Kit de detección de ácidos nucleicos (DIG Nucleic Acid Detection, Boehringer Mannheim), que incluye el reactivo de bloqueo, el anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato de la fosfatasa.

Solución de lavado TMAC con Tris-HCl 50mM (Sigma) pH 8, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) 3M (Sigma), EDTA 2mM (Sigma), SDS al 0.1% (Boehringer Mannheim).

Solución de prehibridación con Tris-HCl 50mM (Sigma) pH 8, TMAC 3M (Sigma), EDTA 2mM (Sigma) pH 8, solución Denhardt 5X, SDS al 0.1% (Boehringer Mannheim), solución de bloqueo al 0.5%.

Solución Denhardt 50X con 1% de polivinilpirrolidona (Sigma), 1% de ficoll 400 (Sigma), 1% de albúmina de suero bovina (Sigma).

Solución SSPE 2X con NaCl 300 mM (Sigma), NaH₂PO₄ 20 mM (Scharlaus, Barcelona), EDTA 2 mM (Sigma), SDS al 0.1% (Boehringer Mannheim).

Tampón 1 con Tris-HCl 100mM (Sigma) pH 7.2, NaCl 150mM (Sigma).

Tampón 2 o solución de bloqueo al 1%, con reactivo de bloqueo disuelto en tampón 1.

Tampón 3 con Tris-HCl 100 mM (Sigma) pH 9.5, NaCl 100 mM (Sigma), MgCl₂ 50mM (Sigma).

Tampón 4 con Tris-HCl 10mM (Sigma) pH 8, EDTA 1 mM (Sigma).

2.3.3.3. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se emplean muestras de sangre anticoagulada con EDTA, mezclando 500 µl de la misma con 500 µl de tampón de lisis en un tubo *eppendorf* de 1.5 mL. A continuación se centrifuga a 13000xg durante 20 segundos. El sobrenadante se decanta y se resuspende el botón celular en 1 mL de tampón de lisis. Estos pasos se repiten tantas veces como sea necesario hasta que el sobrenadante sea transparente, sin restos de hemoglobina que puedan inhibir la amplificación PCR. Después de la última lisis, se resuspende el botón en 500 µL de tampón PCR w/iónico y se transfiere a un tubo de 0.5 mL añadiendo 3 µL de proteinasa K a concentración de 10 mg/mL.

Esta mezcla se incuba a una temperatura entre 50-60°C durante al menos una hora. Después de esta incubación, las muestras se someten a un calentamiento de 95°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K restante. Posteriormente se cuantifica la cantidad de ADN presente en la muestra con un espectrofotómetro leyendo a una longitud de onda de 280 nm.

2.3.3.4. Técnica de PCR-SSOP

Este método consta de una primera etapa de amplificación mediante PCR de un segmento de la región codificante del gen HLA en estudio. Los cebadores utilizados en la amplificación están constituidos por una secuencia de nucleótidos que permite la amplificación del gen en todos los individuos por diferentes que sean los alelos que porten. Después, se completa con una etapa de detección con sondas oligonucleotídicas específicas que nos permiten conocer el tipaje HLA de un determinado individuo. Para la detección se requiere un primer paso de transferencia del material amplificado a un soporte sólido donde se lleve a cabo la hibridación con las distintas sondas específicas, que después se detectan por un método colorimétrico, mediante la señal de hibridación específica que permite la resolución del tipaje.

A. Técnica de la amplificación enzimática PCR

Para realizar la amplificación PCR se prepara primeramente una mezcla con los componentes requeridos, cuyo volumen final depende del número de muestras que se quiera amplificar. Así, para cada muestra individual a amplificar, se requieren los siguientes reactivos: Tampón de PCR 1X, 200 μ M dNTPs, 50 pmoles de cada primer (3' y 5'), 2U de Taq ADN-Polimerasa y agua bidestilada hasta completar un volumen de 85 μ L. La mezcla de todos los componentes se realiza en frío, añadiendo como último componente la ADN polimerasa. Tras agitar la mezcla, se distribuyen 85 μ L de la solución a cada uno de los tubos de 0.2 mL de las muestras y se añaden 15 μ L (0.5 μ g) de cada ADN genómico. En cada amplificación se dispone un control negativo de contaminación ambiental, en el cual se dispensa agua autoclavada en lugar de ADN y que al contrario de los tubos de las muestras permanecerá abierto durante todo el proceso.

Una vez preparadas las muestras se introducen inmediatamente en el termociclador. Las condiciones de la amplificación utilizadas en el tipaje de los loci HLA-DRB1 y -DQB1 son:

- a- 1 ciclo de 2 minutos a 95°C para desnaturalizar proteínas que hubieran podido quedar en el medio después de la extracción del ADN.
- b- 30 ciclos compuestos de: Desnaturalización durante 1 minuto a 94°C para abrir las cadenas de ADN, alineamiento a 56° durante 1 minuto para que se unan los cebadores complementarios, y extensión 1 minuto a 72°C para que se sinteticen las hebras.
- c- 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para terminar de extender cualquier hebra rezagada.
- d- Indefinidamente a 4°C después del último ciclo para conservar los amplificados en frío.

B. Visualización del amplificado en gel de agarosa

Después de la reacción de PCR se comprueba si la amplificación del locus deseado es correcta ya que dicho amplificado se ensaya posteriormente con diferentes sondas oligonucleotídicas. Para ello se prepara una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en tampón TBE 0.5X, tras disolverla en caliente se añade el bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. A continuación se cargan en el gel las alícuotas de las muestras y del marcador de peso molecular, teñidas con solución de azul de bromofenol, y se conecta a una fuente de electroforesis durante 30 minutos a 120 V. A continuación, se coloca el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV Linker, TFL, Francia) y se registra la presencia de amplificado mediante una fotografía con cámara Polaroid 440 (Polaroid, Cambridge, USA).

C. Desnaturalización y transferencia del ADN amplificado a membrana de nylon

La inmovilización de los amplificados en soporte sólido adecuado (en nuestro caso membranas de nylon cargadas positivamente) permite la hibridación de un número elevado de muestras con un panel completo de sondas oligonucleotídicas para tipar cada muestra en el locus de interés y con el grado de resolución adecuado.

Para desnaturalizar el ADN amplificado y que se abran las hebras, se mezclan 30 ng de amplificado con 50 µL de solución desnaturalizante. Normalmente cuando en la

visualización en gel de agarosa se observa una buena intensidad en la banda de amplificado, con 5 μL de amplificado/filtro es suficiente para dar una señal óptima. Tras incubar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente se transfieren a hielo picado para evitar que se vuelvan a renaturalizar las hebras. Posteriormente se colocan 2 hojas de papel Whatman 3MM sobre una placa del aparato de transferencia a vacío de 96 pocillos denominado Bio-Dot (Biorad Laboratories, Richmond, USA), y a continuación se coloca la membrana de nylon cargado positivamente prehumedecido en agua destilada. Posteriormente, se añaden 50 μL de cada muestra desnaturalizada en los pocillos de la cubeta de transferencia y se conecta el vacío. Cuando se ha observado la succión del líquido, se añaden 100 μL de tampón TE a cada pocillo para arrastrar los restos de la muestra que se hayan podido quedar en las paredes de los pocillos. La membrana se seca a temperatura ambiente entre 2 hojas de papel Whatman 3MM, para después fijar el filtro mediante entrecruzamiento con una lámpara del transiluminador de luz UV de 254 nm a 0.12 J/cm^2 , durante 15 minutos (UV Linker).

D. Marcaje de las sondas oligonucleotídicas con digoxigenina-11-ddUTP

El fundamento que se utiliza es la unión del compuesto digoxigenina-11-ddUTP en número variable en el extremo 3' de las sondas oligonucleotídicas, permitiendo su posterior identificación mediante un anticuerpo anti-digoxigenina en el paso posterior de revelado de las membranas. Para ello empleamos un kit comercial que contiene los reactivos necesarios para realizar el marcaje con digoxigenina. Para el marcaje de 100 pmoles de oligonucleótido, siguiendo las especificaciones de la casa proveedora, se deben mezclar los siguientes componentes en un tubo de 1.5 mL sobre hielo: 4 μL de Tailing Buffer, 4 μL de solución de CoCl_2 , 100 pmoles del oligonucleótido correspondiente (según volumen), 1 μL de Dig-11-ddUPT y 1 μL (50 unidades) de la enzima Transferasa Terminal. A continuación, se incuban las muestras a 37°C durante 15-30 minutos, después de los cuales se transfieren a hielo picado. Se mezclan 1 μL de la solución de glicógeno con 200 μL de la solución de EDTA 0.2 M pH 8.0, y se añaden 2 μL de esta dilución a la mezcla anterior. Después se precipita el oligonucleótido marcado con 2.5 μL de LiCl 4 M y 85 μL de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C . A continuación se mezcla bien y se mantiene a -70°C durante 15 minutos y a -20°C

durante 2 horas. Después de este tiempo, se centrifuga el oligonucleotido a 12000xg durante 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava el botón obtenido con 60 µL de una solución de etanol al 70%. Se vuelve a centrifugar a 12000xg durante 10 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante y se seca el tubo al vacío. Una vez seco el botón, se resuspende éste en un volumen apropiado de agua bidestilada estéril.

E. Hibridación con las SSOs marcadas con digoxigenina

Consiste en hibridar el material amplificado para un determinado locus con una serie de sondas específicas marcadas con digoxigenina, de manera que después de una serie de lavados se pueda eliminar el exceso de sonda y despegar las sondas unidas inespecíficamente, para revelar la reacción utilizando, en nuestro caso, un sistema colorimétrico.

Primeramente, se prehibridan las membranas en un frasco de hibridación con 0.2 mL de solución de prehibridación/cm² al menos durante 30 minutos a 56°C en horno de hibridación. Posteriormente, se añade la sonda marcada con DIG-ddUTP (60 ng, a una concentración de 2 pmoles/mL de solución de hibridación precalentada a 56°C). Se mezcla bien y se incuba un mínimo de 1 hora y un máximo de 16 horas en horno de hibridación con agitación constante a 56°C.

A continuación se lava la membrana 2 veces durante 5 minutos cada vez, con una solución 2XSSPE, 0.1% SDS a temperatura ambiente y con agitación en bateas de plástico de tamaño apropiado a la membrana para que el líquido la cubra completamente con vistas a eliminar el exceso de sonda. Después se lavan los filtros con solución de lavado TMAC durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación para eliminar el exceso de SSPE. Posteriormente se lavan los filtros 2 veces con solución TMAC durante 15 minutos en baño con agitación a 59°C. Finalmente, se lavan los filtros 2 veces con solución 2 X SSPE a temperatura ambiente con agitación durante 10 minutos, para eliminar el exceso de TMAC.

F. Detección de la señal de hibridación

Para detectar la señal donde han hibridado las sondas específicas de alelo marcadas con digoxigenina se emplea el kit de revelado colorimétrico DIG Nucleic

Tabla 2.5. Modelos de reacción de las SSOs para la identificación de los alelos HLA-DQB1.

Alelo DQB1*	Oligonucleótido														
	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5
02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0301	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
0302	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
0303	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
0401	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
0402	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
0501	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
0502	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
0503	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
0601	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0602	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
0603	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
0604	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

2.3.4. Análisis estadístico

Los resultados del tipaje HLA se almacenaron en bases de datos realizadas en DBase-III-plus (Aston-Tate, USA). Las frecuencias alélicas se estimaron por conteo directo, y todas estas frecuencias reflejan el porcentaje de individuos positivos para un cierto alelo. El significado estadístico se ensayó mediante el uso de tablas de contingencia 2x2 por el test de chi cuadrado de Pearson y el test de Mantel-Haenszel, con la corrección de Yates o con el test exacto de Fisher cuando el valor observado para un marcador HLA resultaba menor de cinco, todo ello disponible en los programas informáticos EPI-INFO-5.01 (Center for Disease Control, Atlanta, USA) y SPSS (SPSS Inc. Microsoft, Chicago, USA). Los valores P se corrigieron multiplicando por el número de alelos analizados de cada locus (corrección de Bonferroni) (Svejgaard y col., 1994), considerándose significativos solamente los valores de P inferiores a 0.05. Se realizaron un total de cuatro comparaciones:

1. Asmáticos extrínsecos con el grupo control.
2. Asmáticos intrínsecos con el grupo control.
3. Pacientes extrínsecos con intrínsecos.
4. Total de pacientes asmáticos con el grupo control.

2.4. Resultados

Las frecuencias fenotípicas de los antígenos de clase I (HLA-A, -B y -C) se muestran en la tabla 2.6. En las tablas 2.7 y 2.8 se muestran las frecuencias de los alelos de HLA-DRB1 y -DQB1 de los 80 pacientes con asma intrínseco y 95 con asma extrínseco en los que se realizó el tipaje de clase II.

Al comparar el grupo de asma extrínseco con los controles se encuentra un incremento de la frecuencia del alelo HLA-DRB1*03 en los asmáticos extrínsecos ($P=0.0051$), que pierde la significación estadística ($P_c > 0.05$) al ser corregido por el número de alelos tipados (corrección de Bonferroni). Las otras diferencias observadas en la comparación de estos dos grupos, son la disminución del antígeno HLA-A2, el incremento del antígeno HLA-B18 y el alelo HLA-DQB1*0501 en el grupo de alérgicos extrínsecos respecto a los controles, todos tienen una significación menor que el alelo HLA-DRB1*03, y también desaparece al ser corregida.

La comparación del grupo de asmáticos intrínsecos con los controles también refleja diferencias entre ambos ($P < 0.05$), con un incremento del antígeno HLA-B7, y los alelos HLA-DRB1*04, -DQB1*0302 y -DQB1*0303, así como una disminución de HLA-Cw6, -DRB1*11 y -DRB1*15 en los asmáticos intrínsecos respecto al grupo control. En todos los casos, al corregir por el número de alelos tipados la significación estadística desaparece.

Cuando se compara el grupo de asmáticos intrínsecos con el de asmáticos extrínsecos se observa un incremento de las frecuencias de los alelos HLA-A1, -B7 y -DQB1*0302 en el grupo de asmáticos intrínsecos, mientras que la frecuencia del antígeno HLA-B18 aparece disminuida, aunque en cualquier caso sin significación estadística después de la corrección.

Igualmente, se observa un incremento en la frecuencia del alelo HLA-DRB1*03 y una disminución del alelo HLA-DRB1*11 en el conjunto de pacientes alérgicos respecto al grupo control, cuya significación también desaparece al ser corregida.

Tabla 2.6. Frecuencias fenotípicas (n,%) de los antígenos HLA de clase I (A, B, C) en los tres grupos de estudio.

Ag	Intrínsecos (n=87,%)	Extrínsec. (n=102,%)	Controles (n=150,%)	P	Ag	Intrínsecos (n=87,%)	Extrínsec. (n=102,%)	Controles (n=150,%)	P
A1	26 (30)	15 (15)	33 (22)	a	B51	10 (11)	11 (11)	16 (10)	
A2	40 (46)	36 (35)	77 (51)	b	B52	7 (8)	2 (2)	9 (5)	
A3	14 (16)	21 (21)	19 (12)		B53	3 (3)	2 (2)	4 (3)	
A23	2 (2)	6 (6)	9 (6)		B7	22 (25)	13 (13)	21 (13)	a,c
A24	12 (14)	21 (21)	23 (15)		B8	13 (15)	15 (15)	23 (16)	
A11	8 (9)	13 (13)	20 (13)		B44	22 (25)	28 (27)	52 (35)	
A25	3 (3)	5 (5)	3 (1)		B45	4 (5)	2 (2)	4 (3)	
A26	10 (11)	4 (4)	10 (7)		B13	1 (1)	7 (7)	6 (4)	
A34	0 (0)	2 (2)	0 (0)		B14	8 (9)	18 (18)	17 (11)	
A28	8 (9)	6 (6)	11 (8)		B57	5 (6)	4 (4)	14 (10)	
A29	14 (16)	20 (20)	27 (18)		B58	0 (0)	1 (1)	3 (2)	
A30	14 (16)	17 (17)	16 (11)		B62	8 (9)	9 (9)	9 (6)	
A31	1 (1)	6 (6)	6 (3)		B63	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
A32	3 (3)	10 (10)	15 (10)		B18	8 (9)	25 (25)	19 (14)	a,b
A33	3 (3)	8 (8)	7 (5)		B38	6 (7)	2 (2)	9 (6)	
A bl.	16 (18)	14 (14)	24 (16)		B39	6 (7)	2 (2)	9 (6)	
					B49	6 (7)	9 (9)	9 (6)	
					B50	2 (2)	4 (4)	7 (4)	
Cw1	5 (6)	5 (5)	11 (7)		B55	2 (2)	2 (2)	4 (3)	
Cw2	8 (9)	10 (10)	10 (5)		B56	0 (0)	0 (0)	4 (3)	
Cw3	12 (14)	10 (10)	13 (9)		B27	6 (7)	5 (5)	4 (3)	
Cw4	18 (21)	27 (26)	29 (21)		B35	11 (13)	18 (18)	22 (15)	
Cw5	8 (9)	19 (19)	25 (19)		B37	2 (2)	1 (1)	2 (1)	
Cw6	5 (6)	12 (12)	23 (15)	c	B60	5 (6)	5 (5)	3 (2)	
Cw7	37 (43)	30 (29)	61 (40)		B61	0 (0)	1 (1)	4 (3)	
Cw8	7 (8)	12 (12)	10 (7)		B41	7 (8)	6 (6)	6 (4)	
C bl.	74 (85)	79 (77)	118 (78)		B42	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
					B47	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
					B bl.	8 (9)	12 (12)	18 (12)	

a, Comparación de los grupos intrínseco vs. extrínseco P<0.05, Pc=No significativo.

b, Comparación de los grupos extrínseco vs. control P<0.05, Pc=No significativo.

c, Comparación de los grupos intrínseco vs. control P<0.05, Pc=No significativo.

Tabla 2.7. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DRB1 en los tres grupos de estudio.

Alelo DRB1	Intrínsecos (n=80, %)	Extrínsecos (n=95, %)	Controles (n=150, %)	P
01	17 (21)	29 (31)	29 (19)	
15	8 (10)	17 (18)	35 (23)	a
16	5 (6)	1 (1)	6 (4)	
03	22 (28)	36 (38)	31 (21)	b,c
04	31 (39)	23 (24)	34 (23)	a
11	13 (16)	18 (19)	45 (30)	a,c
12	0 (0)	0 (0)	2 (1)	
13	17 (21)	20 (21)	34 (23)	
14	3 (4)	1 (1)	6 (4)	
07	24 (30)	29 (31)	54 (36)	
08	2 (3)	0 (0)	5 (3)	
09	2 (3)	0 (0)	0 (0)	
10	2 (3)	4 (4)	1 (1)	

a, Comparación de los grupos intrínseco vs. control $P < 0.05$, P_c = No significativo.

b, Comparación de los grupos extrínseco vs. control $P < 0.05$, P_c = No significativo.

c, Comparación de los grupos conjunto de asmáticos vs. control $P < 0.05$, P_c = No significativo.

Tabla 2.8. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DQB1 en los tres grupos de estudio.

Alelo DQB1	Intrínsecos (n=80,%)	Extrínsecos (n=95,%)	Controles (n=150,%)	P
0501	18 (23)	32 (34)	29 (19)	a
0502	6 (8)	1 (1)	7 (5)	
0503	3 (4)	1 (1)	5 (3)	
0601	1 (1)	3 (3)	4 (3)	
0602	9 (11)	15 (16)	31 (21)	
0603	10 (12)	10 (11)	16 (11)	
0604	4 (5)	8 (8)	13 (9)	
0605	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
02	37 (46)	55 (58)	79 (53)	
0301	23 (27)	26 (27)	56 (37)	
0302	24 (30)	14 (15)	26 (17)	b, c
0303	7 (9)	3 (3)	2 (1)	b
0402	1 (1)	1 (1)	2 (3)	

a, Comparación de los grupos extrínseco vs. control $P < 0.05$, P_c = No significativo.

b, Comparación de los grupos intrínseco vs. control $P < 0.05$, P_c = No significativo.

c, Comparación de los grupos intrínseco vs. extrínseco $P < 0.05$, P_c = No significativo.

2.5. Discusión

En esta parte del estudio hemos descrito la distribución fenotípica del HLA clase I y II en dos grupos de pacientes con diagnóstico de asma intrínseco y extrínseco. Aunque los resultados muestran diferencias, al realizar las comparaciones entre los diversos grupos las diferencias encontradas no son significativas. Nuestros resultados son similares a los reflejados en algunos estudios anteriores donde no describen diferencias estadísticamente significativas, como son los trabajos realizados en poblaciones de Estados Unidos (Brady y col., 1981), Inglaterra (Turton y col., 1979; Muers y col., 1982), Colombia (Caraballo y col., 1990), o China (Li y col., 1995).

Sin embargo, existe una serie de estudios realizados en otras poblaciones que demuestran asociaciones estadísticamente significativas de ciertos antígenos, como la asociación del asma extrínseco con el antígeno B8 en población egipcia ($P < 0.005$) (Hafez y col., 1984), o el antígeno Bw61 en pacientes alérgicos chinos de Manchuria ($P_c < 0.001$) (Wang y col., 1988), o el estudio en asmáticos griegos donde observa un incremento de los antígenos A10 ($P_c = 0.009$) y una disminución de B5 y B35 ($P_c = 0.00003$ y $P_c = 0.0065$, respectivamente) en los pacientes asmáticos respecto a los controles (Apostolakis y col., 1996). También hay otro antiguo estudio serológico con pacientes atópicos de Inglaterra (Morris y col., 1980), donde a pesar de no encontrar diferencias significativas, se sugería que el asma intrínseco estaba asociado con una disminución de los antígenos HLA-A3-B7-DR2 (que se encuentran en desequilibrio de ligamiento). Nuestros resultados no confirman ese punto, de hecho la frecuencia del HLA-B7 se encuentra aumentada en el grupo de pacientes con asma no atópico, aunque sin significación estadística. Aunque hay que hacer notar que existen variaciones en el diseño y la realización de estos estudios que contribuirían a explicar la disparidad de resultados, tales como el origen étnico de las poblaciones, el número de pacientes y controles estudiados, y la metodología empleada.

En un estudio más reciente donde el análisis diferenciaba entre pacientes atópicos y asmáticos de Inglaterra, se encontró una asociación negativa del alelo DRB1*08 con el asma ($P_c = 0.02$) y la atopia ($P_c = 0.04$), mientras que el alelo DRB1*15 estaba positivamente asociado únicamente con el asma ($P_c = 0.02$) (Howell y col., 1999). En nuestros resultados a diferencia de los de Howell, el alelo DRB1*15 aparece

disminuido tanto en los asmáticos intrínsecos ($P < 0.05$), como en los extrínsecos al compararlo con los controles. Sin embargo, sí que encontramos que el alelo DRB1*08 está disminuido en el grupo de pacientes extrínsecos respecto a los controles (0% vs. 3%), y como consecuencia en el total de asmáticos respecto a los controles (1% vs. 3%). Aunque, al ser el alelo DRB1*08 tan poco frecuente en nuestra población, tal diferencia no alcanza significación estadística con este tamaño de muestra.

Existe un trabajo donde, además de estudiar el polimorfismo del gen HLA-DR, se determinan los polimorfismos de los genes del factor de necrosis tumoral α y β , como parte de un haplotipo extendido al estar todos estos genes dentro del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6 (Moffatt y col., 1999). En este estudio realizado en 230 familias australianas, se encuentra asociación entre los haplotipos $LT\alpha$ NcoI*1/TNF-308*2/HLA-DRB1*03 y $LT\alpha$ NcoI*1/TNF-308*2/HLA-DRB1*02 con el asma ($P=0.016$ y $P=0.002$, respectivamente), asociaciones que no se encuentran al analizar los alelos de los tres genes por separado. La mayor diferencia observada en nuestros resultados, el incremento del alelo DR3 en los alérgicos extrínsecos respecto al grupo control ($P=0.0051$) que aunque como el resto desaparece al ser corregida, concuerda con las asociaciones descritas entre la respuesta de IgE a ciertos alérgenos bastante comunes y dicho alelo HLA-DRB1*03, como son la respuesta al polen de *Lolium perenne* y a los ácaros (Ansari y col., 1989; O'Hehir y col., 1990). Este hecho también podría explicar la asociación referida del asma con el haplotipo NcoI*1/TNF-308*2/HLA-DRB1*03 (Moffatt y col., 1999). El desequilibrio de ligamiento existente entre este alelo HLA-DRB1*03 y otros antígenos de clase I podría explicar algunas de las primeras asociaciones descritas, como la del haplotipo A1-B8 y el asma extrínseco en niños (Ostergaard y col., 1979) o únicamente el antígeno B8 con el asma extrínseco (Hafez y col., 1984). En nuestros resultados no aparece incremento en la frecuencia del DRB1*02 como en el trabajo de Moffatt, o de su *split* DRB1*15 como en el de Howell. El alelo DRB1*15 ha sido asociado en varios estudios con la respuesta al polen de *Ambrosia artemisiifolia* (Goodfriend y col., 1985; Marsh y col., 1982 y 1987), pero al no ser un alérgeno frecuente en nuestro entorno no se ha incluido en nuestro estudio.

En pacientes atópicos franceses se ha descrito una fuerte asociación entre los alelos DR4 y DR7 y los estados de atopia ($P_c < 0.0004$ y $P_c < 0.05$ respectivamente) (Aron y col., 1995). En nuestra población no se encuentra ninguna de dichas

asociaciones, aunque la selección y el tamaño de los grupos de controles y pacientes estudiados son muy diferentes. De hecho, cuando se comparan los pacientes atópicos con los no atópicos se observa que, al contrario que en el estudio de Aron, el alelo HLA-DRB1*04 es más frecuente en los pacientes no atópicos, aunque sin significación estadística. Este mismo grupo ha descrito la asociación de los mismos alelos con otra serie de patologías, como son la fibrosis quística (Aron y col., 1999a), la aspergilosis (Aron y col., 1999b) y la alergia a alimentos y al polen de abedul (Sénéchal y col., 1999). Sin embargo, a pesar de que los estudios son de años posteriores se utilizan los mismos controles, siendo únicamente 42, mientras que el número de pacientes llega a ser de 98 en alguna patología (Aron y col., 1999a). Teniendo en cuenta que en dichos controles no se encuentran representados alelos tan frecuentes como el DR7, y que tan sólo hay un 3% de controles que tienen el alelo DR4, no es de extrañar que se encuentre significación estadística en todas las enfermedades que han estudiado.

Con respecto al locus DQ, estudios en el asma infantil sugerían una asociación entre el asma atópico y el alelo DQw2 (Hshieh y col., 1991; Gerbase-DeLima y col., 1997). En nuestros resultados se observa que el alelo DQB1*0501 se encuentra aumentado en el asma extrínseco, mientras que los alelos HLA- DQB1*0302 y HLA-DQB1*0303 están aumentados en el asma intrínseco pero sin diferencias significativas. Curiosamente, existen varios estudios que sugieren que precisamente el alelo DQB1*0302 puede determinar la susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes, como la diabetes (Owerbach y col., 1989; Thorsby y Ronningen, 1993). Teniendo en cuenta el papel sugerido de ciertos virus en el desarrollo del asma intrínseco (Li y O'Connell, 1987; Welliver y col., 1981), es tentador investigar el papel que pueda tener la restricción del HLA-DQ para péptidos virales o miméticos que puedan estar implicados en el asma intrínseco, tal como ocurre en otros procesos de patología inmunológica (Parkkonen y col., 1994).

En conclusión, en nuestra población no se ha podido establecer una asociación en el asma alérgico o no alérgico con el sistema HLA. Por ello, no se puede deducir por nuestros resultados que algún agente infeccioso y su relación con las moléculas de HLA, pueda ser la causa última del desarrollo del asma intrínseco. Dada la amplia bibliografía existente que refleja diversas asociaciones de los antígenos HLA con las respuestas individuales a ciertos alérgenos, y la observación de que algunos alelos tanto

de clase I como de clase II predominan o están disminuidos en los pacientes asmáticos, se decidió continuar nuestro estudio ampliando el número de muestras de pacientes extrínsecos para comprobar si dichas asociaciones estaban presentes en nuestra población.

CAPÍTULO 3

COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS HLA DE CLASE I Y II EN PACIENTES CON ASMA EXTRÍNSECO

3.1. Introducción

En enfermedades alérgicas en general y en el asma extrínseco en particular, se ha demostrado que ciertos alelos HLA clase II pueden constituir factores de riesgo o de protección para el desarrollo de la enfermedad. Una de las primeras asociaciones descritas fue la encontrada por Marsh en los años 80, donde observó la fuerte relación que existía entre la presencia del antígeno Dw2 y la respuesta de IgE al alérgeno de pequeño tamaño Amb a 5 de la *Ambrosia artemisiifolia* (Marsh y col., 1982), que se correspondía por desequilibrio de ligamiento a la primera asociación descrita por Levine (Levine y col., 1972). Posteriormente, con el avance de las técnicas de biología molecular se pudo establecer que los alelos concretos causantes de esta asociación eran el DRB1*1501 en la población caucasoide y el DRB1*1502 en población asiática (Huang y col., 1991; Zwollo y col., 1991). Esta asociación es la más consistente encontrada hasta el momento, y ha sido confirmada en otra serie de estudios (Marsh y col., 1987; Blumenthal y col., 1988).

De igual forma, también se han descrito asociaciones con otra serie de neumoalérgenos, como los alérgenos polínicos de *Lolium perenne* con DR3 y DR5 (Freidhoff y col., 1988; Ansari y col., 1989), el alérgeno Der p 1 del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* con DR3 y DR7 (Fisher y col., 1992; Cho y col., 2000), el alérgeno Par o 1 de *Parietaria officinalis* con DR11 (D'Amato y col., 1996), o con alérgenos de animales y hongos, como DR1 con el alérgeno Fel d 1 del gato y DR4 con Alt a 1 de *Alternaria alternata* (Young y col., 1994). Las asociaciones descritas no se han limitado a los alelos del gen DRB1* pues se han analizado con otra serie de genes de clase II, como la asociación en la respuesta IgE al alérgeno Ole e 1 de *Olea europaea* con el alelo DQB1*0201 (Cárdaba y col., 1993), al alérgeno Bet v 1 de *Betula verrucosa* con DRB3*0101 (Sparholt y col., 1994) y el alérgeno Cry j 1 de *Cryptomeria japonica* con el alelo DP5 (Hori y col., 1996). El estudio de las asociaciones HLA con la alergia atópica fue objeto de análisis dentro del 11º Worskhop Internacional de

Histocompatibilidad, encontrándose algunas de las asociaciones anteriormente expuestas en grupos de estudio de diferente origen étnico (Marsh y col., 1992).

Sin embargo, también se ha verificado que el HLA no siempre se comporta como un factor de riesgo, sino que pueden existir asociaciones que se confieren un carácter protector. Tal es el caso del alelo DR4, que se ha descrito asociado con la ausencia de respuesta al alérgeno del cedro (Reid y col., 1992), el DR7 con la respuesta a Lol p 3 (Ansari y col., 1989), o el alelo DPB1*0401 en la alergia a ácaros (Caraballo y col., 1991).

Un caso curioso fue el ocurrido en Barcelona, donde se observaron varios brotes epidémicos de asma causados por la inhalación de polvo de soja, coincidiendo con la descarga de este producto en su puerto marítimo. La existencia de una predisposición genética contribuyó a la respuesta de estos pacientes asmáticos expuestos al polvo de soja, ya que el riesgo de asma se relacionó con el alelo DRB1*13, y las combinaciones de los alelos DRB1*11 y DRB*13 sólo fueron halladas en los casos epidémicos y no en el resto de asmáticos (Soriano y col., 1997).

Con los antígenos de HLA clase I se han realizado menos estudios, aunque sí que se han descrito algunas asociaciones (Sjostedt y col., 1996; Lara-Márquez y col., 1999). En la tabla 3.1 se muestra un resumen de las asociaciones descritas en respuesta a neumoalérgenos.

Hay que señalar que existen estudios en diferentes poblaciones donde no se ha encontrado ninguna de estas asociaciones (Li y col., 1994; Holloway y col., 1996; Stephan y col., 1996; Rihs y col., 1998). Mientras otra serie de estudios, que si bien no encuentran asociación con un alelo concreto, sí observan asociación de asma y atopia con la región HLA (The Collaborative Study on the Genetics of Asthma, 1997; Hizawa y col., 1998; Torres-Galván y col., 1999; Moffatt y col., 2001).

En otra serie de artículos el análisis de las posibles asociaciones se realiza teniendo en cuenta la estructura bioquímica de las moléculas HLA-DR, según los aas presentes en la zona de unión y de presentación de péptidos. Así, se han podido explicar resultados aparentemente contradictorios obtenidos en estudios de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la diabetes tipo 1 (Ou y col., 1998). Este tipo de análisis ha sido empleado en trabajos realizados en pacientes alérgicos, y ello ha

permitido llegar a describir nuevas asociaciones entre alelos HLA y procesos alérgicos a *Dermatophagoides* (Torres-Galván y col., 2000).

En otros tipos de asma, como el inducido por medicamentos y el asma ocupacional, también existen trabajos que describen asociaciones con el sistema HLA. Así, se ha descrito la asociación del asma inducido por sensibilidad a la aspirina con el antígeno DQw2 (Mullarkey y col., 1986) y con el DPB1*0301 (Dekker y col., 1997), o el DQB1*0503 y DQA1*0401 con el asma inducido por el disocianato de tolueno (Mapp y col., 2000). Asimismo, en las reacciones alérgicas inducidas por alimentos también se han descrito una serie de asociaciones, como el DQ7 con las proteínas de la leche de vaca (Camponeschi y col., 1997) o la alergia al cacahuete con los alelos DRB1*08 y DQB1*04 (Howell y col., 1998). En la tabla 3.2 se refleja un resumen de todas estas asociaciones.

El objetivo de esta parte del estudio fue caracterizar las frecuencias genotípicas de HLA clase II en la población de asmáticos extrínsecos, teniendo en cuenta el alérgeno al que eran sensibles. Para ello, se aumentó el número de muestras de pacientes asmáticos atópicos y se agruparon respecto al tipo de alérgeno al que eran sensibles. También se estudió la distribución de los antígenos de clase I para comprobar si existía alguna asociación con estos antígenos.

Tabla 3.1. Asociaciones descritas entre los alelos del sistema HLA y la respuesta alérgica a distintos neuroalérgenos (Pr: asociaciones protectoras de la enfermedad).

Fuente alérgica	Alérgeno	Alelo	Pr	P	Referencia
<u>Pólenes de plantas:</u>					
<i>Parietaria officinalis</i>	Par o 1	DRB1*11		<0.01	D' Amato y col., 1996
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 5	DR2		<0.0001	Marsh y col., 1982
	Amb a 6	DR5		<1x10 ⁻⁷	Marsh y col., 1987
<i>Ambrosia trifida</i>	Amb t 5	DR2		<0.001	Goodfriend y col., 1985
<i>Lolium perenne</i>	Lol p 1, 2	DR3		<0.0001	Freidhoff y col., 1988
	Lol p 3	DR5		0.01	Ansari y col., 1987
	Lol p 3	DR3		0.006	
<i>Parthenium hysterophorus</i>		DR3		<0.0001	Sriramarao y col., 1990
<u>Pólen de árboles:</u>					
<i>Olea europea</i>	Ole e 1	DQB1*0201		0.0003	Cárdaba y col., 1993
<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 1	DRB3*0101		0.02	Sparholt y col., 1994
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1	DPB1*0501		<0.04	Hori y col., 1996
		DRB1*11	Pr	0.02	Matsushita y col., 1987
<i>Libocedrus decurrens</i>		DR4	Pr	0.0096	Reid y col., 1992
<u>Hongos:</u>					
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1	DR4		0.006	Young y col., 1994
	Alt a 1	DR4		0.01	Marsh y col., 1992
<u>Acaros:</u>					
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Der p 1, 2, 5	DPB1*0201	Pr	<0.010	Hu y col., 2000
	Der p 1	DR3		0.01	Stephan y col., 1996
	Der p 1	DPB1*11011		<0.01	O'Brien y col., 1999
	Der p 1, 2	DRB1*07			0.02
DRB1*13		Pr		0.03	
<i>Dermatophagoides spp.</i>		DRB1*1101		<0.01	Lara-Márquez y col., 1999
		DQA1*0501			
		DQB1*0301 (haplotipo)			
		Cw7	Pr	0.07	
<i>Dermatophagoides spp.</i>		DPB1*0401		<0.008	Caraballo y col., 1991
<u>Epitelio de animales:</u>					
<i>Felis domesticus</i>	Fel d 1	DRB1*01		0.02	Young y col., 1994
<u>Insectos:</u>					
<i>Blatella germanica</i> y <i>Periplaneta americana</i>		DRB1*0101		0.0066	Donfack y col., 2000
		DRB1*0102		0.0088	
		DQA1*0101		0.0012	
		DQB1*0501		0.00096	
<i>Panonychus citri</i>		DRB1*07		0.01	Cho y col., 2000
<i>Chironomus thummi</i>	Chi t 1	DRB1*04	Pr	0.01	
		DRB1*0101		<0.025	Tautz y col., 1994
		DQA1*0101		<0.05	
		DQB1*0501		<0.025	

Tabla 3.2. Asociaciones descritas entre alelos del sistema HLA y la respuesta alérgica y/o asmática a distintas fuentes alérgicas (Pr: asociaciones protectoras de la enfermedad).

Fuente alérgica	Alelo	Pr	P	Referencia
<u>Medicamentos:</u>				
Aspirina	DQw2		0.008	Mullarkey y col., 1986
	DPB1*0401	Pr	0.003	Dekker y col., 1997
	DPB1*0301		0.002	
Antiinflamatorios no esteroideos	DR11		<0.02	Quiralte y col., 1999
Gelatina	DR9		<0.002	Kumagai y col., 2001
<u>Ocupacionales:</u>				
Disocianato de tolueno	DQA1*0104		0.05	Mapp y col., 2000
	DQB1*0503		0.018	
Anhídridos ácidos	DR3		0.004	Young y col., 1995
Látex (<i>Hevea brasiliensis</i>)	DR4		0.01	Rihs y col., 2002
	DQB1*0302		<7.1 x 10 ⁻⁴	
Animales de laboratorio	B16	Pr	<0.01	Sjostedt y col., 1996
<u>Venenos:</u>				
Avispa (<i>Vespula spp</i>)	DRB1*11	Pr	0.04	Faux y col., 1997
	DRB1*04		0.04	
Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	DRB1*07		0.02	Faux y col., 1997
<u>Alimentos:</u>				
Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	DRB1*08		0.0013	Boehncke y col., 1998
	DRB1*08		0.026	Howell y col., 1998
	DPB1*0301		0.00062	
Leche de vaca	DQ7		<0.01	Camponeschi y col, 1997
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	DRB1*12		<1 x 10 ⁻⁵	Boehncke y col., 1998
Parásito del pescado (<i>Anisikasis simplex</i>)	DRB1*1502		<3.4 x 10 ⁻⁷	Sánchez-Velasco y col., 2000
	DQB1*0601		<3.9 x 10 ⁻⁶	

3.2. Grupos de estudio

El diagnóstico y la selección de pacientes y controles se realizó tal como se describe en el capítulo anterior. En este estudio el grupo de pacientes asmáticos atópicos estaba constituido por un total de 213 pacientes (118 mujeres y 95 hombres) con edad media de 26 años. Estos pacientes se agruparon según el alérgeno al que eran sensibles en SPT. Como grupo control sano se utilizó el mismo grupo de 150 donantes.

3.3. Métodos

Para la tipificación de HLA clase I y II se emplearon los mismos reactivos y métodos ya descritos en el capítulo anterior. En el estudio de alta resolución para los alelos DRB1*01, y el tipaje de DRB1* y DQB1* realizado en algunas muestras, se empleó la técnica de PCR-SSP.

3.3.1. Reactivos utilizados en PCR-SSP

Colorante rojo cresol a 10 mg/mL (Sigma).

Glicerol al 99.5% (Sigma).

Reactivos para tipaje: DRB1 low resolution kit, DQB1* first y second set, y DRB1*01 high resolution kit* (Dynal, Oslo, Noruega), que contienen la batería de cebadores necesarios para realizar los tipajes específicos.

Solución dNTPs (Amershan Pharmacia Biotech) con 100mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP.

Tampón de PCR 10X (Boehringer Mannheim) suministrado por el proveedor de la polimerasa junto con ésta.

Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim).

3.3.2. Técnica de PCR-SSP

La técnica de la PCR-SSP emplea una estrategia distinta que la PCR-SSO para tipar, ya que en este caso cada muestra se ensaya con una batería de mezclas de

cebadores específicos de manera que cada una de las mezclas de esta batería amplifica uno o varios alelos de un determinado locus. Es importante señalar que en las determinaciones por PCR-SSP es necesario utilizar un control interno de amplificación en cada mezcla para estar seguros de que la falta de amplificación de la muestra con determinados cebadores no se debe a errores de procedimiento. Este control interno generalmente está constituido por una mezcla de cebadores que amplifican una porción de un locus no polimórfico, y normalmente se utiliza un fragmento del gen de la hormona del crecimiento. Los controles negativos son las mezclas en las que no se detecta amplificación específica, siempre que el control positivo interno amplifique adecuadamente.

Para realizar la amplificación PCR se prepara primeramente una mezcla con los componentes requeridos, cuyo volumen final depende del número de mezclas de cebadores que se requieran en el tipaje del locus en cuestión. Así, para 10 mezclas de cebadores se requiere combinar los siguientes reactivos: Tampón de PCR 1 X, 1.5 mM dNTPs, 10% glicerol, 20 pg rojo cresol, 4U de Taq ADN-polimerasa, ADN genómico (1 µg) y agua bidestilada hasta completar un volumen de 50 µL. La mezcla de todos los componentes se realiza en frío, y después de agitar convenientemente, se distribuyen 5 µL de la solución en cada tubo de 0.2 mL, donde previamente se han depositado 5 µL de las mezclas de cebadores con que se quiere analizar la muestra.

Una vez preparadas las muestras se introducen inmediatamente en el termociclador. Las condiciones de la amplificación utilizadas fueron las recomendadas por el proveedor de los reactivos (Dynal):

- a- Un primer ciclo de 2 minutos a 94°C para desnaturalizar proteínas que hubieran podido quedar en el medio procedentes de la extracción anterior del ADN.
- b- 10 ciclos compuestos de desnaturalización durante 10 segundos a 94°C para abrir las cadenas de ADN, alineamiento de los cebadores y extensión a 65°C durante 1 minuto.
- c- 20 ciclos compuestos de desnaturalización durante 10 segundos a 94°C para abrir las cadenas de ADN, alineamiento a 61° durante 50 segundos, y extensión durante 30 segundos a 72°C.
- d- Indefinidamente a 4°C después del último ciclo para conservar los amplificados en frío.

La visualización de los amplificadores requiere los mismos pasos y reactivos que se han explicado anteriormente para la PCR-SSO, con la diferencia que en este caso para cargar los amplificadores en el gel se utiliza todo el volumen de amplificación y no se requiere colorante de carga, ya que la misma mezcla de amplificación lleva el colorante rojo cresol incorporada y éste no interfiere con la Taq ADN polimerasa en el proceso de amplificación.

3.3.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico también se utilizó la prueba de chi cuadrado referida en el capítulo anterior. Los distintos grupos de alérgicos comparados estuvieron compuestos por un número mínimo de 30 muestras tipadas para cada uno de los loci HLA.

Los valores P se corrigieron multiplicando por el número de alelos analizados en cada locus (corrección de Bonferroni) (Svejgaard y col., 1994), considerándose significativos solamente los valores de P inferiores a 0.05. El cálculo del riesgo relativo (RR) se realizó siguiendo el método de Woolf (1955).

El factor etiológico (FE) indica la proporción de enfermos entre la población total atribuibles a cada alelo cuando su RR es mayor a 1, y se calcula mediante la fórmula: $FE = H(RR-1)/(1+H[RR-1])$, siendo H la frecuencia del alelo en la población control. Mientras que el factor preventivo (FP) hace referencia a la proporción en la reducción del número de casos de la población estudiada, debida a que un alelo presenta asociación negativa, cuando su RR es menor que 1 y se calcula como $FP = H(1-RR)$ (López-Larrea y col., 1995).

3.4. Resultados

El análisis de los distintos grupos de alérgicos extrínsecos, con relación a una respuesta cutánea positiva a alérgenos determinados, se realizó en aquellos grupos de reactividad frente a un alérgeno donde al menos se consiguió tipar 30 pacientes para todos los loci HLA. Así se realizaron un total de seis comparaciones para HLA clase I y ocho para HLA clase II entre el grupo control y los grupos de alérgicos extrínsecos tal como se detalla a continuación.

3.4.1. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Olea europaea*

En este grupo de pacientes, el tipaje de HLA clase I se realizó en 54 muestras, y de clase II en 118 muestras de pacientes alérgicos a olivo, cuyas frecuencias se recogen en las tablas 3.3 y 3.4.

Hay que destacar que al comparar este grupo de asmáticos extrínsecos con el grupo control se encontró una disminución de la frecuencia del alelo DRB1*11 en los pacientes (14% vs. 30%, $P=0.00063$; $P_c=0.0098$; $RR=0.37$; $FP=0.19$). Otras diferencias observadas en la comparación de estos dos grupos como la disminución del antígeno A2, el incremento del antígeno B18 y el alelo DRB1*03 en el grupo de pacientes respecto al de controles, perdían la significación estadística al ser corregidas.

3.4.2. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Alternaria alternata*

En este grupo se pudo realizar la tipificación en 33 pacientes para HLA clase I, y para clase II en 55 pacientes con sensibilización a extractos de *Alternaria alternata*.

Las frecuencias observadas se resumen en las tablas 3.3 y 3.4. Las diferencias encontradas en la comparación con el grupo control reflejan en el grupo de alérgicos, por un lado, un incremento de las frecuencias de los alelos DRB1*01 y DQB1*0501, y por otro una disminución del alelo DRB1*13. No obstante, ninguna de estas diferencias alcanzó significación estadística tras la corrección.

Tabla 3.3. Frecuencias fenotípicas observadas para los antígenos HLA de clase I (A, B, C) en los grupos de pacientes alérgicos a *Olea europaea* (n=54), *Alternaria alternata* (n=33) y en el grupo control (n=150).

Alelo	Olivo (n,%)	Alternaria (n,%)	Control (n,%)	P	Alelo	Olivo (n,%)	Alternaria (n,%)	Control (n,%)	P
A1	9 (17)	5 (15)	33 (22)	a	B51	5 (9)	3 (9)	16 (10)	
A2	17 (31)	11 (33)	77 (51)		B52	1 (2)	0 (0)	9 (5)	
A3	11 (20)	7 (21)	19 (12)		B53	0 (0)	2 (6)	4 (3)	
A23	2 (4)	3 (9)	9 (6)		B7	8 (15)	4 (12)	21 (13)	
A24	12 (22)	6 (18)	23 (15)		B8	5 (9)	4 (12)	23 (16)	
A11	11 (20)	5 (15)	20 (13)		B44	16 (30)	12 (36)	52 (35)	
A25	2 (4)	1 (3)	3 (1)		B45	1 (2)	0 (0)	4 (3)	
A26	2 (4)	2 (6)	10 (7)		B13	5 (9)	3 (9)	6 (4)	
A34	0 (0)	0 (0)	0 (0)		B14	11 (20)	8 (24)	17 (11)	
A28	1 (2)	2 (6)	11 (8)		B57	4 (7)	1 (3)	14 (10)	
A29	8 (15)	7 (21)	27 (18)		B58	1 (2)	0 (0)	3 (2)	
A30	11 (20)	6 (18)	16 (11)		B62	4 (7)	3 (9)	9 (6)	
A31	6 (11)	4 (12)	6 (3)		B63	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
A32	3 (6)	1 (3)	15 (10)		B18	14 (26)	6 (18)	19 (14)	
A33	6 (11)	1 (3)	7 (5)	B38	0 (0)	1 (3)	9 (6)		
A bl.	7 (13)	5 (15)	24 (16)	B39	2 (4)	0 (0)	9 (6)		
				B49	5 (9)	5 (15)	9 (6)		
Cw1	1 (2)	3 (9)	11 (7)	B50	2 (4)	0 (0)	7 (4)		
Cw2	6 (11)	3 (9)	10 (5)	B55	1 (2)	1 (3)	4 (3)		
Cw3	4 (7)	1 (3)	13 (9)	B56	0 (0)	0 (0)	4 (3)		
Cw4	12 (22)	11 (33)	29 (21)	B27	3 (6)	2 (6)	4 (3)		
Cw5	11 (20)	7 (21)	25 (19)	B35	7 (13)	5 (15)	22 (15)		
Cw6	8 (15)	3 (9)	23 (15)	B37	1 (2)	0 (0)	2 (1)		
Cw7	16 (30)	11 (33)	61 (40)	B60	2 (4)	0 (0)	3 (2)		
Cw8	9 (17)	6 (18)	10 (7)	B61	0 (0)	0 (0)	4 (3)		
C bl.	35 (65)	18 (54)	118 (78)	B41	3 (6)	1 (3)	6 (4)		
				B42	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
				B47	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
				B bl.	7 (13)	5 (15)	18 (12)		

a, P<0.05, Pc=No significativo

3.4.3. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Phleum pratense*

Este grupo de pacientes alérgicos a *Phleum pratense* quedó integrado por 36 pacientes tipados en HLA clase I y 90 tipados en clase II. Las frecuencias observadas se muestran en las tablas 3.5 y 3.6.

La comparación frente al grupo control mostró un incremento en la frecuencia del alelo DRB1*03 ($P=0.00204$) en el grupo de pacientes, que al corregirla mantiene su significación estadística ($P_c=0.0307$; $RR=2.06$). En contraste a lo observado para la alergia frente a alérgenos de olivo, se trataba de una diferencia que evidenciaba que el alelo DRB1*03 predominaba en pacientes sensibilizados frente a *Phleum*, por eso para este caso en lugar de calcular la FP, lo que se calculó fue la FE, para tratar de aproximar si realmente en pacientes con este genotipo se podía hablar de una predisposición a sufrir sensibilizaciones frente a *Phleum*. El valor de la fracción etiológica resultó ser igual a 0.18. Otras diferencias que se observaron como un incremento en la frecuencia del antígeno B18, y una disminución de las frecuencias de los alelos DRB1*11 y DQB1*0604 en este grupo de pacientes, aunque no mantenían la significación estadística al ser corregidas.

Tabla 3.4. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DRB1 y -DQB1 en los grupos de pacientes alérgicos a *Olea europaea* ($n=118$), *Alternaria alternata* ($n=55$) y en el grupo control ($n=150$).

Alelo DRB1*	Olea (n,%)	Altern. (n,%)	Control (n,%)	P	Alelo DQB1*	Olea (n,%)	Altern. (n,%)	Control (n,%)	P
01	34 (29)	21 (38)	29 (19)	a	0501	36 (36)	22 (40)	29 (19)	a
15	26 (22)	6 (11)	35 (23)		0502	1 (1)	1 (2)	7 (5)	
16	0 (0)	0 (0)	6 (4)		0503	3 (3)	1 (2)	5 (3)	
03	40 (34)	19 (35)	31 (21)	a	0601	5 (4)	1 (2)	4 (3)	
04	36 (31)	17 (31)	34 (23)		0602	23 (19)	5 (9)	31 (21)	
11	16 (14)	17 (31)	45 (30)	b	0603	8 (7)	3 (5)	16 (11)	
12	1 (1)	1 (2)	2 (1)		0604	4 (3)	1 (2)	13 (9)	
13	16 (14)	4 (7)	34 (23)	a	0605	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
14	3 (3)	1 (2)	6 (4)		02	66 (56)	29 (53)	79 (53)	
07	41 (35)	15 (27)	54 (36)		0301	30 (25)	23 (42)	56 (37)	
08	1 (1)	0 (0)	5 (3)		0302	26 (22)	11 (20)	26 (17)	
09	2 (2)	1 (2)	0 (0)		0303	7 (6)	4 (7)	2 (1)	
10	2 (2)	1 (2)	1 (1)		0402	0 (0)	0 (0)	2 (3)	

a, $P<0.05$, P_c =No significativo

b, Comparación Olivo vs. Control; $P=0.00063$, $P_c=0.0098$, $FP=0.19$

3.4.4. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Salsola kali*

En un total de 37 y 94 pacientes alérgicos a *Salsola kali* se analizaron las frecuencias antigénicas y alélicas de HLA clase I y II, respectivamente. Estas frecuencias se muestran en las tablas 3.5 y 3.6.

Una alta disminución en la frecuencia del alelo DRB1*11 ($P=0.00162$) fue encontrada en el grupo de pacientes, cuya significación estadística permanecía después de corregir por el número de alelos ($P_c=0.0211$; $RR=0.31$; $FP=0.29$). También se observó un descenso de la frecuencia del antígeno A2, y un incremento de las frecuencias de los alelos DRB1*01 y DQB1*0501 en el grupo de pacientes, aunque sin que alcanzaran significación estadística al ser corregidas.

Tabla 3.5. Frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA de clase I (A, B, C) en los grupos de pacientes alérgicos a *Phleum pratense* ($n=36$), *Salsola kali* ($n=37$) y grupo control ($n=150$).

Alelo	Phleum (n, %)	Salsola (n, %)	Control (n, %)	P	Alelo	Phleum (n, %)	Salsola (n, %)	Control (n, %)
A1	8 (22)	5 (14)	33 (22)	a	B51	3 (8)	2 (5)	16 (10)
A2	12 (33)	11 (30)	77 (51)		B52	0 (0)	1 (3)	9 (5)
A3	6 (17)	6 (16)	19 (12)		B53	1 (3)	0 (0)	4 (3)
A23	3 (8)	3 (8)	9 (6)		B7	3 (8)	4 (11)	21 (13)
A24	10 (28)	11 (30)	23 (15)		B8	5 (14)	3 (8)	23 (16)
A11	3 (8)	7 (19)	20 (13)		B44	11 (30)	10 (27)	52 (35)
A25	3 (8)	0 (0)	3 (1)		B45	2 (6)	2 (5)	4 (3)
A26	1 (3)	1 (3)	10 (7)		B13	4 (11)	3 (8)	6 (4)
A34	0 (0)	0 (0)	0 (0)		B14	3 (8)	8 (22)	17 (11)
A28	0 (0)	2 (5)	11 (8)		B57	3 (8)	3 (8)	14 (10)
A29	7 (19)	6 (16)	27 (18)		B58	0 (0)	1 (3)	3 (2)
A30	6 (17)	8 (22)	16 (11)		B62	2 (6)	4 (11)	9 (6)
A31	5 (14)	5 (14)	6 (3)		B63	0 (0)	0 (0)	1 (1)
A32	0 (0)	2 (5)	15 (10)		B18	12 (33)	10 (27)	19 (14)
A33	2 (6)	3 (8)	7 (5)		B38	0 (0)	0 (0)	9 (6)
A bl.	5 (14)	4 (11)	24 (16)		B39	1 (3)	2 (5)	9 (6)
					B49	6 (17)	5 (14)	9 (6)
					B50	1 (3)	2 (5)	7 (4)
Cw1	0 (0)	1 (3)	11 (7)		B55	0 (0)	0 (0)	4 (3)
Cw2	2 (6)	4 (11)	10 (5)		B56	0 (0)	0 (0)	4 (3)
Cw3	3 (8)	3 (8)	13 (9)	B27	1 (3)	2 (5)	4 (3)	
Cw4	8 (22)	10 (27)	29 (21)	B35	4 (11)	3 (8)	22 (15)	
Cw5	10 (28)	7 (19)	25 (19)	B37	1 (3)	1 (3)	2 (1)	
Cw6	6 (17)	5 (14)	23 (15)	B60	3 (8)	2 (5)	3 (2)	
Cw7	12 (33)	11 (30)	61 (40)	B61	0 (0)	0 (0)	4 (3)	
Cw8	4 (11)	5 (14)	10 (7)	B41	1 (3)	2 (5)	6 (4)	
C bl.	23 (64)	24 (65)	118 (78)	B42	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
				B47	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
				B bl.	5 (14)	4 (11)	18 (12)	

a, $P<0.05$, P_c =No significativo

Tabla 3.6. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DRB1 y -DQB1 en los grupos de pacientes alérgicos a *Phleum pratense* (n=90), *Salsola kali* (n=94) y el grupo control (n=150).

Alelo DRB1*	Phleum (n,%)	Salsola (n, %)	Control (n,%)	P	Alelo DQB1*	Phleum (n,%)	Salsola (n, %)	Control (n,%)	P
01	22 (24)	32 (34)	29 (19)	a	0501	24 (27)	34 (36)	29 (19)	a
15	20 (22)	20 (21)	35 (23)		0502	0 (0)	1 (1)	7 (5)	
16	0 (0)	0 (0)	6 (4)		0503	1 (1)	1 (1)	5 (3)	
03	35 (39)	28 (30)	31 (21)	b	0601	3 (3)	5 (5)	4 (3)	
04	29 (32)	26 (28)	34 (23)		0602	18 (20)	17 (18)	31 (21)	
11	14 (16)	11 (12)	45 (30)	a,c	0603	9 (10)	10 (11)	16 (11)	
12	1 (1)	1 (1)	2 (1)		0604	1 (1)	4 (4)	13 (9)	a
13	17 (19)	20 (21)	34 (23)		0605	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
14	1 (1)	1 (1)	6 (4)		02	47 (52)	48 (51)	79 (53)	
07	22 (24)	26 (28)	54 (36)		0301	31 (34)	23 (24)	56 (37)	
08	2 (2)	3 (3)	5 (3)		0302	19 (21)	18 (19)	26 (17)	
09	3 (3)	2 (2)	0 (0)		0303	6 (7)	4 (4)	2 (1)	
10	3 (3)	2 (2)	1 (1)		0402	1 (1)	2 (2)	2 (3)	

a, $P < 0.05$, $P_c = \text{No significativo}$

b, Phleum vs. Control; $P = 0.00204$, $P_c = 0.0307$, $FE = 0.18$

c, Salsola vs. Control; $P = 0.00162$, $P_c = 0.0211$, $FP = 0.29$

3.4.5. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*

El tipaje HLA clase I pudo ser estudiado en 37 pacientes alérgicos a ácaros, y en 85 para HLA clase II. Las frecuencias resultantes de este análisis se muestran en las tablas 3.7 y 3.8.

Ninguna de las diferencias observadas en la comparación con los controles alcanzó significación estadística. Tanto la disminución de la frecuencia del antígeno A2, como el incremento de B18 y B60 en los pacientes, perdían la significación estadística después de la corrección por el número de alelos tipados.

Tabla 3.7. Frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA de clase I (A, B, C) en el grupo de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* (n=37), *Artemisia vulgaris* (n=33) y el grupo control (n=150).

Alelo	Dermatop. (n,%)	Artemisia (n,%)	Control (n,%)	P	Alelo	Dermatop. (n,%)	Artemisia (n,%)	Control (n,%)
A1	6 (16)	4 (12)	33 (22)	a	B51	3 (8)	2 (5)	16 (10)
A2	9 (24)	9 (27)	77 (51)		B52	0 (0)	1 (3)	9 (5)
A3	10 (27)	10 (30)	19 (12)		B53	1 (3)	0 (0)	4 (3)
A23	1 (3)	1 (3)	9 (6)		B7	3 (8)	4 (11)	21 (13)
A24	8 (22)	8 (24)	23 (15)		B8	5 (14)	3 (8)	23 (16)
A11	6 (16)	6 (18)	20 (13)		B44	11 (30)	10 (27)	52 (35)
A25	1 (3)	1 (3)	3 (1)		B45	2 (6)	2 (5)	4 (3)
A26	2 (5)	2 (6)	10 (7)		B13	4 (11)	3 (8)	6 (4)
A34	0 (0)	0 (0)	0 (0)		B14	3 (8)	8 (22)	17 (11)
A28	2 (5)	2 (6)	11 (8)		B57	3 (8)	3 (8)	14 (10)
A29	6 (16)	8 (24)	27 (18)		B58	0 (0)	1 (3)	3 (2)
A30	8 (22)	6 (18)	16 (11)		B62	2 (6)	4 (11)	9 (6)
A31	5 (14)	2 (6)	6 (3)		B63	0 (0)	0 (0)	1 (1)
A32	2 (5)	6 (18)	15 (10)		B18	12 (33)	10 (27)	19 (14)
A33	3 (8)	3 (9)	7 (5)		B38	0 (0)	0 (0)	9 (6)
A bl.	4 (11)	4 (12)	24 (16)		B39	1 (3)	2 (5)	9 (6)
					B49	6 (17)	5 (14)	9 (6)
Cw1	1 (3)	1 (3)	11 (7)	B50	1 (3)	2 (5)	7 (4)	
Cw2	4 (11)	2 (6)	10 (5)	B55	0 (0)	0 (0)	4 (3)	
Cw3	6 (16)	2 (6)	13 (9)	B56	0 (0)	0 (0)	4 (3)	
Cw4	8 (22)	8 (24)	29 (21)	B27	1 (3)	2 (5)	4 (3)	
Cw5	9 (24)	6 (18)	25 (19)	B35	4 (11)	3 (8)	22 (15)	
Cw6	2 (5)	4 (12)	23 (15)	B37	1 (3)	1 (3)	2 (1)	
Cw7	10 (27)	7 (21)	61 (40)	B60	3 (8)	2 (5)	3 (2)	
Cw8	3 (8)	4 (12)	10 (7)	B61	0 (0)	0 (0)	4 (3)	
C bl.	26 (70)	15 (45)	118 (78)	B41	1 (3)	2 (5)	6 (4)	
				B42	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
				B47	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
				B bl.	5 (14)	4 (11)	18 (12)	

a, P<0.05, Pc=No significativo

3.4.6. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Artemisia vulgaris*

En un total de 33 y 81 muestras procedentes de pacientes alérgicos a *Artemisia vulgaris* se estudiaron los antígenos HLA clase I y II, respectivamente. Estas frecuencias se presentan en las tablas 3.7 y 3.8.

Al comparar este grupo de pacientes con el grupo de controles se encuentran las mayores diferencias de todas las comparaciones realizadas. Así se observó un fuerte

incremento de la frecuencia de DRB1*01 y DQB1*0501 en pacientes ($P=0.00000401$ y $P=0.00000169$), que conservaba la significación estadística al ser corregida ($P_c=0.000052$ y $P_c=0.000023$). Los riesgos relativos y fracciones etiológicas eran muy similares para ambos alelos: $RR=4.07$ y $FE=0.37$ para DRB1*01; $RR=4.27$ y $FE=0.38$ para DQB1*0501. Las otras diferencias observadas en la comparación de estos dos grupos como la disminución de los alelos DRB1*11, DRB1*13 y DQB1*0604, así como el incremento del alelo DQB1*0303 en el grupo de pacientes respecto a controles, no muestran significación estadística al ser corregidas.

Con el fin de precisar si las diferencias observadas en el caso de DRB1*01 eran debidas a algún subtipo de ese grupo se procedió al estudio de alta resolución por medio de PCR-SSP del alelo DRB1*01. Este estudio se pudo realizar en 40 pacientes alérgicos a *Artemisia vulgaris* y en 29 controles que portaban dicho alelo. En la tabla 3.9 se recogen los resultados de las frecuencias génicas de ambos grupos. Tras proceder a la comparación no se encontraron diferencias significativas que demostraran la prevalencia de la enfermedad en relación con algún subtipo de DRB1*01. No obstante, sí se observó una mayor frecuencia del alelo DRB1*0103 en pacientes.

Tabla 3.8. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DR y -DQ en el grupo de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* ($n=85$), *Artemisia vulgaris* ($n=81$) y el grupo control ($n=150$).

Alelo DRB1*	Dermat. (n,%)	Artemisia (n,%)	Control (n,%)	P	Alelo DQB1*	Dermat. (n,%)	Artemisia (n,%)	Control (n,%)	P
01	22 (26)	40 (49)	29 (19)	b	0501	25 (29)	41 (51)	29 (19)	c
15	18 (21)	16 (20)	35 (23)		0502	2 (2)	1 (1)	7 (5)	
16	2 (2)	0 (0)	6 (4)		0503	1 (1)	0 (0)	5 (3)	
03	25 (29)	23 (28)	31 (21)		0601	4 (5)	3 (4)	4 (3)	
04	28 (33)	23 (28)	34 (23)		0602	14 (16)	15 (19)	31 (21)	
11	17 (20)	12 (15)	45 (30)	a	0603	11 (13)	4 (5)	16 (11)	
12	0 (0)	0 (0)	2 (1)		0604	2 (2)	0 (0)	13 (9)	a
13	14 (16)	9 (11)	34 (23)	a	0605	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
14	1 (1)	0 (0)	6 (4)		02	42 (49)	40 (49)	79 (53)	
07	24 (28)	23 (28)	54 (36)		0301	27 (32)	21 (26)	56 (37)	
08	0 (0)	2 (2)	5 (3)		0302	16 (19)	16 (20)	26 (17)	
09	1 (1)	1 (1)	0 (0)		0303	5 (6)	7 (9)	2 (1)	a
10	3 (4)	1 (1)	1 (1)		0402	0 (0)	1 (1)	2 (3)	

a, $P<0.05$, P_c =No significativo

b, Artemisia vs. Control; $P=0.00000401$, $P_c=0.000052$, $FE=0.37$

c, Artemisia vs. Control; $P=0.00000169$, $P_c=0.000023$, $FE=0.38$

Tabla 3.9. Estudio de alta resolución del alelo DRB1*01 en muestras de pacientes alérgicos a *Artemisia vulgaris* y controles.

Subtipos de DRB1* 01	Pacientes (2n=80,%)	Controles (2n=58,%)
DRB1*0101	21 (26)	16 (27)
DRB1*0102	13 (16)	10 (17)
DRB1*0103	9 (11)	4 (7)
DRB1*0104	0	0

3.4.7. Asmáticos extrínsecos alérgicos a *Parietaria judaica*

Debido a que el número de pacientes donde se pudo realizar el análisis de HLA clase I no llegó a 30, tan sólo se recoge la comparación realizada para 41 muestras de pacientes alérgicos a *Parietaria judaica* tipadas en HLA de clase II, cuya frecuencia se presenta en la tabla 3.10.

Este grupo de pacientes alérgicos mostraba un aumento de la frecuencia de los alelos DRB1*01 y DQB1*0501 en los pacientes ($P=0.00086$ y $P=0.00028$, respectivamente), que permanece con significación estadística después de la corrección por el número de alelos analizados ($P_c=0.0113$ y $P_c=0.0043$, respectivamente). Los valores obtenidos para el RR y la FE fueron: $RR=3.60$ y $FE=0.33$ para DRB1*01, y $RR=3.97$ y $FE=0.36$ para DQB1*0501.

3.4.8. Asmáticos extrínsecos alérgicos a epitelio de gato

En este caso las muestras disponibles para analizar HLA clase I tampoco llegaban a 30, por eso sólo se compararon las 34 muestras de pacientes alérgicos a epitelio de gato tipificados para HLA de clase II, cuya frecuencia se muestra en la tabla 3.10. No se encontraron diferencias en la comparación de este grupo de alérgicos y el de controles.

Tabla 3.10. Frecuencias genotípicas de los alelos HLA-DR y -DQ en el grupo de pacientes alérgicos a *Parietaria judaica* (n=41), epitelio de gato (n=34) y el grupo control (n=150).

Alelo DRB1*	Parietaria (n, %)	Ep. gato (n, %)	Control (n,%)	P	Alelo DQB1*	Parietaria (n, %)	Ep. gato (n, %)	Control (n,%)	P
01	19 (46)	8 (24)	29 (19)	a	0501	20 (49)	9 (26)	29 (19)	b
15	8 (20)	6 (18)	35 (23)		0502	1 (2)	1 (3)	7 (5)	
16	0 (0)	1 (3)	6 (4)		0503	1 (2)	0 (0)	5 (3)	
03	12 (29)	9 (26)	31 (21)		0601	1 (2)	0 (0)	4 (3)	
04	9 (22)	13 (38)	34 (23)		0602	8 (20)	7 (21)	31 (21)	
11	12 (29)	9 (26)	45 (30)		0603	2 (5)	3 (9)	16 (11)	
12	0 (0)	0 (0)	2 (1)		0604	0 (0)	0 (0)	13 (9)	
13	4 (10)	5 (15)	34 (23)		0605	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
14	1 (2)	0 (0)	6 (4)		02	21 (51)	15 (44)	79 (53)	
07	10 (24)	7 (21)	54 (36)		0301	14 (34)	14 (41)	56 (37)	
08	0 (0)	0 (0)	5 (3)		0302	6 (15)	10 (29)	26 (17)	
09	2 (5)	0 (0)	0 (0)		0303	3 (7)	2 (6)	2 (1)	
10	1 (2)	1 (3)	1 (1)		0402	0 (0)	0 (0)	2 (3)	

a, Parietaria vs. Control; P=0.00086, Pc=0.0113, FE=0.33

b, Parietaria vs. Control; P=0.00028, Pc=0.0043, FE=0.36

3. 5. Discusión

En esta parte del trabajo se ha encontrado una fuerte asociación entre el asma alérgico a *Artemisia vulgaris* y los alelos DRB1*01 y DQB1*0501. Además, en nuestra población también se observan otra serie de asociaciones estadísticamente significativas como la asociación entre la alergia a *Parietaria judaica* con los alelos DRB1*01-DQB1*0501, el incremento del alelo DRB1*03 en pacientes con asma alérgico a *Lolium perenne*, y el efecto protector que puede ser asignado al alelo DRB1*11 para proteger frente a la sensibilización a *Salsola kali* y *Olea europaea*. Lo mismo que en la mayoría de estudios previos todas las asociaciones encontradas lo son con alelos de clase II.

La asociación observada en nuestro estudio entre el HLA-DR3 y la alergia a *Phleum pratense* podría deberse a un alérgeno común en el polen de gramíneas, ya que estudios previos habían demostrado que este alelo estaba asociado con la respuesta alérgica al *Lolium perenne* (Freidhott y col., 1988). No obstante, hay que hacer constar que en dicho estudio se analizaba la respuesta de IgE contra los alérgenos Lol p 1-3. Las determinaciones de IgE alérgeno específicas han sido ampliamente utilizadas en los estudios sobre el papel de los alelos HLA en la alergia (Young y col., 1994; Tautz y col., 1994; Cárdbaba y col., 1993), pero en el presente estudio se ha utilizado para el diagnóstico la prueba cutánea *in vivo*, por ser ésta la que se emplea normalmente en el diagnóstico clínico y que también se ha empleado en otros estudios en relación con el sistema HLA (Lara-Márquez y col., 1999; Donfack y col., 2000).

Con respecto a la alergia frente a *Parietaria*, se había descrito previamente una asociación entre la respuesta a *Parietaria officinalis* y el alelo DRB1*11 en la población española e italiana (D'Amato y col., 1996; Ruffilli y col., 1999). La especie de *Parietaria* empleada en el presente estudio para el diagnóstico fue *P. judaica*, ya que es la predominante en nuestro entorno. Ambas especies presentan una alta homología y son intercambiables tanto en el diagnóstico como en la inmunoterapia (Corbi y col., 1985). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha podido demostrar ninguna asociación con el alelo DRB*11. En cambio, se observó un aumento de la frecuencia de los alelos DRB1*01 y DQB1*0501 ($P_c=0.0113$ y $P_c=0.0043$, respectivamente) en los pacientes sensibles a *Parietaria*, lo que coincidía con lo observado en pacientes asmáticos que mostraban sensibilización frente a *Artemisia*. Cuando se hizo un análisis diferenciando

los pacientes que eran sensibles a *Artemisia* sin compartir sensibilización frente a Parietaria, la asociación con el alelo DRB1*01 con *Artemisia vulgaris* permanecía con alta significación. Sin embargo, no ocurría lo mismo cuando se analizaban los casos sensibilizados a Parietaria sin que se acompañaran de pruebas cutáneas positivas a *Artemisia*, ya que en esta situación no se confirmaba la existencia de una relación significativa entre Parietaria y DRB1*01-DQB1*0501. Por ahora, dado que el número de casos con sensibilización única a Parietaria era reducido y algunos presentaban doble sensibilización a Parietaria y *Artemisia*, no es posible discernir si la asociación inicialmente observada con DRB1*01-DQB1*0501 es por reacción cruzada con el polen de *Artemisia*, que ha sido descrita en algunos estudios (Heiss y col., 1998; Strumvoll y col., 2003). Sería necesario la ampliación del estudio a una serie mayor para la demostración de que estos alelos también se asocian a Parietaria.

En el caso de la alergia a *Olea europaea* se ha descrito una asociación con los alelos DR3, DR7 y DQ2 en diversas poblaciones, incluida la española (Cárdaba y col., 1993 y 1996). De hecho, la frecuencia del alelo DRB1*03 aparecía también incrementada en nuestra serie, pero este aumento no llegaba a alcanzar significación estadística después de utilizar la corrección de Bonferroni. La única asociación significativa con *Olea europaea* encontrada en nuestro estudio fue el efecto protector del alelo DRB1*11 ($P_c=0.01$). Este mismo alelo también se encuentra disminuido en los pacientes alérgicos a *Salsola kali*, aunque con menor significación ($P_c=0.02$). Estos datos parecen sugerir que pueda existir homología entre ambos alérgenos, aunque los riesgos relativos y las fracciones preventivas no son muy elevados, y dicho alelo también estaba disminuido en el total de alérgicos (tanto intrínsecos como extrínsecos) tal como se reflejaba en el capítulo anterior. Por otro lado, conviene aclarar que buena parte de los pacientes alérgicos a Olivo lo eran también a *Salsola*, y que al segregar los que sólo respondían a uno de los alérgenos la asociación con DRB1*11 desaparecía. La explicación, como en el caso de Parietaria, podría ser que la reducción del número de casos fuera limitante para ver una relación con significación estadística.

No se confirmó ninguna asociación en otros tipos de asma atópico, como la alergia a ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*) que se había asociado previamente en varios trabajos con los alelos DR3, DR7 y DR11 (Stephan y col., 1996; Lara-Márquez y col., 1999; Kim y col., 2001), ni a hongos como *Alternaria alternata* descrito asociado

con DR4 (Marsh y col., 1992; Young y col., 1994), o a epitelios de animales como el DR1 asociado con respuesta alérgica provocada por el epitelio de gato (Young y col., 1994). Esta disparidad de resultados puede deberse a diferencias en el diseño de estudio, como son el origen étnico, el empleo de las pruebas cutáneas para el diagnóstico, o la selección de pacientes monosensibilizados.

Con respecto a los resultados de los pacientes alérgicos a *Artemisia*, las asociaciones con los alelos DRB1*01 y DQB1*0501 fueron las más relevantes de las encontradas en nuestro trabajo ($P_c=0.000052$ y $P_c=0.000023$, respectivamente). En un estudio posterior a nuestros primeros resultados (Torío y col., 1998), donde se describían los determinantes antigénicos de un nuevo alérgeno de la *Artemisia vulgaris* (Art v 1), se sugería que la respuesta a este antígeno podría estar asociada a la presencia de los alelos DRB1*01 y DRB1*16 (Jahn-Schmid y col., 2002). Sin embargo, nuestros resultados no confirman la asociación con el alelo DRB1*16 de esa pequeña muestra de pacientes, ya que no se encontró ningún paciente que portara dicho alelo. Los alelos DRB1*01 y DQB1*0501 se encuentran en desequilibrio de ligamiento en nuestra población (Muro y col., 2001), lo que explicaría que tanto la significación como los valores de RR y FE sean muy similares. El hecho que la asociación con el alelo DQB1*0501 tenga una significación algo mayor se debe a un único caso de un paciente que era portador de DRB1*10, el cual también está en desequilibrio de ligamiento con el DQB1*0501 (Muro y col., 2001). Podría por tanto discutirse que el alelo que predisponga fuese DQB1*0501, y la asociación con DRB1*01 fuese secundaria al desequilibrio de unión existente entre ambos alelos. Sin embargo, existen varias asociaciones descritas entre el alelo DRB1*01 y la respuesta a ciertos alérgenos, como el caso de la sensibilización a alérgenos de cucaracha (*Periplatea americana* y *Blattella germanica*) (Donfack y col., 2000) y a las hemoglobinas del insecto *Chironomus thummi* (Chi t 1) (Tautz y col., 1994) como parte del haplotipo extendido DRB1*01-DQB1*0501-DQA1*05. El desequilibrio de ligamiento existente en estas poblaciones de distinto origen étnico, y los resultados de los experimentos *in vitro* demostraron que en estas asociaciones implicaban a los alelos de DRB1*01, en vez del DQB1*0501.

Para profundizar en el estudio de esta asociación e investigar si se podía asignar dicha asociación al alelo DRB1*01 o al DQB1*0501, se recurrió al tipaje de alta resolución para determinar la frecuencia de los subtipos de DRB1*01 (tabla 3.10). Sin

embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto a las observadas en la población control para ninguno de los alelos. Aunque sí se observaba un incremento del alelo DRB1*0103 en los pacientes (11% vs. 7%). Puede que las diferencias de secuencia entre los alelos de DRB1*01 no sean determinantes en la asociación y que ésta se deba a otro epítipo, o que la asociación sea únicamente con el alelo DQB1*0501. Si bien, también es posible, que la asociación se deba a un efecto acumulativo de ambos alelos, tal como se ha apuntado en otros estudios (Cardaba y col., 1993). Es de destacar que en el trabajo de Jahn-Schmid y col. (2002), de las 12 muestras tipadas para el HLA-DR de alta resolución y el HLA-DQ de baja resolución, hay 10 que son DQ1*05 (83%). El alelo DRB1*1601 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con DQB1*0502, dando como resultado que el 50% de dichas muestras fuesen tipadas como homocigotas DQB1*05. Aunque ese artículo se centra en el papel de las moléculas de DR a la vista de sus resultados en los experimentos de inhibición, no es descartable que las moléculas de DQ tengan un papel importante en la respuesta al alérgeno Art v 1, especialmente teniendo en cuenta el alto número de muestras homocigotas para DQB1*05. En un análisis realizado sobre un tipaje HLA-DQB1* de baja resolución en nuestra muestra de pacientes también se obtendría significación estadística (52% vs. 27%, $P=0.0036$, $P_c=0.018$), aunque con una menor significación que el estudio de alta resolución, a pesar de que la corrección de Bonferroni se realiza multiplicando por un menor número de alelos.

En conclusión, estos resultados sugieren que el sistema HLA, y especialmente las moléculas de clase II, parecen jugar un papel relevante tanto para la predisposición o susceptibilidad al asma alérgico en nuestra población. En particular en la alergia a *Artemisia vulgaris* este papel es más claro tal como se demuestra por la alta significación de la asociación encontrada en el presente trabajo. Este hecho, y el que sea la primera vez que se confirmaba una asociación con el asma alérgico a *Artemisia vulgaris*, nos hizo centrarnos en su estudio. Para ello se decidió purificar dos alérgenos mayoritarios del polen de *Artemisia vulgaris* y realizar diversas determinaciones de inmunoglobulinas específicas y estudios funcionales *in vitro* dirigidos a valorar la respuesta de pacientes asmáticos que poseían el haplotipo DRB1*01-DQB1*0501 y en aquellos que no lo portaban, tal como se describe en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA A LOS ALERGENOS DE *ARTEMISIA VULGARIS* DEPENDIENTE DEL HAPLOTIPO HLA-DRB1*01-DQB1*0501

4.1. Introducción

Las estrategias en el estudio del papel de los linfocitos T en el desarrollo de las enfermedades atópicas han incluido tanto experimentos con clones, como con líneas celulares, o células mononucleares de sangre periférica (Higgins y col., 1994; O'Brien y col., 1994; Katsuki y col., 1996). Y la respuesta celular ha sido estudiada en diversos ensayos contra una larga serie de alergenios, como las proteínas de los ácaros del polvo (Wierenga y col., 1990; Yssel y col., 1992), de veneno de insectos himenópteros (Carballido y col., 1992), epitelio de gato (van Neer y col., 1994), y pólenes de la familia de las gramíneas (Baskar y col., 1992; Spiegelberg y col., 1994), compuestas (Huang y col., 1991), y betuláceas (Ebner y col., 1995). Todos estos experimentos han ayudado a establecer los determinantes antigénicos primordiales para la respuesta inmune, y a clarificar el papel de las moléculas HLA en dicha respuesta específica (van Neerven y col., 1996). El conocimiento de estos mecanismos, junto con la disponibilidad de alergenios recombinantes ha abierto la posibilidad de una inmunoterapia más eficaz por medio de la vacunación con los péptidos más antigénicos, como ha sido el caso de los tratamientos empleados en pacientes alérgicos a epitelio de gato o veneno de abeja (Norman y col., 1996; Texier y col., 2000).

En la Región de Murcia los alergenios más reactivos son los de Olivo (68.4%), Gramíneas (55.1%), Parietaria (51%), Salsola (49.5%), Artemisia (23.5%) y Plantago (17.9%) (Pagán y col., 1996). Las Artemisias (también conocidas como "bojas") pertenecen a la familia de las Asteráceas o Compuestas, que es una de las mayores familias de plantas con flores, de distribución universal y con más de 25000 especies. Incluyen plantas que son importantes para el hombre como alimento (lechuga, girasol, etc.), ornamentales (crisantemos, dalias, etc.) y medicinales (manzanilla, árnica). La gran mayoría de las Compuestas dispersan su polen con la intervención de insectos, y sólo unos pocos géneros dispersan su polen por medio del viento. De entre éstos, Artemisia y Ambrosia son tan importantes por sí mismos que dan a la familia de las Compuestas un gran protagonismo en la polinosis. La Ambrosia es una planta

americana cuyo polen es el más alergénico en el continente americano, siendo prácticamente inexistente en Europa. La *Artemisia* es un tipo de arbusto, cuyo género contiene más de 200 especies repartidas por todo el mundo, y que ha sido empleada en la medicina tradicional china como tratamiento contra la malaria desde hace miles de años. En España se encuentran 20 especies, ocupando diversos ambientes, aunque son más frecuentes los de lugares secos, degradados y nitrificados (Munuera y col., 2001). En Europa central su polinización ocurre al final de Junio y durante Agosto, pero en las áreas mediterráneas la polinización ocurre principalmente en Septiembre y Octubre (Spieksma y col., 1988). En la Región de Murcia, a causa de su caluroso clima, también existe una importante polinización en el invierno (desde Septiembre a Febrero), que no ha sido descrito en otras partes de Europa (Munuera y col., 1998). La especie de *Artemisia vulgaris* es la empleada habitualmente para el diagnóstico, aunque en España tan solo existe en la cornisa cantábrica. En la Región de Murcia se encuentran 8 especies, destacando por su abundancia y extensión la *A. barrelieri* ("boja entina" o "tomillo negro"), la *A. herba-alba* ("boja blanca") y la *A. campestris* ("boja negra" o "ajenjo de mar"). Al final del verano florece la especie *A. campestris*, que alcanza su máximo en Septiembre, mientras que *A. herba-alba* florece en Octubre y Noviembre. El polen de la especie *A. barrelieri* es el que se encuentra en mayor cantidad, y florece durante el invierno, desde Noviembre a principios de Febrero (Munuera y col., 2001).

Dentro de la fracción soluble del polen de *Artemisia vulgaris* hay al menos 9 alérgenos (Ipsen y col., 1985). Algunos de ellos han sido purificados y caracterizados (tabla 4.1), aunque hasta fechas muy recientes no se ha conseguido clonar y secuenciar completamente dos de sus alérgenos (Art v 1 y 4) (Himly y col., 2003; Wopfner y col., 2002). Anteriormente sólo se habían podido secuenciar los 71 y 39 aas N-terminales, respectivamente, de los aproximadamente 300 y 100 aas que tienen los alérgenos Art v 2 y 3 (Nilsen y col., 1990; Díaz-Perales y col., 2000). El bloqueo existente en el extremo N-terminal del alérgeno mayoritario Ag 13 de 47-60 kDa (anteriormente identificado como Art v I) ha impedido su secuenciación, por lo que no puede ser reconocido por el *Allergen Nomenclature Sub-Committee*, si bien el 70% de los enfermos alérgicos a *Artemisia* presentan reactividad IgE contra este alérgeno (De la Hoz y col., 1990).

Para estudiar si el comportamiento de los linfocitos de los pacientes alérgicos a *Artemisia vulgaris* dependía de la presencia de los alelos DRB1*01-DQB1*0501, se procedió a la purificación de dos de los alérgenos mayoritarios presentes en el polen, y se cuantificó la presencia de inmunoglobulinas séricas contra dichos alérgenos, además de realizarse una serie de experimentos *in vitro* dirigidos a investigar tanto su influencia en la respuesta proliferativa, como en la producción de IgE.

Tabla 4.1. Alérgenos de *Artemisia vulgaris* reconocidos por el *Allergen Nomenclature Sub-Committee* de la *International Union of Immunological Societies*.

Alérgeno	Tipo de proteína y tamaño	Secuenciación	Referencia
Art v 1	Defensina, 27-29 kDa	Completa	Himly y col., 2002
Art v 2 (antes Ag 7)	Glicoproteína con dos subunidades de 20 kDa	Parcial	Nilsen y col., 1991a
Art v 3	Proteína de la familia LTP (<i>lipid transfer proteins</i>), 12 kDa	Parcial	Díaz-Perales y col., 2000
Art v 4	Proteína de unión a actina, 14 kDa	Completa	Wopfner y col., 2002

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Muestras para las determinaciones séricas

Para las diferentes determinaciones de inmunoglobulinas (IgG, subclases de IgG, IgE, IgE específica, IgG e IgE específicas a Art v 2 y Ag 13) se les extrajo una muestra de suero durante su primera visita a la consulta de alergia a un total de 60 pacientes asmáticos con prueba cutánea positiva a *Artemisia vulgaris*, antes de que hubieran recibido tratamiento con inmunoterapia.

4.2.2. Cuantificación de inmunoglobulinas por nefelometría

Para la determinación de las inmunoglobulinas IgG, IgE y subclases de IgG séricas se utilizó un nefelómetro BN II (Dade Behring, Liederbach, Alemania), con

reactivos de la misma firma comercial. El principio de la nefelometría se basa en la medición de la luz dispersada al incidir un haz de luz sobre un fluido que contenga macromoléculas formando complejos. Este incremento en la luz dispersada, que se produce al formarse los complejos antígeno-anticuerpo en la disolución, resulta cuantificable por extrapolación a una curva de referencia. Para elaborar las diversas curvas de referencia el nefelómetro realiza automáticamente una serie de diluciones de un estándar constituido por una mezcla liofilizada de sueros humanos de concentración conocida, posteriormente realiza una incubación durante 12 minutos para IgG y 30 para IgE, con el anticuerpo de conejo específico de la clase de inmunoglobulina que se quiera medir, para después calcular la concentración de las muestras y controles en la curva de referencia respectiva.

4.2.3. Cuantificación de IgE específica anti *Artemisia vulgaris*

Para el cálculo de la IgE específica de alérgeno se utilizó un equipo automático (Pharmacia CAP System, Uppsala, Suecia) existente en la Servicio de Alergia de nuestro hospital, y todos los reactivos y diluyentes empleados fueron suministrados por la misma casa comercial. Este sistema está diseñado como un inmunoensayo fluorescente donde los alérgenos se encuentran en una fase sólida consistente en un polímero hidrofílico y flexible encapsulado llamado ImmunoCAP, en nuestro caso ImmunoCAP-w6 con alérgenos de *A. vulgaris*. Sobre esta fase sólida el aparato realiza de forma automática, una incubación con el suero problema sin diluir, y tras una serie de lavados adiciona una anti-IgE conjugada con β -galactosidasa que al incubarse con su sustrato genera una fluorescencia medible y extrapolable a una curva de referencia donde se determinan las unidades alérgicas del suero problema. El límite inferior de detección de este método es de 0.35 kU/L, siendo considerados como negativos o RAST clase 0 las muestras con valor inferior a 0.35 kU/L. Se consideran positivos los superiores a este valor y se clasifican en cuatro categorías: RAST clase I de 0.35 a 0.7, clase II de 0.7 a 3.5, clase III de 3.5 a 17.5 y clase IV superiores a 17.5 kU/L.

4.2.4. Purificación de proteínas de *Artemisia vulgaris*

Para la realización de los experimentos *in vitro* de proliferación y producción de IgE, además de para valorar de forma más concreta el nivel de IgE específica en el suero de los pacientes, se procedió a la purificación de las dos proteínas antigénicas mayoritarias: Ag 13 de 47-60 kDa y Art v 2 de 20 kDa presentes en el extracto alergénico de *Artemisia vulgaris*. Esta purificación se realizó en colaboración con la Dra. Luisa M^a Villar de la unidad de Inmunoquímica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, dirigida por el Dr. Pedro González, siguiendo la experiencia previa de diversos autores (De la Hoz y col., 1990; Nilsen y col., 1990). El procedimiento consistió en una primera precipitación de proteínas del extracto, para proceder a continuación a una separación cromatográfica con identificación de las proteínas buscadas en las distintas fracciones por medio de inmunotransferencia y valoración de su tamaño molecular.

4.2.4.1. Reactivos utilizados en la purificación de proteínas

Antisuero de cabra anti-IgE humana conjugado con fosfatasa alcalina (Biosource International, Camarillo, USA).

Geles con gradiente de 4-20% de poliacrilamida-SDS (BioRad).

Immobilon-P tamaño 0.45 micras (Millipore, Bedford, USA).

Membranas de diálisis (Sigma).

Persulfato amónico (Sigma).

PNPP (p-nitrofenil fosfato) y *substrate buffer* (Eurodiagnóstica, Arnhem, Holanda), utilizado como substrato de la fosfatasa.

Sephadex S-200 (Amershan Pharmacia Biotech).

Solución tamponada de fosfato (PBS, BioMérieux, Marci l'Etoile, Francia) como solución de lavado.

Tampón de bloqueo con solución de lavado-Tween-20-0.05% (Sigma), 3% BSA (Sigma).

Tampón de carga de la columna de cromatografía, Tris-HCl 50 mM (Sigma) pH 8.

4.2.4.2. Precipitación de proteínas

El extracto fue amablemente suministrado por Alergia e Inmunología Abelló (Madrid), conteniendo 70 mg en 7.1 mL de agua destilada con una actividad de 2500 unidades biológicas/mL. En la precipitación de proteínas se utilizó el método tradicional con persulfato amónico. Para precipitar la proteína de mayor tamaño se resuspendió el extracto en 50 mL de agua destilada, y luego se añadió persulfato amónico gradualmente, en agitación y a 4°C hasta alcanzar el 55% (2.66 M) de saturación. Las proteínas precipitadas se recuperaron tras centrifugación a 27.000xg durante 15 min y a 4° C. Una vez resuspendidas en 50 mL de PBS se dializaron exhaustivamente con el tampón de carga de la columna de cromatografía (Tris HCl 50 mM, pH 8).

El sobrenadante de esta primera precipitación se saturó al 90% (3.7 M) con objeto de precipitar las proteínas de menor tamaño en él contenidas, especialmente Art v 2, siguiendo los mismos pasos que con el primer precipitado.

4.2.4.3. Separación cromatográfica

Las muestras resultantes de ambas precipitaciones fueron primeramente congeladas a -30°C y liofilizadas para reducir el volumen de carga. Se realizaron filtraciones en gel de ambos precipitados en columna de 5x85 cm con gel Sephadex S-200 (1.5 L) y que había sido equilibrada con tampón de carga. La separación tuvo lugar a 4°C y a una velocidad de 20 mL/h, recogándose fracciones de 2 mL. Posteriormente se midió la absorbancia de las fracciones a 260 nm en espectrofotómetro.

4.2.4.4. Inmunotransferencia

Para detectar las fracciones en que se encontraban las proteínas alérgicas se realizó una inmunotransferencia con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos monoespecíficos a *A. vulgaris* (con IgE total > 500 UI/mL, e IgE específica RAST=3). Estos sueros se habían valorado anteriormente por el mismo método, frente al extracto total y frente a los precipitados o sobrenadantes. Para ello, se transfirieron 3 µL de las fracciones seleccionadas a una membrana de Immobilon-P que tras secado de la

muestra se incubaba con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se realizan cuatro lavados de 5 minutos con la solución de lavado y se incubaba la membrana con la mezcla de sueros diluidos a 1/20 en tampón de bloqueo, igualmente durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras un nuevo lavado de las membranas, éstas se incuban con un antisuero anti-IgE conjugado con fosfatasa, diluido a 1/200 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación y se vuelven a lavar cuatro veces, empleando solución salina en el último lavado. Por último, se realiza una incubación con el substrato de la enzima diluido al 1/100 en su correspondiente tampón, y pasados 15-20 minutos, cuando se observa el desarrollo de color se para la reacción con agua destilada. En la figura 4.1 se pueden observar las membranas con las fracciones teñidas donde se detecta la unión de la IgE.

4.2.4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Una vez recuperadas las fracciones donde se detecta unión de la IgE (correspondientes a las fracciones 40 a 46 de la primera precipitación, y 70 a 76 de la segunda), se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar la pureza y el peso molecular de las proteínas presentes. Para ello, en geles de poliacrilamida-SDS con gradiente de 4-20%, se depositaron 25 µL de cada muestra y se procedió a una migración durante 35 min a 200 V. El resultado se muestra en la figura 4.2, donde por comparación con el control de peso molecular se estima un tamaño de 47-60 para la proteína Ag 13, y de 20 kDa para Art v 2.

Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), frente a un estándar de seroalbúmina bovina (BSA).

4.2.5. Cuantificación de inmunoglobulinas por enzimo-inmunoanálisis

La cuantificación de la IgE e IgG séricas específicas contra las proteínas Ag 13 y Art v 2 se realizó por técnicas de ELISA desarrolladas en nuestro laboratorio. También se emplearon estas técnicas en la cuantificación de la IgE de sobrenadantes de cultivo, debido a que dichos niveles no eran detectables por nefelometría.

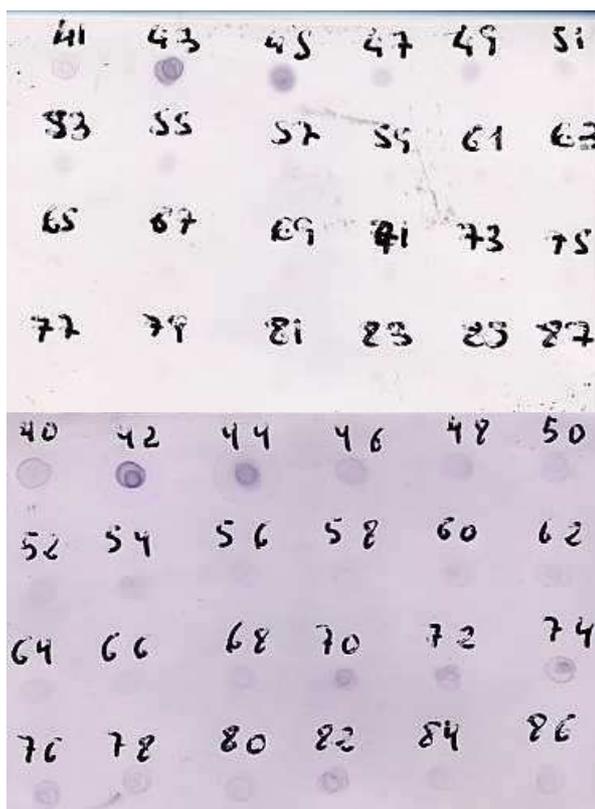


Figura 4.1. Membranas donde se han transferido las fracciones para observar el patrón de unión con IgE. Se recuperaron las fracciones comprendidas de la 40 a la 46 de la primera precipitación, y de la 70 a la 76 para la segunda precipitación.

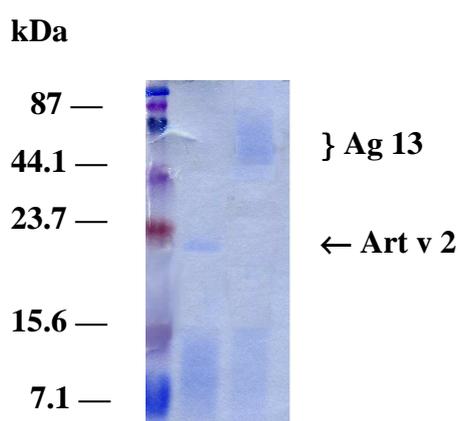


Figura 4.2. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas Art v 2 y Ag 13, calles 2 y 3, de un tamaño estimado de 20 kDa y 47-60 kDa, respectivamente, calculados por comparación con el control de peso molecular depositado en la calle 1.

4.2.5.1. Reactivos usados en las técnicas de enzimo-inmunoanálisis

1,2-phenylendiamina (OPD, Merck), utilizado como sustrato para desarrollar color en las técnicas de ELISA que emplean peroxidasa.

Ácido sulfúrico (Panreac, Montplet y Esteban SA, Barcelona).

Albúmina extraída de suero bovino (BSA, Sigma).

Anticuerpos y conjugados. Se emplearon un total de 4 anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas: sueros de cabra con especificidad anti-IgE y anti-IgG humanas conjugados con peroxidasa (Tago, Camarillo, USA), suero de cabra con especificidad anti-IgE humana conjugado con fosfatasa (Sigma) y suero de ratón con especificidad anti-IgE humana purificado (Serotec, Oxford, UK).

Placas especiales para técnicas de enzimo-inmunoanálisis (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

PNPP (p-nitrofenil fosfato) y *substrate buffer* (Eurodiagnóstica), utilizado como sustrato para desarrollar color en las técnicas de ELISA que emplean fosfatasa.

Solución tamponada de fosfato (PBS).

Tampón bicarbonato, NaHCO₃ 0.1M (Merck) pH 9.6, para diluir los anticuerpos anti-inmunoglobulinas durante el proceso de fijación a la placa de ELISA.

Tampón citrato, citrato trisódico dihidro 0.1M (Merck) ajustado a pH 5.5 con ácido clorhídrico (Merck), utilizado en la preparación del sustrato en las técnicas de ELISA que emplean peroxidasa.

Tween-20 (Sigma).

4.2.5.2. Cuantificación de IgE e IgG anti Ag 13 y Art v 2

Tras la realización de varios experimentos para determinar las concentraciones óptimas de las proteínas y sueros que permitían la máxima discriminación y no daban fondo en la lectura, las condiciones empleadas en el ensayo fueron las siguientes:

1. *Fijación de las proteínas y bloqueo de las placas.* Las proteínas Ag 13 y Art v 2 se diluyeron, respectivamente, al 1/80 y 1/32 en PBS (6.25 µg/mL y 12.5 µg/mL, respectivamente) en el caso del ensayo IgE y con diluciones al 1/640 y

1/2560 en el ensayo IgG (0.8 y 0.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Una vez hecha la dilución, las muestras se dispensaron en las placas a razón de 100 μL por pocillo, posteriormente, se incubaron a 4°C toda la noche y se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20 al 0.1% en el lavador automático. Después, se añadieron 200 μL de PBS-BSA al 2% a cada pocillo y se procedió a una nueva incubación de 1 hora en agitación y a temperatura ambiente que sirvió para bloquear la reacción. De nuevo se realizaron otros 4 lavados con PBS-Tween-20 al 0.1%.

2. *Realización del ensayo.* Para construir las curvas patrón se prepararon diluciones seriadas de un suero patrón en PBS-BSA-1%-Tween-20-0.1% (tampón de dilución), que se utilizó en la purificación de las proteínas al que se le asignó un valor de 1000 UR/mL. A partir de él, se realizaron una serie de diluciones para obtener 6 puntos de concentraciones comprendidas entre 1000 y 32 UR/mL y se depositaron 100 μL por pocillo de cada dilución del estándar y de los sueros a estudiar, que en el caso de la valoración de IgE correspondió a diluciones de 1/5 y 1/10 o superiores, cuando el resultado no entraba en la zona lineal de la curva del estándar, y en el de la IgG a diluciones 1/50 y 1/100, o superiores. Todas las pruebas se realizaron siempre por duplicado, y en los pocillos correspondientes al “blanco” sólo se depositó PBS-BSA-1%. Las placas se incubaron durante 1 hora en agitación, y se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20-0.1%. A continuación para el ensayo IgE se añadieron 100 μL por pocillo de suero de cabra con especificidad anti-IgE humana conjugado con peroxidasa, a una dilución de 1/300 en tampón de dilución. Mientras que en el ensayo IgG la dilución fue de 1/500 del suero de cabra con especificidad anti-IgG conjugado con peroxidasa. Tras una incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente, las placas se volvieron a lavar 4 veces con PBS-Tween-20-0.1%.

3. *Desarrollo del color y medida.* Se añadieron a cada pocillo 100 μL del correspondiente substrato preparado extemporáneamente conteniendo 0.5 mg/mL de OPD en un tampón citrato 0.1M con 0.5% de H_2O_2 . Las placas se incubaron 30 minutos en agitación hasta que se desarrolló el color, tras lo cual se paró la reacción aplicando 50 μL de ácido sulfúrico 3M por pocillo, y la lectura

se realizó a 492 nm en espectrofotómetro (Whittaker 2001, Austria). Al valor obtenido para cada muestra, se le restó el de la lectura observada en los pocillos "blanco". El aparato de lectura trazó automáticamente una gráfica patrón en escala lineal-logarítmica de la que por interpolación de las lecturas problema se obtuvieron las concentraciones correspondientes a cada muestra. El límite inferior de detección de este método fue de 30 UR/mL.

4.2.5.3. Cuantificación de IgE en sobrenadante de cultivo

Las condiciones empleadas en la determinación, siguiendo la experiencia previa de nuestro grupo (Sánchez-Guerrero y col. 1997), fueron las siguientes:

1. *Fijación del anticuerpo y bloqueo de las placas.* Se distribuyeron 50 µL por pocillo del anticuerpo de ratón anti-IgE humana diluido a 1/75 en tampón bicarbonato a pH 9.6. Una vez hecha la dispensación las placas se incubaron a 4°C en agitador horizontal toda la noche y se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20 al 0.1% en lavador automático. Después se añadieron 100 µL de PBS-BSA al 1% a cada pocillo y se incubó 1 hora a 37° C. De nuevo se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20-0.1%.

2. *Realización del ensayo.* Para construir las curvas patrón se prepararon diluciones seriadas en PBS-BSA-0.5%-Tween-20-0.1% (tampón de dilución) de un suero humano de concentración conocida de IgE. Se realizaron una serie de diluciones para seis puntos de concentraciones de 4800 a 150 pg/mL. Seguidamente, se depositaron 50 µL por pocillo, de cada dilución del estándar y de los sobrenadantes a estudiar sin diluir. Todos los puntos se realizaron siempre por duplicado, manteniendo los pocillos correspondientes al "blanco" sólo con PBS-BSA-0.5%. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en el agitador horizontal, y se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20 al 0.1%. A continuación se añadieron 50 µL por pocillo de suero de cabra con especificidad anti-IgE humana conjugado con fosfatasa alcalina, a una dilución de 1/300 en tampón de

dilución. Tras una incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente, las placas se volvieron a lavar 4 veces con PBS-Tween-20-0.1%

3. *Desarrollo del color y medida.* El correspondiente sustrato, consistente en una dilución de PNPP en *substrate buffer* (1 mg/mL), fue preparado minutos antes de ser utilizado y de él se añadieron 50 μ L a cada pocillo problema y control, incubando en agitación hasta que se desarrolló el color a tiempos 0, 1 y 18 horas, en las cuales se tomó una lectura a 405 nm en el espectrofotómetro. A la lectura obtenida para cada muestra, se le restó el valor de la observada en los pocillos "blanco". El aparato de lectura trazó automáticamente una gráfica patrón en escala lineal-logarítmica de la que se calcularon las concentraciones correspondientes a cada muestra problema. El límite inferior de detección de este método fue de 100 pg/mL.

4.2.6. Estudios *in vitro* de proliferación y producción de IgE

En estos experimentos se utilizaron células mononucleares de pacientes seleccionados estimulados con los extractos y proteínas alergénicas purificadas en las condiciones que a continuación se detallan.

4.2.6.1. Selección de pacientes y controles

Para determinar la capacidad proliferativa y la producción de IgE *in vitro* en respuesta frente a alérgenos de *Artemisia vulgaris*, se seleccionaron una serie de pacientes con asma atópico y que habían presentado pruebas cutáneas positivas frente a extractos de *A. vulgaris* en su primera visita a la consulta de alergia y sin que hubieran recibido tratamiento previo con inmunoterapia.

De estos pacientes se obtuvo sangre periférica para obtener las células mononucleares usadas en los distintos tipos de cultivos. También se obtuvo suero simultáneo para cuantificar el nivel de inmunoglobulinas y ADN para la tipificación de genes HLA de clase II. Una vez determinado el genotipo HLA y teniendo en cuenta el mismo, se seleccionaron 2 grupos de 5 pacientes de entre los que padecían asma

alérgico a *A. Vulgaris*: un grupo constituido por portadores del alelo HLA-DRB1-DQB1*0501 y otro por pacientes que en su genoma no llevaban dicho haplotipo.

Como grupo control se utilizó un total de 10 individuos voluntarios sanos sin historia de atopia o asma. Todos ellos, presentaban niveles normales de IgE (<100 UI/mL) y una respuesta IgE específica negativa para *A. vulgaris*. Como para los pacientes, los controles estuvieron integrados por 5 individuos HLA-DRB1*01-HLA-DQB1*0501 positivos y 5 negativos para estos alelos.

4.2.6.2. Experimentos de cultivos celulares *in vitro*

Todos los pasos seguidos para la realización de los cultivos celulares se realizaron en ambiente estéril trabajando en una cámara de flujo laminar de alta seguridad (Telstar S.A., Terrasa, España). En una primera etapa se procedió a la separación de células mononucleares tal como ha sido descrito en el apartado de estudio de genes HLA de clase I, y las células obtenidas se usaron directamente para la realización de cultivos o se conservaron hasta su uso congeladas en N₂ líquido. En este último caso fue necesario usar métodos de congelación y descongelación celular, realizados según el protocolo descrito a continuación.

4.2.6.3. Reactivos empleados en los cultivos celulares

AcMos para bloqueo en cultivo celular, para la realización de experimentos de bloqueo de la interacción de moléculas en los ensayos de proliferación *in vitro*, se utilizaron los siguientes AcMos estériles y sin conservantes: anti-DR (L243) y anti-DQ (Leu-10) (Becton Dickinson, Mountain View, USA). Ambos se adicionaron al comienzo del cultivo a una concentración final de 5 µg/mL siguiendo la experiencia previa de otros autores (Cárdaba y col., 1993; Matsuoka y col., 1996).

Albúmina extraída de suero bovino (BSA, Sigma).

Ampollas de congelación (Greiner, Labotechnik, Alemania).

Filtro de jeringa de 0.22µm (Millipore).

Filtro de nitrocelulosa (Skatron instruments, Suffolk, UK), sobre el que se precipitaron las células procedentes de los ensayos de proliferación celular mediante un precipitador celular (*Harvester*, Skatron Instruments).

Fitohemaglutinina purificada (PHA-P, Sigma), empleada como control de proliferación celular.

Líquido de centelleo (Optiscint Hisafe, LKB, Leics, UK), para determinar la radiación- β mediante un contador.

Medio de congelación, las células mononucleares se congelaron en un medio de congelación suplementado con suero AB humano al 10% (Sigma), a una concentración final del 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Merk).

Medio de cultivo, los cultivos se realizaron en *medio de cultivo completo* (MCC), compuesto por: RPMI-1640 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con un 10% de suero AB humano (Sigma), o con suero de ternera fetal (Gibco) en los cultivos de producción de inmunoglobulinas, previamente descomplementados por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, L-Glutamina 2 mM (Gibco), penicilina 50 UI/mL y estreptomina 50 μ g/mL (Flow Laboratories, Irvine, UK).

Mitógeno Pokeweed (PWM) (Gibco), empleado en los cultivos de producción de inmunoglobulinas.

Placa de 96 pocillos con fondo plano (Greiner), para la realización de ensayos de producción de inmunoglobulinas *in vitro*.

Placa de 96 pocillos de fondo en U (Greiner), utilizadas en realización de los ensayos de proliferación celular *in vitro*.

Radionucleídos, para la determinación de la proliferación celular se utilizó un ensayo de incorporación durante 18 horas de *timidina tritiada* (^3H), con actividad específica de 37 MBq/mL (Nuclear Ibérica, ICN Pharmaceuticals, Irvine, CA).

4.2.6.4. Congelación y descongelación celular

Las células una vez separadas se congelaron por el siguiente procedimiento: La suspensión celular se ajustó a la concentración adecuada añadiendo MCC y se dejó enfriar en hielo picado. Una vez fría se añadió, gota a gota y resbalando por las paredes

del tubo, un volumen igual del medio de congelación (DMSO al 20% en MCC), también previamente enfriado a 4°C. Durante la adición de este último medio, el tubo de congelación se agitó suavemente para conseguir homogeneizar la mezcla. Seguidamente, la mezcla se distribuyó, en volúmenes de 0.5 a 2 mL, en ampollas de congelación preenfriadas y dispuestas en una gradilla dentro de un baño de hielo picado. Las ampollas una vez cerradas se mantuvieron 24 horas a -80°C en gradillas de poliestireno, traspasándose al día siguiente al nitrógeno líquido.

Para la descongelación celular, las ampollas se extraen del tanque de nitrógeno líquido, y se sumergen en un baño a 37°C con agitación constante. Antes que el último resto de hielo se disuelva, se retiran del baño e inmediatamente se transfiere su contenido a tubos de 12 mL. El MCC frío se añade gota a gota, con agitación continua, hasta conseguir una dilución 1:1 del volumen inicial y después se completa hasta 10 mL con MCC sin dejar de agitar. Después de centrifugar a 400xg, se desecha el sobrenadante y el botón celular se resuspende de nuevo en MCC, lavando 2 veces con este medio para eliminar los restos del DMSO del medio de congelación.

4.2.6.5. Ensayos de proliferación

Para evaluar la respuesta proliferativa frente al extracto y alérgenos purificados de *Artemisia*, se cultivaron células mononucleares procedentes de sangre periférica de los pacientes y controles seleccionados, separadas según se ha indicado arriba. Tras la separación y lavado para eliminar el medio de separación, las células se resuspendieron en MCC y tras ajustar de nuevo su concentración, se dispensaron en placas microtiter de 96 pocillos con fondo en U a razón de 1×10^5 células por pocillo contenidas en un volumen final de 200 μ L, en este volumen ya quedaban contenidos los concentraciones de los estímulos aplicados en cada caso. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la incubación se llevó a cabo en estufa (Heraeus instruments, Alemania) a 37°C y atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Las variantes de cultivo fueron las siguientes:

1. Triplicados conteniendo únicamente células resuspendidas en MCC, para medir la proliferación basal.
2. Pocillos adicionados de PHA a una dilución 1/500 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como control positivo de proliferación.
3. Pocillos adicionados de extracto alérgico total a concentraciones de 20, 10 y 5 Unidades biológicas/mL.
4. Células estimuladas con la proteína Ag 13 a concentraciones de 2, 1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
5. Células estimuladas la proteína Art v 2 a concentraciones de 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
6. Triplicados reproduciendo cada una de las tres situaciones anteriores, pero adicionadas de anticuerpos monoclonales Anti-DR y Anti-DQ para valorar la capacidad de bloqueo de los correspondientes antígenos HLA y su influencia sobre la respuesta proliferativa.

En todos los casos las concentraciones óptimas de cada estímulo aplicado se habían determinado por experimentos previos (figura 4.3). Después del 5º día de cultivo, se añadió a todos los pocillos 1 μCi de timidina tritiada en 50 μL de MCC y tras 18 horas de incubación adicional, se recogieron las células de cada pocillo sobre un filtro de nitrocelulosa, mediante un precipitador celular. Cada filtro se depositó en un tubo al que se añadieron 2 mL de líquido de centelleo. La emisión de radiación β se detectó en un contador- β (Rackbeta, Wallac, Turka, Finlandia) y el resultado se expresó en cpm (cuentas por minuto). El índice de proliferación se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{IP} = \frac{(\text{media en cpm con cada estímulo concreto} - \text{media en cpm con el MCC})}{\text{media en cpm con el MCC}}$$

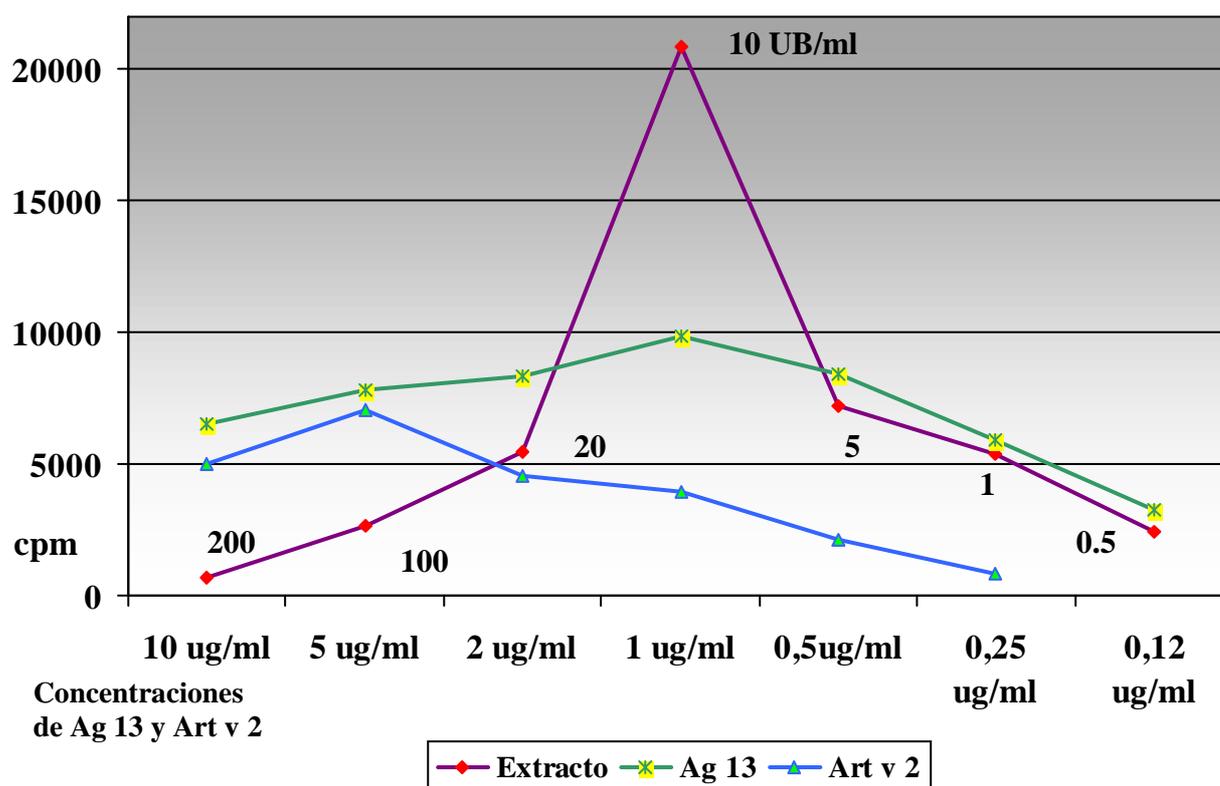


Figura 4.3. Muestra representativa de uno de los ensayos para determinar las concentraciones óptimas de los estímulos de las respuestas proliferativas. Se ensayaron 7 concentraciones para el extracto total (de 200 a 0.5 UB/mL), para Ag 13 (de 10 a 0.12 $\mu\text{g/mL}$), y 6 para Art v 2 (de 10 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$). Como concentraciones de estudio fueron seleccionados los puntos de máxima respuesta en cpm para cada estímulo, y también su inmediato superior e inferior. Se seleccionaron las concentraciones del extracto completo: 20, 10 y 5 UB/mL; del Ag 13: 2, 1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$; y del Art v 2: 10, 5 y 2 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.6.6. Cultivos de producción de inmunoglobulinas

Las células mononucleares resuspendidas en MCC se distribuyeron en un volumen final de 200 μL a una concentración de 2×10^5 células por pocillo y por triplicado en placas microtiter de 96 pocillos con fondo plano y se incubaron en estufa a 37°C y atmósfera humidificada al 5% de CO_2 . Las distintas condiciones de cultivo empleadas en estos experimentos, siguiendo la experiencia previa de otros autores (Zhang y col., 1991; Nasert y col., 1996), fueron:

1. Triplicados con únicamente MCC, para medir la producción basal de IgE.
2. Triplicados adicionados de PWM a una dilución 1/100, método tradicional para estimular la síntesis de inmunoglobulinas *in vitro*.
3. Pocillos en los que, además de PWM a la misma dilución, se adicionaron las dos proteínas alergénicas a una concentración de 2 µg/mL para los antígenos Ag 13 y Art v 2.

Después de 14 días de cultivo se recogieron 150 µL de los sobrenadantes respectivos para medir la producción de IgE.

4.2.7. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en las mediciones de las inmunoglobulinas y de los índices de proliferación de los cultivos se reflejan como media \pm error estándar de la media, la comparación entre los distintos resultados se realizó por medio del test *t de student*, fijando la significación estadística para $P < 0.05$.

4.3. Resultados

4.3.1. Resultados de las inmunoglobulinas séricas

En la tabla 4.2 se reflejan los valores obtenidos en la cuantificación de inmunoglobulinas séricas en los dos grupos de pacientes y en el grupo control. La comparación general de los resultados de ambos grupos de pacientes, refleja diferencias sobre todo para los datos relativos a la IgE e IgG específicas contra Ag 13 e IgE anti-Art v 2 y en menor grado para IgE total entre los dos grupos de pacientes, pero la dispersión de valores impide que estas diferencias alcancen significación estadística.

De manera detallada se observa que respecto a la IgE total, los pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 muestran un valor superior de IgE total ($438,52 \pm 107,42$ UI/mL) que los pacientes que no portan estos alelos ($292,68 \pm 58,85$ UI/mL) y, que a pesar de la dispersión de datos, sí aparece un aumento de esta inmunoglobulina en los

pacientes que son positivos para estos alelos, aunque esa dispersión limite la obtención de un resultado estadísticamente significativo. Los datos obtenidos al cuantificar la IgG total y sus subclases no presentaban diferencias, siendo bastante homogéneos en los dos grupos de pacientes.

En cuanto a la IgE específica frente a alérgenos de *Artemisia vulgaris*, cabe destacar que los valores obtenidos quedan dentro del rango correspondiente al de un RAST de clase II (entre 0.7 y 3.5 kU/L), pero el valor observado es ligeramente superior en pacientes que no poseen HLA-DRB1*01-DQB1*0501 ($3,27 \pm 0,56$ kU/L vs. $2,59 \pm 0,48$ kU/L). De los resultados de las pruebas de ELISA desarrolladas en nuestro laboratorio para determinar las IgG e IgE específicas contra Ag 13 y Art v 2, cabe destacar que los pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 presentan un nivel de IgG anti-Ag 13 superior a los del grupo negativo para ese haplotipo (50112 ± 6466 UR/mL vs. 38974 ± 6868 UR/mL). Igualmente, el valor de la IgE específica para Ag 13 también es ligeramente superior en pacientes portadores del haplotipo que en los que no lo portan ($437,44 \pm 60,55$ UR/mL vs. $386,90 \pm 74,87$ UR/mL). Por el contrario, el valor de la IgE anti-Art v 2, resultó ser superior en los que no poseían estos alelos ($1770,93 \pm 424,7$ UR/mL vs. $1024,38 \pm 194,49$ UR/mL), lo que parece indicar que la respuesta IgE inducida por este alérgeno concreto sea menos dependiente del haplotipo cuya asociación con *Artemisia* ha quedado demostrada en este trabajo. En contraste a lo anterior, las cifras alcanzadas por la IgG específica frente a Art v 2 son muy similares en los dos grupos de pacientes estudiados.

Como era de esperar, al comparar los resultados del grupo control con los de los pacientes, sí se observaba que todas las determinaciones de IgE, además de las de la subclase IgG4, eran significativamente más bajas que las observadas en los pacientes, y ello con independencia del genotipo HLA portado por cada grupo de pacientes. El valor de la IgG anti-Ag 13 también era menor en el grupo control, pero a pesar de la clara diferencia en los valores medios, los datos no permitían demostrar la existencia de significación estadística. La IgG anti-Art v 2 fue prácticamente idéntica en los dos grupos de pacientes y ligeramente inferiores a las del grupo control. El resto de inmunoglobulinas (IgG total y subclases IgG1, 2 y 3) presentaban cifras en el grupo control que fueron muy similares a las observadas en ambos grupos de pacientes.

Tabla 4.2. Valores séricos (media \pm EEM) de las distintas inmunoglobulinas cuantificadas en los dos grupos de pacientes y el grupo control.

Inmunoglobulinas	Pacientes DRB1*01 (n=30)	Pacientes no DRB1*01 (n=30)	Controles (n=10)
IgE total (UI/mL)	438,52 \pm 107,42	292,68 \pm 58,85	60,30 \pm 16,55
IgE esp. A.vulgaris (kU/L)	2,59 \pm 0,48	3,27 \pm 0,56	<0,35
IgE anti-Ag 13 (UR/mL)	437,44 \pm 60,55	386,90 \pm 74,87	195,50 \pm 44,97
IgE anti-Art v 2 (UR/mL)	1024,38 \pm 194,49	1770,93 \pm 424,7	221,44 \pm 59,89
IgG total (mg/dL)	1088,59 \pm 38,87	1038,52 \pm 44,02	1047,00 \pm 82,92
IgG1 (mg/dL)	609,08 \pm 36,85	590,79 \pm 32,54	684,90 \pm 56,8
IgG2 (mg/dL)	312,92 \pm 22,83	321,31 \pm 23,76	285,90 \pm 36,11
IgG3 (mg/dL)	40,65 \pm 3,87	38,83 \pm 3,2	42,80 \pm 9,75
IgG4 (mg/dL)	57,85 \pm 8,36	50,04 \pm 7,72	28,40 \pm 30,83
IgG anti-Ag 13 (UR/mL)	50112 \pm 6466	38974 \pm 6868	29756 \pm 29235
IgG anti-Art v 2 (UR/mL)	44736 \pm 7121	44269 \pm 6786	50934 \pm 16629

4.3.2. Resultados de los cultivos de proliferación

Tal como se representa en la tabla 4.3 y en la figura 4.4 (A,C,D), las respuestas de los pacientes con el genotipo DRB1*01-DQB1*0501 fueron superiores a los que tenían otros genotipos para las distintas concentraciones empleadas en todos los alérgenos estudiados. Hay que resaltar que como ocurría en las determinaciones de inmunoglobulinas, la dispersión de los índices de proliferación de los cultivos también fue alta.

Las diferencias observadas en los índices de estimulación en la respuesta al antígeno Ag 13, en los dos grupos de pacientes mostraban significación estadística tanto para estímulos con una concentración de alérgeno de 2 μ g/mL (8.84 \pm 1.86 vs. 3.38 \pm 1.17, P=0.04) como para la de 1 μ g/mL (8.67 \pm 2.05 vs. 2.77 \pm 0.90, P=0.03). Cuando se redujo la presencia de alérgeno en el cultivo a 0.5 μ g/mL, aunque se observaron diferencias fueron menores y no alcanzaron significación estadística (5.68 \pm 1.47 vs. 4.38 \pm 1.44). Así, se puede intuir una influencia dosis dependiente de estas respuestas y que este efecto podría estar limitado por la concentración del alérgeno en el medio de cultivo,

ya que la respuesta más eficiente para poder establecer diferencias entre grupos parecía corresponder a la concentración intermedia de 1 µg/mL de Ag 13.

En las respuestas proliferativas frente al extracto total y al alérgeno Art v 2, los índices de proliferación también fueron mayores en pacientes con el genotipo DRB1*01-DQB1*0501. En los estímulos con Art v 2 y para todas las concentraciones empleadas las diferencias observadas eran más bajas, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se empleó el extracto total como estímulo, la respuesta en los pacientes fue parecida a la del alérgeno Ag 13, pero en este caso las respuestas más eficientes se detectaron con las dos concentraciones inferiores, resultando próximas a la significación para el extracto total a 10 UB/mL (8.80 ± 2.04 vs. 3.40 ± 1.39 , $P=0.06$) y más alejadas de la significación para una concentración de 5 UB/mL (7.04 ± 2.01 vs. 3.05 ± 1.28 , $P=0.13$). Sin embargo, para la concentración de 20 UB/mL, el índice de proliferación se reducía a la mitad, lo que podría indicar que altas concentraciones del extracto conducen a un bloqueo de la respuesta, quizás porque el extracto crudo tenga otras proteínas que a altas concentraciones puedan bloquear parcialmente la respuesta.

Es interesante señalar que en todos estos experimentos, los índices de estimulación del grupo control fueron siempre inferiores y no sobrepasaron el valor de 2.

Cuando se realizaron ensayos de inhibición con adición de AcMo anti-HLA DR y anti-HLA-DQ monomórficos, se pudo observar que las respuestas proliferativas provocadas por el extracto completo se inhibían en ambos grupos de pacientes (tabla 4.3, figura 4.4 B, D, F). En pacientes DRB1*01-DQB1*0501, el bloqueo con anti-HLA-DR alcanzaba un porcentaje de inhibición del 70%, mientras que esta inhibición era del 57% cuando se empleaba anti-HLA-DQ. En los pacientes del grupo que no portaba este haplotipo, el efecto debido a la presencia de anticuerpos era menor, y muy similar para HLA-DR y HLA-DQ, mostrando un porcentaje de inhibición del 40 y 42% respectivamente.

El porcentaje de inhibición en los cultivos con Ag 13 de los pacientes DRB1*01-DQB1*0501, fue similar con cualquiera de los anticuerpos, de modo que supuso un 35% para anti-HLA-DR y un 36% para anti-HLA-DQ. Sin embargo, la inhibición con ambos anticuerpos no provocó cambios manifiestos en las respuestas proliferativas de los pacientes que no poseían el genotipo DRB1*01-DQB1*0501, ya que únicamente se

detectaron inhibiciones correspondientes a valores comprendidos del 3 al 6% de inhibición.

Respecto a los cultivos estimulados con Art v 2, el anticuerpo anti-HLA-DR inhibía la proliferación en un 32% en pacientes DRB1*01-DQB1*0501, y en un 25% en el otro grupo. El bloqueo con anti-HLA-DQ produjo un grado de inhibición del 19% en el grupo de pacientes DRB1*01-DQB1*0501, sin que se observara ningún efecto en el otro grupo.

Tabla 4.3. Resultados de los cultivos de proliferación (IP \pm EEM) e inhibición (%), en los dos grupos de pacientes y el grupo control en respuesta a los alérgenos de *Artemisia vulgaris*.

Estímulos	Índice de proliferación			
	DRB1*01 (n=5)	Inhibición (%)	No DRB1*01 (n=5)	Inhibición (%)
MCC + anti-DR	0.86 \pm 0.12	14%	0.92 \pm 0.16	8%
MCC + anti-DQ	0.91 \pm 0.10	9%	1.15 \pm 0.13	-
Ag 13 a:				
2 μ g/mL	8.84 \pm 1.86	-	3.38 \pm 1.17 a	-
1 μ g/mL	8.67 \pm 2.05	-	2.77 \pm 0.90 b	-
+ anti-DR	5.71 \pm 1.03	35%	2.61 \pm 2.17	6%
+ anti-DQ	5.64 \pm 1.04	36%	2.70 \pm 1.08	3%
0.5 μ g/mL	5.68 \pm 1.47	-	4.38 \pm 1.44	-
Art v 2 a:				
10 μ g/mL	2.59 \pm 0.80	-	2.37 \pm 0.88	-
5 μ g/mL	3.95 \pm 0.94	-	2.68 \pm 1.11	-
+ anti-DR	2.71 \pm 0.76	32%	2.02 \pm 1.20	25%
+ anti-DQ	3.20 \pm 0.97	19%	2.75 \pm 1.54	-
2.5 μ g/mL	3.19 \pm 1.02	-	2.15 \pm 0.54	-
Extracto completo a:				
20 UB/mL	4.03 \pm 0.86	-	2.49 \pm 0.97	-
10 UB/mL	8.80 \pm 2.04	-	3.40 \pm 1.39	-
+ anti-DR	2.59 \pm 0.29	70%	2.03 \pm 1.38	40%
+ anti-DQ	3.78 \pm 0.55	57%	1.97 \pm 0.75	42%
5 UB/mL	7.04 \pm 2.01	-	3.05 \pm 1.28	-

a, P= 0.04

b, P = 0.03

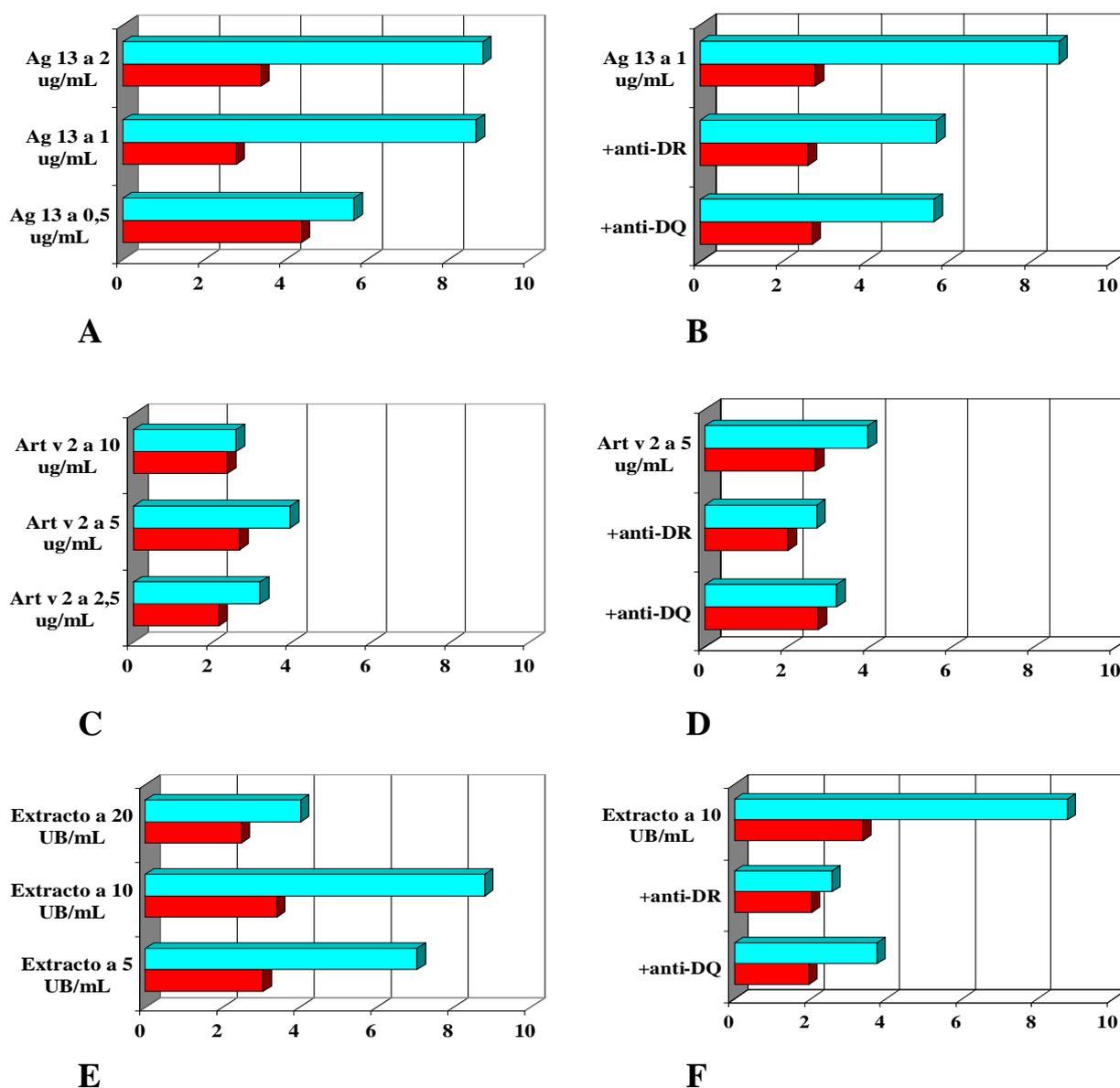


Figura 4.4. Índices de proliferación (A, C, E), e inhibición (B, D, F) de la respuesta proliferativa a las diferentes concentraciones de alérgenos en los dos grupos de pacientes (pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 en azul, el resto de pacientes en rojo). Se representa la proliferación frente a cada estímulo (A: Ag 13; C: Art v 2; E: extracto total) y la comparación con la proliferación observada tras el bloqueo con anticuerpos anti-HLA-DR y anti-HLA-DQ en las concentraciones intermedias de cada estímulo (1 μ /mL de Ag 13; 5 μ /mL de Art v 2; 10 UB/mL del extracto total). Los índices de proliferación en los cultivos basales adicionando los anticuerpos monoclonales y sin estímulos alérgicos se situaron entre 0.86 y 1.15.

4.3.3. Resultados de los cultivos de producción de IgE

En los sobrenadantes de cultivo recuperados el día 14 se midió la concentración de IgE por ELISA, obteniéndose los valores que se recogen en la tabla 4.4. Ambos grupos de pacientes presentaron un comportamiento parecido en estos ensayos, partiendo de una concentración similar al emplear únicamente MCC (765 pg/mL para los pacientes que son DRB1*01-DQB1*0501 y 634 pg/mL para los que no los portan). La adición del mitógeno PWM al cultivo elevó la producción de IgE en ambos grupos hasta 888 y 958 pg/mL, respectivamente, lo que representa un aumento del 16% en el grupo de pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501, y del 51% en el grupo donde estos alelos están ausentes.

El aumento es mucho más acentuado cuando además se adiciona la proteína Ag 13, llegando prácticamente a duplicar los valores basales obtenidos (92-93%). Sin embargo, cuando se le añade el alérgeno Art v 2, el incremento es únicamente del 35 al 37% en los dos grupos de pacientes. Los controles, independientemente de cual sea su genotipo HLA, parten de unos niveles ligeramente inferiores a los pacientes atópicos en condiciones basales (535 pg/mL), observándose un incremento muy pequeño en la producción de IgE cuando se añade el mitógeno PWM y los alérgenos de *Artemisia vulgaris* (el incremento máximo es de un 10% al emplear PWM junto a Art v 2).

Tabla 4.4. Valores medios \pm EEM de la concentración de IgE en pg/mL en los sobrenadantes de cultivo (Δ : Incremento en % sobre el basal con MCC).

	Condiciones de cultivo						
	MCC	PWM	Δ	PWM + Ag 13	Δ	PWM + Art v 2	Δ
Pacientes DRB1*01 (n = 5)	765 \pm 77	888 \pm 130	20%	1500 \pm 374	93%	1017 \pm 149	37%
Pacientes no DRB1*01 (n = 5)	634 \pm 141	958 \pm 233	46%	1327 \pm 411	92%	861 \pm 198	35%
Controles (n = 10)	535 \pm 99	551 \pm 152	3%	502 \pm 105	-	588 \pm 109	10%

4.4. Discusión

Los estudios posteriores a los trabajos de purificación de dos alérgenos mayoritarios contenidos en el polen de *Artemisia*, relativos a la presencia en suero de inmunoglobulinas específicas contra dichos alérgenos no permitieron establecer diferencias entre los pacientes que habían resultado genéticamente asociados con *Artemisia vulgaris* y los que no llevaban el haplotipo asociado. Al comparar los resultados de ambos grupos de pacientes no encontramos diferencias significativas, ya que las únicas diferencias estadísticamente significativas se encuentran en la comparación de pacientes y controles. En nuestros resultados observamos un valor superior de IgE total en los pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 sobre los que no lo son (438,52 vs. 292,68 UI/mL). Es de destacar que existen una serie de artículos que han descrito una relación entre el alelo DRB1*01 y un mayor nivel de IgE sérica. Así, Ulbrecht y col. (1997) describen una débil asociación entre el alelo DRB1*01 y valores de IgE mayores de 200 UI/mL en un estudio de 139 pacientes alérgicos y 266 controles, sin que encuentren ninguna otra relación con otros alelos HLA-DR, ni con una serie de microsatélites situados en el agrupamiento de genes de citocinas en el cromosoma 5. Por otra parte, en un estudio realizado en 82 pacientes alérgicos al polen de Gramíneas y 52 controles, también se describe una relación entre el mismo alelo DRB1*01 con los mayores niveles de IgE total sérica (Woszcek y col., 2002). En el caso de Mansur y col. (2000), la asociación se encuentra con el alelo DRB1*0701 en pacientes atópicos, concluyendo que puede existir una relación entre este alelo y la modulación de la IgE total sérica. Curiosamente, este trabajo también describe una asociación con los alelos DRB1*0101 y DQB1*05 y la atopía, aunque con una P menor. No podemos concluir que nuestros pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 tengan unos valores significativamente mayores en niveles de IgE, ya que en nuestra muestra únicamente determinamos la IgE en los pacientes alérgicos a *Artemisia*, y el incremento observado no es estadísticamente significativo. Pero es posible que estos alelos, o otros genes en desequilibrio de ligamiento, puedan jugar un papel importante la modulación de la IgE total sérica o el desarrollo de alergia, tal como se ha apuntado en estos estudios (Ulbrecht y col., 1997; Mansur y col., 2000; Woszcek y col., 2002).

Con respecto a los valores determinados de Igs específicas frente a los alérgenos de Artemisia, nuestros resultados parecen indicar que los pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 muestran una sensibilización preferente hacia el alérgeno Ag 13, ya que tanto los valores de IgE como los de IgG son superiores en estos pacientes. Por el contrario, los pacientes que no son HLA-DRB1*01-DQB1*0501 parecen tener una mayor sensibilización hacia Art v 2, ya que el nivel de IgE prácticamente duplica al observado en el otro grupo de pacientes, aunque la desviación de los datos impide que esta diferencia sea significativa. Además, los pacientes que no son HLA-DRB1*01-DQB1*0501 también tienen niveles superiores de IgE específica contra los alérgenos *A. vulgaris* incluidos en el ImmunoCAP-w6. La cantidad de IgG anti-Art v 2 parece no tener valor diagnóstico a la vista de nuestros resultados, ya que los niveles son muy similares en ambos grupos de pacientes, e inferiores al encontrado en los controles no sensibilizados contra estos alérgenos (RAST clase cero). La comparación de los resultados de los controles y el conjunto de pacientes refleja que todas las determinaciones de inmunoglobulinas tipo IgE, además de la subclase IgG4, son significativamente menores en el grupo control, ya que la subclase IgG4 también está implicada en la respuesta alérgica (Aalberse y col., 1998).

Hay que tener en cuenta que en la alergia a Artemisia se ha descrito una reactividad cruzada con una importante serie de fuentes alérgicas, que incluyen reactividad al polen de la planta del tabaco, ambrosía, apio, zanahoria, abedul, avellana, etc (Vallier y col., 1988; Bauer y col., 1996; Caballero y col., 1997; Hirschwehr y col., 1998; Ortega y col., 1999). Además, también se ha apuntado que la proteína Ag 13 (antes Art v 1) tiene reactividad cruzada con otras del polen de abedul, gramíneas (*Phleum pratense*) y con los extractos de manzana y apio (Heiss y col., 1996; Grote y col., 1998), y que otro de los alérgenos mayoritarios (Art v 3) también está presente en los extractos de melocotón (Pastorello y col., 2002). Por lo que en las respuestas observadas en nuestros resultados (tanto de Igs séricas, como de proliferación y producción de IgE), podrían verse implicados otros factores, como la sensibilización o reacción cruzada a otros alérgenos que pudieran presentar nuestros pacientes.

Los resultado de producción de IgE *in vitro* tampoco reflejaron un comportamiento distinto en los dos grupos de pacientes. Sin embargo, se encontraron unos valores basales de IgE en sobrenadante de cultivo ligeramente superiores para los

pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 sobre el otro grupo (765 ± 77 vs. 634 ± 141 pg/mL, respectivamente), del mismo modo que lo que ocurría con la IgE total sérica. El incremento en la producción de IgE observado en respuesta a PWM es de mayor importancia en los pacientes que no portan los alelos HLA-DRB1*01-DQB1*0501. Todos estos resultados basales son muy similares a los descritos en un trabajo previo realizado por nuestro grupo, tanto para los pacientes atópicos (que pasaban de 697 ± 323 pg/mL con MCC a 804 ± 362 pg/mL con PWM), como para los controles (de 512 ± 249 a 593 ± 377 pg/mL) (Sánchez-Guerrero y col., 1997). Al añadir los alérgenos encontramos el mayor incremento en la producción de IgE, especialmente con el alérgeno Ag 13. Es posible que la determinación de la IgE anti-Ag13 y/o anti-Art v 2 en los sobrenadantes de cultivo, al igual que cultivos que emplearan IL-4 junto con anti-CD40 como estímulos, hubieran sido más informativos sobre la síntesis de IgE producida en los pacientes estudiados. Sin embargo, la limitación impuesta por la disponibilidad de células y sobrenadantes de cultivo, no ha permitido que estos ensayos pudieran realizarse.

Al analizar la respuesta proliferativa de los linfocitos de los pacientes con asma alérgico a Artemisia, se pudo verificar que cualquiera que fuese el estímulo, la respuesta era mayor en pacientes con el haplotipo HLA-DRB1*01-DQB1*0501 en su genotipo que en los que no portaban estos alelos. En nuestros resultados, se observa que cuando se estimulaba tanto con el extracto total como con el antígeno Ag 13, se inducía un gran nivel de respuesta con IP de media mayor de 8. Aunque sólo se pudo demostrar la existencia de cambios significativos en dos de las condiciones de cultivo estudiadas. Así, en los pacientes asmáticos portadores del haplotipo HLA-DRB1*01-DQB1*0501, el índice de proliferación frente al alérgeno Ag 13 a 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$ era significativamente mayor ($P=0.04$ y $P=0.03$, respectivamente) sobre los que no portan estos alelos. Aunque la proteína Art v 2 es una de las más alérgicas, habiendo sido descrita la presencia de IgE anti-Art v 2 en el 45% de los pacientes alérgicos a Artemisia (Nilsen y col., 1990), los resultados de nuestro trabajo parecen indicar una reactividad menor frente al estímulo con Art v 2 que para el Ag 13 en los dos grupos de pacientes.

Que sepamos, sólo existen dos trabajos en la bibliografía en los que se analiza la respuesta proliferativa frente a alérgenos de Artemisia, en concreto frente a Art v 1 (Jahn-Schmid y col., 2002; Schmid-Grendelmeier y col., 2003). En el primer trabajo se describe

que la respuesta frente al alérgeno Art v 1 está dominada por un único epítipo (aas 16-25 de Art v 1), y que esta respuesta en clones T se inhibe en presencia de un AcMo anti-DR, sin que aparentemente se vea afectada por la inhibición con anti-DQ o anti-DP. Mientras que el trabajo de Schmid-Grendelmeier y col. se centra en la relevancia clínica de este alérgeno, obteniendo unos índices de proliferación con células mononucleares similares a los nuestros (entre 3 y 6.5, con concentraciones del alérgeno de 1 y 10 µg/mL), comprobando además que este alérgeno es capaz de inducir respuesta en SPT y en las pruebas de provocación nasal.

Aunque varios estudios han demostrado que los pacientes atópicos tienen mayores respuestas proliferativas contra los alérgenos a los que son sensibles (Eisenbrey y cols., 1985; Burastero y cols., 1993), en algunos trabajos se ha cuestionado la relación entre esta proliferación y la clínica del paciente, afirmando que estas respuestas tienen poco valor pronóstico (Horneff y cols., 1996; Würtzen y cols., 1998). De acuerdo con ellos, los datos obtenidos en nuestro estudio tampoco sugieren la existencia de una correlación directa entre proliferación y síntesis de IgE específica frente Artemisia, pues aunque en el conjunto de pacientes HLA-DRB1*01-DQB1*0501 se producen los mayores índices de proliferación, este grupo muestra unos niveles de IgE específicas anti-Artemisia similares o incluso menores al resto de pacientes.

En los ensayos de inhibición con anti-HLA-DR y anti-HLA-DQ, cuando se estimuló con el extracto completo, observamos que ambos anticuerpos son capaces de bloquear la respuesta proliferativa de los portadores de DRB1*01-DQB1*0501, y que la inhibición llega a ser del 70% con el anticuerpo anti-HLA-DR. Mientras que el bloqueo con ambos anticuerpos sólo alcanza el 42% en el grupo de los no portadores de estos alelos. Cuando el estímulo antigénico se realizó con los alérgenos purificados el comportamiento fue distinto. Los dos anticuerpos no parecían tener efecto en la respuesta al Ag 13 en los pacientes que no portaban el haplotipo DRB1*01-DQB1*0501, aunque la inhibición era del 35% para los pacientes DRB1*01-DQB1*0501. Sin embargo, esta inhibición no pudo ser atribuida específicamente a uno de los dos alelos de dicho haplotipo.

En los estímulos con Art v 2, el efecto de bloqueo con anti-DR no fue muy diferente en los dos grupos de pacientes, aunque la inhibición observada fue ligeramente superior en los pacientes con el haplotipo HLA-DRB1*01-DQB1*0501 que en los que no

portaban estos alelos (32% vs. 25% de inhibición). Por el contrario, el bloqueo con anti-HLA-DQ era apreciable en el caso de portadores HLA-DRB1*01-DQB1*0501 (19%) y no ejercía efecto sobre los no portadores de ese genotipo. Aunque los cambios detectados en los porcentajes de inhibición en este caso fueron mucho más reducidos que para el alérgeno Ag 13, sí parece deducirse que la respuesta frente a Art v 2 es más dependiente o específica de las moléculas HLA-DR.

De estos experimentos podemos concluir que los pacientes DRB1*01-DQB1*0501 responden principalmente ante la proteína mayoritaria Ag 13, tanto en respuesta proliferativa como en la producción de IgE, y que la respuesta proliferativa se inhibe tanto por el anticuerpo anti-HLA-DR como por el anti-HLA-DQ, lo que no permite asignar un papel predominante a ninguno de ambos genes. Por el contrario, en los pacientes que no son DRB1*01-DQB1*0501, la respuesta proliferativa fue más reducida, y similar frente al Ag 13 y a Art v 2, y el efecto de bloqueo aun siendo muy bajo, era aparentemente más dependiente de HLA-DR en la estimulación con Art v 2.

CAPÍTULO 5

Discusión final y conclusiones

En la presente memoria hemos estudiado el papel del sistema HLA en el asma, primeramente en un conjunto de pacientes asmáticos intrínsecos y extrínsecos, para después profundizar el estudio en el asma alérgico en respuesta a diversas fuentes alérgicas, y particularmente en el asma alérgico a *Artemisia vulgaris*.

En la primera parte de nuestro trabajo nos centramos en el análisis de los pacientes intrínsecos y su comparación con los extrínsecos, estudiando la hipótesis de que al ser las infecciones respiratorias, especialmente por el virus respiratorio sincitial y el parainfluenza, la causa más frecuente de exacerbaciones agudas en el asma intrínseco, estos agentes infecciosos tuvieran alguna relación con las moléculas de HLA (presumiblemente de clase I), de una forma similar a la encontrada en otras enfermedades como la malaria o la lepra (Minayaga y col., 1981; Hill y col., 1991). Sin embargo, las diferencias que encontramos no resultaron estadísticamente significativas (Torío y col., 2000). Aunque la serie analizada no ha sido excesivamente amplia, y el número de estudios realizados por otros grupos es también reducido, por lo que sería aconsejable confirmar posteriormente los resultados analizando series más amplias.

El papel del HLA ha resultado más evidente en el caso del asma alérgico, ya que se ha conseguido describir una serie de asociaciones estadísticamente significativas con alelos de HLA de clase II al considerar la respuesta a diferentes alérgenos. Estos resultados han sido especialmente relevantes en el caso de pacientes asma alérgico a *Artemisia vulgaris*, donde se ha encontrado una asociación con los alelos HLA-DRB1*01-DQB1*0501 que hasta ahora no había sido descrita.

A la vista de los resultados expuestos en el presente trabajo, puede ser tentador especular sobre el papel de los alelos DRB1*0101 y 0102 en la respuesta alérgica a *Artemisia vulgaris*, ya que debido a su alta homología puede que las escasas diferencias de secuencia entre estos alelos no lleguen a ser determinantes para diferenciar su asociación con un alérgeno concreto, mientras la existencia de una menor homología con el alelo DRB1*0103, podría permitir asociarlo con algún otro epítipo determinante para el reconocimiento de alérgenos de *Artemisia*. De hecho, DRB1*0101 y DRB1*0102 difieren en sólo 2 aas de toda su secuencia (el DRB1*0101 tiene un valina en la posición 85 y glicina en la 86, mientras que el DRB1*0102 tiene alanina en la

posición 85 y valina en la 86), mientras que difieren de todo el resto de alelos, excepto con DRB1*1001 (único subtipo de DRB1*10 y también en desequilibrio de ligamiento con DQB1*0501) y con DRB1*1130 (presumiblemente inexistente en la población española), en las posiciones 11, 13 y 31 que se encuentran en el bolsillo de unión a péptidos (Donfack y col., 2000). Es posible que los aas presentes en estas tres posiciones, individualmente o en conjunto, sean determinantes para la unión y presentación de los antígenos de Artemisia, ya que el 44% de los pacientes alérgicos a Artemisia (36 de 81) presentan al menos uno de los alelos DRB1*0101, DRB1*0102 o DRB1*1001.

El alelo DR1 también ha sido asociado con la respuesta a Fel d 1 (Young y col., 1996). Curiosamente, cuando se caracterizó el antígeno Art v 2, se encontró una similitud de secuencia entre las posiciones 17-22 de Fel d 1 y las 10-15 de Art v 2, sin que se detectaran más homologías con el resto de alérgenos descritos hasta la fecha (Nilsen y col., 1991a). Resultaría sorprendente que esta homología de secuencias, pertenecientes a especies tan alejadas filogenéticamente, pudiera ser determinante para que estos alérgenos sean más fácilmente presentados por las moléculas DR1, cuyo resultado serían las asociaciones descritas.

Hay una serie de trabajos donde el análisis de las posibles asociaciones HLA-enfermedad se realiza sobre la base de una clasificación funcional de los alelos de DR, teniendo en cuenta el polimorfismo en los aas 70, 71 y 74 de la cadena β , presentes en el bolsillo β 4 (Ou y col., 1998). Utilizando este tipo de análisis se han realizado estudios en varias enfermedades autoinmunes, y también se ha aplicado en pacientes alérgicos, describiéndose una nueva con la alergia a *Dermatophagoides* (Torres-Galván y col., 2000). Según esta clasificación, los alelos DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*1001 y los menos frecuentes DRB1*0104, DRB1*1402, DRB1*0408 y DRB1*1421 pertenecerían al mismo grupo funcional según los 7 grupos establecidos. Como se ha reflejado anteriormente, los pacientes que portan los alelos DRB1*0101, DRB1*0102 y DRB1*1001 ya constituyen el 44% del total de alérgicos a Artemisia, mientras que en la población murciana el conjunto de los 10 alelos que constituyen ese grupo funcional suponen un 20% de la población total (Muro y col., 2001). A pesar de que no se ha realizado el tipaje de alta resolución de todos nuestros pacientes y controles, se puede intuir que al pertenecer a este grupo

funcional al menos la mitad de los pacientes alérgicos a Artemisia, un análisis realizado sobre la base de la clasificación funcional de los alelos HLA-DRB1* también detectaría una asociación significativa.

Una de las cuestiones que se plantean a la vista de los resultados expuestos en este trabajo hace referencia al hecho que ésta sea la primera vez que se comprueba una asociación entre los alelos HLA y la respuesta a Artemisia. Teniendo en cuenta que las asociaciones entre el HLA y la alergia se llevan estudiando desde hace 30 años, sorprende que una asociación tan fuerte como la aquí descrita no haya sido encontrada con anterioridad. Especialmente cuando el alelo DR1 no requiere un sistema de tipaje novedoso de alta resolución, pudiendo ser fácilmente detectado por métodos de tipaje serológicos o moleculares de baja resolución. Además, este alelo no se encuentra con una mayor frecuencia en la población murciana que en el resto de poblaciones de nuestro entorno (15-25%) (Imanishi y col., 1991), y por lo tanto, la frecuencia hallada en pacientes con asma alérgico no vendría influenciada por un aumento de la frecuencia alélica en el área geográfica donde se ha realizado el estudio. Sin embargo, sí es probable que sean determinantes las características climáticas de la zona del estudio (con una temperatura media anual en la Región de 16.8°C, y que es mayor de 18°C en la ciudad de Murcia) para que hayamos encontrado la asociación con los alelos HLA, donde se da una polinización de las especies de Artemisia durante el invierno que no han sido descrita fuera de esta zona (Munuera y col., 1998). Estas características propias provocan una mayor polinosis en la región y como consecuencia, una mayor incidencia en la respuesta al polen de Artemisia. De hecho, la prevalencia del 23.5% en SPT a la Artemisia que se encuentra en la Región de Murcia es muy superior a la descrita en otras partes de Europa, que varían desde el 4% detectado en Holanda (Leiden), al 9% en Francia (Montpellier) y al 16% en el sur de Italia (Nápoles) (D'Amato y col., 1989), siendo del 14% en el conjunto de España (Munuera y col., 2001), aunque las especies de Artemisia se encuentren por toda Europa. La polinización "fuera de temporada" también afecta a otras especies, como las de *Phoenix* (Belchí-Hernández y col., 1998) y *Chenopodiaceae* (familia a la que pertenece *Salsola kali*, también llamada "trotamundos" o "espinardo", y cuyo polen se utiliza para el diagnóstico y la inmunoterapia de todas las especies de esta familia). Dos factores fundamentales para que la prevalencia detectada por SPT de *Chenopodiaceae* llegue a ser del 49.5% en la

Región de Murcia (Pagán y col., 1996) son tanto la polinización "fuera de temporada", como con la gran cantidad de especies que se encuentran en la región, que tienen como consecuencia que durante todo el año se detecten sus pólenes en el aire (Munuera y col., 2001). Esta prevalencia es elevadísima en comparación con las detectadas en otras zonas de Europa (2% en Montpellier y 3% en Nápoles), sin que sea considerado como un polen de interés alérgico en algunos países europeos. Como se ha comentado para la sensibilización a *Artemisia vulgaris*, es posible que al existir una mayor exposición de la población a los alérgenos de las especies de *Chenopodiaceae*, se haya aumentado la probabilidad de desarrollar alergia y ello permita disponer de datos necesarios para que el análisis estadístico muestre potencia suficiente para detectar tanto la asociación predisponente al asma alérgico observado con *Artemisia vulgaris*, como la existencia de asociación protectora a la sensibilización por *Salsola kali* con el alelo HLA-DRB1*11 descritas en el capítulo 3.

Aunque es conocida la gran reactividad cruzada existente entre las distintas especies de *Artemisia*, y se acepta que polen de la especie *A. vulgaris* es suficiente para la preparación de los extractos alérgicos empleados en los SPT y la inmunoterapia (Olsen y col., 1995; Katial y col., 1997), podría ser interesante realizar estudios con otras especies de *Artemisia* presentes en zonas concretas. En el caso de Murcia, donde la especie dominante es *A. barrilieri*, la utilización del polen de esta especie en el diagnóstico por SPT permitiría discernir cuál es la incidencia real de la sensibilización a *Artemisia*, y también nos permitiría confirmar si la asociación que aquí hemos descrito se circunscribe a una o a varias especies y alérgenos de este género.

Por otra parte, también sería de interés realizar estudios de asociación HLA en pacientes monosensibilizados a *Artemisia*, ya que aunque tienen una escasa incidencia, proporcionarían una información donde la reactividad cruzada de los alérgenos no podría enmascarar los resultados. Además, se ha apuntado que estos pacientes parecen tener unas características clínicas propias (García-Ortíz y col., 1996; Guerra y col., 1998). Igualmente, sería interesante dirigir los estudios hacia poblaciones de distinto origen étnico y donde la polinosis a *Artemisia* esté claramente presente. Estudios en poblaciones donde fueran distintas las frecuencias de los alelos implicados la asociación (por ejemplo: una mayor frecuencia de DRB1*10-DQB1*0501), así como con distintos desequilibrios de ligamiento (como DRB1*01-DQB1*0504), podrían proporcionar

información muy útil para aclarar el papel individual de cada alelo, tal como se ha realizado en la asociación de los alelos DRB1*07 y DQB1*0201 en la alergia al olivo (Cárdaba y col., 1996).

Como ya se indicó en la introducción del capítulo 4, hasta la fecha no se dispone de las secuencias completas de aas de los dos alérgenos con los que hemos realizado los experimentos *in vitro*. Por ello, se ha visto limitada la disponibilidad de alérgenos recombinantes, y en consecuencia la realización de experimentos dirigidos a identificar los epítomos responsables de la reactividad de estas proteínas. Este tipo de experimentos han permitido establecer los determinantes antigénicos primordiales de la respuesta alérgica específica y han contribuido a aclarar el papel de ciertas moléculas HLA de clase II implicadas en dicha respuesta específica (Baskar y col., 1992; Fasler y col., 1995; Shinbara y col., 1995). Los resultados de dichos experimentos, junto con la disponibilidad de alérgenos recombinantes han abierto la posibilidad de una inmunoterapia más dirigida, y posiblemente más eficaz, mediante el empleo de una vacunación con péptidos o proteínas que se presentan en el contexto de un HLA determinado (Mohapatra y col., 1995; Norman y col., 1996; Texier y col., 2000). En el caso concreto de la alergia a la Artemisia, la disponibilidad de los alérgenos recientemente secuenciados Art v 1 y 4 (Wopfner y col., 2002; Himly y col., 2002), junto a los resultados presentados en esta memoria (Torío y col., 2003), hacen posible que este tipo de estudios también se puedan realizar en el futuro.

Conclusiones

1. En nuestra población no se ha podido demostrar una asociación entre el asma alérgico o no alérgico con el sistema HLA, ya que aunque los resultados muestran diferencias en las frecuencias fenotípicas, estas diferencias no son estadísticamente significativas, sin que permitan establecer ninguna asociación con el asma intrínseco, ni diferenciar entre las dos entidades clínicas.
2. En el análisis de las frecuencias genotípicas de HLA en nuestra serie de pacientes con asma extrínseco, teniendo en cuenta el alergeno particular al que estaban sensibilizados, sí se pudo demostrar la existencia de asociaciones significativas con varios alelos HLA de clase II. Como la asociación del asma alérgico a *Parietaria judaica* con los alelos HLA-DRB1*01 y HLA-DQB1*0501, del asma alérgico a *Lolium perenne* con el alelo HLA-DRB1*03, y el efecto protector del alelo HLA-DRB1*11 frente a la sensibilización a *Salsola kali* y *Olea europaea*.
3. La asociación con más alta significación se encuentra entre el asma alérgico a *Artemisia vulgaris* y los alelos HLA-DRB1*01 y HLA-DQB1*0501, siendo la primera vez que se comprueba una asociación entre el sistema HLA y la respuesta alérgica a Artemisia.
4. Los pacientes asmáticos alérgicos a *Artemisia vulgaris* que portan los alelos HLA-DRB1*01-DQB1*0501 en su genotipo, tienen una mayor respuesta proliferativa *in vitro* frente a los alergenos de Artemisia respecto a los pacientes que poseen otros genotipos, respondiendo fundamentalmente frente al extracto alérgico total y de forma significativamente mayor frente al alergeno Ag 13. Mientras que la estimulación con el alergeno Art v 2 produce una respuesta con menores índices de estimulación en todos los pacientes.

5. Los ensayos de bloqueo de la respuesta proliferativa específica inducida por alérgenos, muestran que la correspondiente al estímulo con Ag 13 es la más afectada, tanto si el bloqueo se realiza con anti-HLA-DR como si se hace con anti-HLA-DQ. Sin que ello permita asignar un papel predominante a ninguno de ambos genes. Además, este antígeno parece ser también el que induce una mayor producción de IgE *in vitro*.

6. De todo lo aquí expuesto, se puede concluir que el sistema HLA, y especialmente las moléculas de clase II, juegan un papel relevante tanto para la predisposición como para la susceptibilidad al asma alérgico en nuestra población. En particular en el asma alérgico a *Artemisia vulgaris* este papel es más evidente, como demuestra la alta significación de la asociación descrita en el presente trabajo.

CAPÍTULO 6

Referencias bibliográficas

- Aalberse RC, Schuurman, van Ree R, Stapel S. IgG4 antibody assays in allergy diagnosis. *Res Immunol* 1998; 149: 263-6.
- Ajioka RS, Jorde LB, Gruen JR, Yu P, Dimitrova D, Barrow J, Radisky E, Edwards CQ, Griffen LM, Kushner JP. Ajioka RS, Jorde LB, Gruen JR, Yu P, Dimitrova D, Barrow J, Radisky E, Edwards CQ, Griffen LM, Kushner JP. Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1439-47.
- Amelung PJ, Panhuysen CI, Postma DS, Levitt RC, Koeter GH, Francomano CA, Bleecker ER, Meyers DA. Atopy and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosomes 11q and 6p. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1077-84.
- Amelung PJ, Postma DS, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Exclusion of chromosome 11q and the FcepsilonRI-beta gene as aetiological factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 397-403.
- American College of Chest Physicians and American Thoracic Society. Pulmonary terms and symbols. *Chest* 1975; 67: 583.
- American Thoracic Society. Definition and classifications of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 762-768.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Resp Dis* 1987; 136: 225-44.
- Ansari AA, Freidhoff LR, Meyers DA, Bias WB, Marsh DG. Human immune responsiveness to *Lolium perenne* pollen allergen Lol p III (rye III) is associated with HLA-DR3 and DR5. *Hum Immunol* 1989; 25: 59-71.
- Apostolakis J, Toumbis M, Konstantopoulos K, Kamaroulias D, Anagnostakis J, Georgoulas V, Fessas P, Zervas J. HLA antigens and asthma in Greeks. *Respiratory Medicine* 1996; 90: 201-4.
- Apter A, Grammer LC, Naughton B, Patterson R. Asthma in the elderly: a brief report. *N Engl Reg Allergy Proc* 1988; 9: 153-6.
- Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Gomez-Casado E, Diaz-Campos N, Santos P, Martinho A, Breda-Coimbra H. Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics* 1997; 47: 37-43.
- Arnett K. L., Parham P. HLA class I nucleotide sequences. *Tissue Antigens* 1995; 45: 217-257.
- Aron Y, Bienvenu T, Hubert D, Dusser D, Dall'Ava J, Polla BS. HLA-DR polymorphism in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 891-2.

Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R, Polla BS, Dusser D, Lockhart A, Swierczewki E. Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clin Exp Allergy*, 1995; 26: 821-8

Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1464-8.

Baines M, Ebringer A. HLA and disease. *Mol Aspects Med* 1992; 13: 263-378.

Barnes KC, Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunology Today* 1998; 19: 325-332.

Barnes PJ. Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* 1999; 402: B31-8.

Baskar S, Parronchi P, Mohapatra S, Romagnani S, Ansari AA. Human T cell responses to purified pollen allergens of the grass, *Lolium perenne*. *J Immunol* 1992; 148: 2379-83.

Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wüthrich, Pichler C, Fritsch R, Scheiner O, Kraft. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1161-70.

Belchí-Hernández J, Moreno-Grau S, Sanchez-Gascón F, Bayo J, Elvira Rendueles B, Bartolomé B, Moreno JM, Martínez Quesada J, Palacios Peláez R. Sensitization to *Zygophyllum fabago* pollen. A clinical and immunologic study. *Allergy* 1998; 53: 241-8.

Bentley AM, Menz G, Storz Ch, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 500-506.

Bleecker ER, Postma DS, Meyers DA. Evidence for multiple genetic susceptibility loci for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S113-6.

Blumenthal M, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Johnson B, Yunis EJ, Alper CA. HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR2], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. *J Immunol* 1992; 148: 411-6.

Blumenthal MN, Namboodiri K, Mendell N, Gleich G, Elston RC, Yunis E. Genetic transmission of serum IgE Levels. *Am J Med Genet* 1981; 10: 219-28.

Boehncke WH, Loeliger C, Kuehnl P, Kalbacher H, Bohm BO, Gall H. Identification of HLA-DR and -DQ alleles conferring susceptibility to pollen allergy and pollen associated food allergy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 434-41.

Bousquet J, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma: is it effective? *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1-11.

Bousquet J. Specific immunotherapy in asthma. *Allergy* 1999; 54 (supl. 56): 37-8.

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-82.

- Brady RE, Glovsky MM, Opelz G, Terasaky P, Malish DM. The association of an HLA 'asthma-associated' haplotype and immediate hypersensitivity in familial asthma. *J Immunogenet* 1981; 8: 509-17.
- Brostoff J, Mowbray JF, Kapoor A, Hollowell SJ, Rudolf M, Saunders KB. 80% of patients with intrinsic asthma are homozygous for HLA W6. Is intrinsic asthma a recessive disease? *Lancet* 1976; 2: 872-3.
- Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845-853.
- Burastero SE, Fenoglio D, Crimi E, Brusasco V, Rossi GA. Frequency of allergen-specific T lymphocytes in blood and bronchial response to allergen in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 1075-81.
- Burney P. Interpretation of epidemiological surveys of asthma. *Ciba Found Symp* 1997; 206: 111-8.
- Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320: 271-7.
- Busse W, Neaville W. Anti-immunoglobulin E for the treatment of allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 105-8.
- Busse WW, Gern JE, Dick EC. The role of respiratory viruses in asthma. *Ciba Found Symp* 1997; 206: 208-13.
- Caballero T, Pascual C, Garcia-Ara MC, Ojeda JA, Martin-Esteban M. IgE crossreactivity between mugwort pollen (*Artemisia vulgaris*) and hazelnut (*Abellana nux*) in sera from patients with sensitivity to both extracts. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1203-11.
- Camponeschi B, Lucarelli S, Frediani T, Barbato M, Quintieri F. Association of HLA-DQ7 antigen with cow milk protein allergy in Italian children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8: 106-9.
- Caraballo L, Marrugo J, Jiménez S, Angelini G, Ferrara GB. Frequency of DPB1*0401 is significantly decreased in patients with allergic asthma in a mulatto population. *Hum Immunol* 1991; 32: 157-61.
- Caraballo LR, Hernández M. HLA haplotype segregation in families with allergic asthma. *Tissue Antigens* 1990; 35: 182-6.
- Carballido JM, Carballido-Perrig N, Terres G, Heusser CH, Blaser K. Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and non-allergic individuals: cytokine patterns change in response to the antigen concentration. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1357-63.
- Cárdaba B, de Pablo R, Vilches C, Martin E, Geller-Bernstein C, De Andres B, Zaharan Y, Del Pozo V, Gallardo S, De Arruda Chaves E, Waisel Y, Palomino P, Kreisler M, Lahoz C: Allergy to olive pollen: T cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens. *Clin Exp Allergy* 26:316, 1996.

- Cárdaba B, Vilches C, Martín E, de Andrés B, del Pozo V, Hernández D, Gallardo S, Fernández JC, Villalba M, Rodríguez R, Basomba A, Kreisler M, Palomino P, Lahoz C. DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (*Ole e I*) in allergic patients. *Human Immunology* 1993; 38: 293-99.
- Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 170-7.
- Castro J, Telleria JJ, Blanco-Quiros A, Linares P, Andion R. Lack of association between atopy and RsaI polymorphism within intron 2 of the Fc(epsilon)RI-beta gene in a Spanish population sample. *Allergy* 1998; 53: 1083-6.
- Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Pomes A. Recombinant allergens for immunotherapy. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 5-8.
- Cho SH, Kim YK, Oh HB, Jung JW, Son JW, Lee MH, Jee HS, Kim YY, Min KU. Association of HLA-DRB1*07 and DRB1*04 to citrus red mite (*Panonychus citri*) and house dust mite sensitive asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1568-75.
- Ciba Foundation Guest Symposium. Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax* 1959; 14: 286-299.
- Collee JM, ten Kate LP, de Vries HG, Kliphuis JW, Bouman K, Scheffer H, Gerritsen J. Allele sharing on chromosome 11q13 in sibs with asthma and atopy. *Lancet* 1993; 342: 936.
- Cookson WO. Genetic factors in asthma. *Adv Exp Med Biol* 1996; 409: 55-60.
- Cookson WO, Hopkin JM. Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet* 1988; 1: 86-8.
- Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; 1(8650): 1292-5.
- Corbi AL, Peláez A, Errigo E, Carreira J. Cross-reactivity between *Parietaria judaica* and *Parietaria officinalis*. *Ann Allergy* 1985; 54: 142-7.
- Corne J, Djukanovic R, Thomas L, Warner J, Botta L, Grandordy B, Gygax D, Heusser C, Patalano F, Richardson W, Kilchherr E, Staehelin T, Davis F, Gordon W, Sun L, Liou R, Wang G, Chang TW, Holgate S. The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *J Clin Invest* 1997; 99: 879-87.
- Counsell CM, Bond JF, Ohman JL Jr, Greenstein JL, Garman RD. Definition of the human T-cell epitopes of Fel d 1, the major allergen of the domestic cat. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 884-94.
- Cullen M, Erlich H, Klitz W, Carrington M. Molecular mapping of a recombination hotspot located in the second intron of the human TAP2 locus. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1350-1358.
- D'Amato G, Lobefalo G. Allergenic pollens in the southern mediterranean area. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 116-22.

D'Amato M, Scotto-d'Abusco A, Maggi E, Menna T, Sacerdoti G, Maurizio SM, Iozzino S, De Santo C, Oreste U, Tosi R, D'Amato G, Baltadijeva D, Bjorksten B, Freidhoff LR, Lahoz C, Marsh DG, Rashef A, Ruffilli A: Association of responsiveness to the major pollen allergen of *Parietaria officinalis* with HLA-DRB1* alleles: a multicenter study. *Human Immunol* 1996; 46: 100-106.

De la Hoz F, Polo F, Moscoso del Prado JM, Sellés JG, Lombardero M, Carreira J. Purification of Art v I, a relevant allergen of *Artemisia vulgaris* pollen. *Mol Immunol* 1990; 27: 651-7.

Dekker JW, Nizankowska E, Schmitz-Schumann M, Pile K, Bochenek G, Dyczek A, Cookson WO, Szczeklik A. Aspirin-induced asthma and HLA-DRB1 and HLA-DPB1 genotypes. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 574-7.

DeSandro A, Nagarajan UM, Boss JM. The bare lymphocyte syndrome: molecular clues to the transcriptional regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 279-86.

Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* 1997; 7: 473-81.

Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1403-10.

Dizier MH, Sandford A, Walley A, Philippi A, Cookson W, Demenais F. Indication of linkage of serum IgE levels to the interleukin-4 gene and exclusion of the contribution of the (-590 C to T) interleukin-4 promoter polymorphism to IgE variation. *Genet Epidemiol* 1999; 16: 84-94.

Donfack J, Tsalenko A, Hoki DM, Parry R, Solway J, Leser L, Ober C: HLA-DRB1*01 alleles are associated with sensitization to cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 960-966.

Dorward AJ, Colloff MJ, MacKay NS, McSharry C, Thomson NC. Effect of house dust mite avoidance measures on adult atopic asthma. *Thorax* 1988; 43: 98-102.

Duffy DL, Healey SC, Chenevix-Trench G, Martin NG, Weger J, Lichter J. Atopy in Australia. *Nat Genet* 1995; 10: 260.

Ebner C, Schenk S, Najafian N, Siemann U, Steiner R, Fischer GW, Hoffmann K, Szepefalusi Z, Scheiner O, Kraft D. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995; 154: 1932-40.

Eisenbrey AB, Agarwal MK, Offord KP, Adolphson CR, Yunginger JW, Gleich GJ. Seasonal variation of in vitro lymphocyte proliferative response to ragweed antigen E. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 84-90.

Fasler S, Aversa G, Terr A, Therstrup-Pedersen K, de Vries JE, Yssel H. Peptide-induced anergy in allergen-specific human Th2 cells results in lack of cytokine production and B cell help for IgE synthesis. *J Immunology* 1995; 155: 4199-206.

- Faux JA, Moffatt MF, Lalvani A, Dekker J, Warrell DA, Cookson WO. Sensitivity to bee and wasp venoms: association with specific IgE responses to the bee and wasp venom and HLA DRB1 and DPB1. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 578-83.
- Fernández-Viña M. A., Bignon J. D. Primers and oligonucleotide probes (SSOP) used for DNA typing of HLA class II alleles. En: *Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implications*. Charron D (ed). EDK. Paris, 1997: 596.
- Fischer GF, Pickl WF, Fae I, Ebner C, Ferreira F, Breiteneder H, Vikoukal E, Scheiner O, Kraft D. Association between IgE response against Bet v I, the major allergen of birch pollen, and HLA-DRB alleles. *Human Immunology* 1992; 33: 259-65.
- Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky, Meyers DA, Ansari AA, Bias WB, Marsh DG. Association of HLA-DR3 with human immune response to Lol p I and Lol p II allergens in allergic subjects. *Tissue Antigens* 1988; 31: 211-9.
- García-Ortíz JC, Cosmes PM, López Asunsolo A. Allergy to foods in patients monosensitized to *Artemisia* pollen. *Allergy* 1996; 51: 927-31.
- Geraghty DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 3-7.
- Gerbase-Delima M, Gallo CA, Daher S, Solé D, Naspitz CK. HLA antigens in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 9: 150-2.
- Godard, Bousquet J, Michel FB. Extrinsic and intrinsic asthma: still a matter of debate? *Clin Asthma Rev* 1997;1:19-22.
- Gonen-Gross T, Achdout H, Gazit R, Hanna J, Mizrahi S, Markel G, Goldman-Wohl D, Yagel S, Horejsi V, Levy O, Baniyash M, Mandelboim O. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. *J Immunol* 2003; 171: 1343-51.
- Goodfriend L, Choudhury AM, Klapper DG, Coulter KM, Dorval G, Del Carpio J, Osterland CK. Ra5G, a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: isolation, HLA-DR-associated activity and amino acid sequence. *Mol Immunol* 1985; 22: 899-906.
- Grote M, Fischer S, Muller WD, Valenta R. In situ localization of a high molecular weight cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food by immunogold electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 250-7.
- Hafez M, Zedan M, el-Shennawy FA, Abd el-Hafez SA, el-Khayat H. HLA antigens and extrinsic bronchial asthma. *J Asthma* 1984; 21: 259-63
- Hall IP, Wheatley A, Dewar J, Wilkinson J, Morrison J. Fc epsilon RI-beta polymorphisms unlikely to contribute substantially to genetic risk of allergic disease. *BMJ* 1996; 312: 311.
- Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 873-9.
- Hayden C, Pereira E, Rye P, Palmer L, Gibson N, Palenque M, Hagel I, Lynch N, Goldblatt J, Lesouef P. Mutation screening of interferon-gamma as a candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1412-6.

- Heinrich J, Hoelscher B, Frye C, Meyer I, Wjst M, Wichmann HE. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 2002; 19: 1040-6.
- Heinrich J, Nowak D, Wassmer G, Jorres R, Wjst M, Berger J, Magnussen H, Wichmann HE. Age-dependent differences in the prevalence of allergic rhinitis and atopic sensitization between an eastern and a western German city. *Allergy* 1998; 53: 89-93.
- Heiss S, Fisher S, Muller WD, Weber B, Hirschwehr R, Spitzauer S, Kraft D, Valenta R. Identification of a 60 kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 938-47.
- Higgins JA, Thorpe CJ, Hayball JD, O'Hehir RE, Lamb JR. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 891-9.
- Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991; 352: 595-600.
- Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO. Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 1995; 311: 776-9.
- Himly M, Jahn Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altman F, van Ree R, Briza P, Richter K, Ebner C, Ferreira F: Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 2003; 17: 106- 8.
- Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, Berger U, Horak F, Jager S, Kraft D, Valenta R. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 196-206.
- Hizawa N, Collins G, Rafnar T, Huang, S-K, Duffy DL, Weber JL, Freidhoff LR, Ehrlich E, Marsh DG, Beaty TH, Barnes KC and The Collaborative Study On The Genetics Of Asthma (CSGA). Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 449-53 .
- Holgate ST Asthma genetics: waiting to exhale. *Nat Genet* 1997; 15: 227-9.
- Holgate ST, Corne J, Jardieu P, Fick RB, Heusser CH. Treatment of allergic airways disease with anti-IgE. *Allergy* 1998; 53: 83-8.
- Holloway JW, Doull I, Begishvili B, Beasley R, Holgate ST, Howell WM. Lack of evidence of a significant association between HLA-DR, DQ and DP genotypes and atopy in families with HDM allergy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1142-9.
- Holt PG, Macaubas C, Prescott SL, Sly PD. Microbial stimulation as an aetiological factor in atopic disease. *Allergy* 1999; 54 (supl.49): 12-6.
- Hori T, Kamikawaji N, Kimura A, Sone T, Komiyama N, Komiyama S, Sasazuki T. Japanese cedar pollinosis and HLA-DP5. *Tissue Antigens* 1996; 47: 485-91.

- Horneff G, Schou C, Wahn V. Diagnostic significance of in vitro-T-cell proliferative responses to house dust mite Der p 1 in children with dust-mite allergy. *Allergy* 1996; 51: 842-6.
- Horner AA, Raz E. Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 706-12.
- Howell WM, Holgate ST. HLA genetics and allergic disease. *Thorax* 1995; 50: 815-8.
- Howell WM, Standring P, Warner JA, Warner JO. HLA class II genotype, HLA-DR B cell surface expression and allergen specific IgE production in atopic and non-atopic members of asthmatic family pedigrees. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 (supl. 4): 35-8.
- Howell WM, Turner SJ, Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: evidence from a family-based and case-control study. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 156-62.
- Hsieh KH, Shieh CC, Hsieh RP, Liu WJ. Association of HLA-DQw2 with Chinese childhood asthma. *Tissue Antigens* 1991; 38: 181-2.
- Hu C, Hsu PN, Lin RH, Hsieh KH, Chua KY. HLA DPB1*0201 allele is negatively associated with immunoglobulin E responsiveness specific for house dust mite allergens in Taiwan. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 538-45.
- Huang SK, Marsh DG. Human T-cell responses to ragweed allergens: Amb V homologues. *Immunology* 1991; 73: 363-5.
- Huang SK, Zwollo P, Marsh DG. Class II major histocompatibility complex restriction of human T cell responses to short ragweed allergen, Amb a V. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1469-73.
- Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today* 1999; 20: 528-33.
- International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma. *Allergy* 1992; 47: 1-61.
- Ipsen H, Formgren H, Lowenstein H, Ingermann L. Immunochemical and biological characterization of a mugwort (*Artemisia vulgaris*) pollen extract. *Allergy* 1985; 40: 289-94.
- Jahn-Schmid B, Kelemen P, Himly M, Bohle B, Fischer G, Ferreira F, Ebner C. The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J Immunol* 2002; 169: 6005-11.
- Jarjour N, Calhoun W, Becky-Wells E, Gleich G, Schwartz L, Busse W. The immediate and late-phase allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1515-21.
- Johnston SL. Viruses and asthma. *Allergy* 1998; 53: 922-32.
- Katial RK, Lin FL, Stafford WW, Ledoux RA, Westley CR, Weber RW. Mugwort and sage (*Artemisia*) pollen cross-reactivity: ELISA inhibition and immunoblot evaluation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 340-6.

- Katsuki T, Shimojo N, Honma K, Tsunoo H, Kohno Y, Niimi H. Establishment and characterization of ovalbumin-specific T cell lines from patients with egg allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 344-51.
- Kawai J, Ando A, Sato T, Nakatsuji T, Tsuji K, Inoko H. Analysis of gene structure and antigen determinants of DR2 antigens using DR gene transfer into mouse L cells. *J Immunol* 1989; 142: 312-7.
- Kim YK, Oh SY, Oh HB, Lee BJ, Son JW, Cho SH, Kim YY, Min KU. Positive association between HLA-DRB1*07 and specific IgE responses to purified major allergens of *D. Pteronyssinus* (Der p 1 and Der p 2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 170-4.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 224-33.
- Klein J, Sato A. The HLA system. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 702-709.
- Kumagai T, Yamanaka T, Wataya Y, Saito A, Okui T, Yano S, Tsutsumi H, Chiba S, Wakisaka A. A strong association between HLA-DR9 and gelatin allergy in the Japanese population. *Vaccine* 2001; 19: 3273-6.
- Lara-Marquez ML, Yunis JJ, Layrisse Z, Ortega F, Carvallo-Gil E, Montagnani S, Makhatadze NJ, Pocino M, Granja C, Yunis E. Immunogenetics of atopic asthma: association of DRB1*1101 DQA1*0501 DQB1*0301 haplotype with *Dermatophagoides* spp.-sensitive asthma in a sample of the Venezuelan population. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 60-71.
- Levine BB, Stember RH, Fontino M. Ragweed hayfever: genetic control and HLA haplotypes. *Science* 1972; 178: 1201-3.
- Li PK, Lai CK, Poon AS, Ho AS, Chan CH, Lai KN. Lack of association between HLA-DQ and -DR genotypes and asthma in southern Chinese patients. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 323-31.
- Libro blanco. La alergia en la práctica diaria del médico de asistencia primaria y en la farmacia. Patologías alérgicas de mayor alcance social. SEAIC-UCB PHARMA, 1999
- Liebers V, Sander I, Van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Baur X. Overview on denominated allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 494-516.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98: 437-51.
- López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewsilp P, Isarangkura D, Kanga U, Dominguez O, Coto E, Peña M, Setién F, Gonzalez-Roces S: HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-76.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Mach B, Tiercy JM. Genotypic typing of HLA class II: from the bench to the bedside. *Hum Immunol* 1991; 30: 278-84.

- Mansur AH, Williams GA, Bishop DT, Markham AF, Lewis S, Britton J, Morrison JFJ. Evidence for a role of HLA DRB1 alleles in the control of IgE levels, strengthened by interacting TCR A/D marker alleles. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1371-8.
- Mapp CE, Beghe B, Balboni A, Zamorani G, Padoan M, Jovine L, Baricordi OR, Fabbri LM. Association between HLA genes and susceptibility to toluene diisocyanate-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 651-6.
- Marsh DG Approaches toward the genetic analysis of complex traits: asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S133-8.
- Marsh DG, Blumenthal MN, Ishikawa T, Ruffilli A, Sparholt S, Freidhoff LR. HLA and specific immune responsiveness to allergens. En: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki (eds): *HLA 1991. Proceedings of the Eleven International Histocompatibility Workshop and Conference. Vol I.* Oxford University Press, Oxford. 1992.
- Marsh DG, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Bias WB, Roebber M. Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen Amb a VI (Ra6) is associated with HLA-DR5 in allergic humans. *Immunogenetics* 1987; 26: 230-6.
- Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ.* 1986; 64: 767-74.
- Marsh DG, Hsu SH, Roebber M, Erlich-Kautzky E, Freidhoff LR, Meyers DA, Pollard MK, Bias WB: HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5 I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure. *J Exp Med* 1982; 155: 1452-63.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-6.
- Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system. *Hum Immunol* 2002; 63: 1213-68.
- Marsh SGE, Bodmer JG. HLA class II region nucleotide sequences. *Tissue Antigens* 1995; 45: 258-280.
- Martínez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, and the Group Health Medical Associates. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332: 133-8.
- Matsuoka H, Uno H, Kawano K, Tsuda K, Tsublochi H. MHC Class II restriction for T cell proliferative response to mite antigen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 191-6.
- Matsusita S, Muto M, Suemra M, Saito Y, Sasazuki T. HLA-linked non-responders to *Cryptomeria japonica* pollen antigen. Non-reponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T-cell. *J Immunol* 1987; 138: 109-15.

- Mehra NK, Verduijn W, Taneja V, Drabbels J, Singh SPN, Giphart MJ. Analysis of HLA-DR2-associated polymorphisms by oligonucleotide hybridization in an Asian Indian Population. *Hum Immunol* 1991; 32: 246-53.
- Miyanaga K, Juji T, Maeda H, Nakajima S, Kobayashi S. Tuberculoid leprosy and HLA in Japanese. *Tissue Antigens* 1981; 18: 331-4.
- Moffatt MF, Cookson WO. The genetics of specific allergy. *Monogr Allergy* 1996; 33: 71-96.
- Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. *Thorax* 1999; 54: 757-61.
- Mohapatra S, Cao Y, Ni H, Salo D. In pursuit of the "holy grail": recombinant allergens and peptides as catalysts for the allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 1995; 50: 37-44.
- Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC. NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol* 2003; 24: 136-43.
- Morris MJ, Faux JA, Ting A, Morris PJ, Lane DJ. HLA-A, B and C and HLA-DR antigens and allergic asthma. *Clin Allergy* 1980; 10: 173-9.
- Muers MF, Faux JA, Ting A, Morris PJ. HLA-A, B, C and HLA-DR antigens in extrinsic allergic alveolitis (budgerigar fancier's lung disease). *Clin Allergy* 1982; 12: 47-53.
- Mullarkey MF, Thomas PS, Hansen JA, Webb DR, Nisperos B. Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQw2. *Rev Respir Dis* 1986; 133: 261-3.
- Munuera M, Carrión J, García J: Winter blooming of Artemisia. A 2-year survey in Murcia (Spain). *Aerobiologia* 1998; 14: 109-16.
- Munuera M, Carrión JS, Navarro C, Orts Llopis, Espín A, Sáez F, García-Sellés J. En: *Polen y alergias. Guía de las plantas de polen alergógeno de la Región de Murcia y España*. Manuel Munuera, Diego Marín (eds). Murcia. 2001.
- Muro M, Marín L, Torío A, Moya-Quiles MR, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis MJ, García-Calatayud MC, García-Alonso AM, Alvarez-Lopez MR: HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): In the cradle of the archaelogic Iberians. *Human Immunol* 2001; 62: 910-921.
- Murthy VL, Stern LJ. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure* 1997; 5: 1385-96.
- Naser S., Burtchen N, Kussebi F., Millner M., Kroczeck R., Jung T., Schwinger R., Wahn U., Renz H. Stimulation of IgE and IgA production by CD45RA T helper cells in atopic patients. *J Immunol* 1996; 157: 441-8.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Educational Program, Expert Panel Report. Executive Summary: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda (MD): NIH Publication n° 91-3042A, 1991.

National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program, Expert Panel Report 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma: clinical practice guidelines. Bethesda (MD): NIH Publication n° 97-4051, 1997.

Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 493-525.

Nilsen BM, Paulsen BS. Isolation and characterization of a glycoprotein allergen, Art v II, from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *Mol Immunol* 1990; 27: 1047-56.

Nilsen BM, Sletten K, Pausen BS, O'Neill M, van Halbeek H. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from the pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *J Biol Chem* 1991a; 266: 2660-8.

Nilsen BM, Grinsoem A, Pausen BS. Identification and characterization of important allergens from mugwort pollen by IEF, SDS-PAGE and immunoblotting. *Mol Immunol* 1991b; 28: 733-42.

Norman PS, Ohman JL Jr, Long AA, Creticos PS, Gefter MA, Shaked Z, Wood RA, Eggleston PA, Hafner KB, Rao P, Lichtenstein LM, Jones NH, Nicodemus CF: Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1623-8.

O'Brien RM, Tait BD, Varney MD, Thomas WR. HLA-DPB1 alleles in house dust mite allergic patients. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 281-4.

O'Brien RM, Thomas WR, Nicholson I, Lamb JR, Tait BD. An immunogenetic analysis of the T-cell recognition of the major house dust mite allergen Der p 2: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. *Immunology* 1995; 86: 176-82.

O'Hehir RE, Mach B, Berte C, Greenlaw R, Tiercy JM, Bal V, Lechler RI, Trowsdale J, Lamb JR. Direct evidence for a functional role of HLA-DRB1 and -DRB3 gene products in the recognition of *Dermatophagoides* spp. (house dust mite) by helper T lymphocytes. *Int Immunol* 1990; 2: 885-92.

Olsen OT, Frolund L, Heinig J, Jacobsen L, Svendsen UG. A double-blind, randomized study investigating the efficacy and specificity of immunotherapy with *Artemisia vulgaris* or *Phleum pratense/betula verrucosa*. *Allergol Immunopathol Madr* 1995; 23: 73-8.

Ortega N, Quiralte J, Blanco C, Castillo R, Alvarez MJ, Carrillo T. Tobacco allergy: demonstration fo cross-reactivity with other members of Solenaceae family and mugwort pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 194-7.

Ostergaard PA, Eriksen J. Association between HLA-A1,B8 in children with extrinsic asthma and IgA deficiency. *Eur J Pediatr* 1979; 131: 263-70.

Ou D, Mitchell LA, Tingle AJ. A new categorization of HLA-DR alleles on a functional basis. *Human Immunol* 1998; 59: 665-676.

Owerbach D, Gunn S, Gabby KH. Primary association of HLA-DQw8 with Type 1 diabetes in DR4 patients. *Diabetes* 1989; 38: 942-5.

- Pagán JA, Carreira J, Lombardero M, García-Sellés FJ, Munuera M, Carreño A, Milán JM, Contreras L, Funes. Alergenos. En: *Rinitis alérgica. Mecanismos y tratamiento*. JM. Negro (ed). Edika med. 1996. Barcelona.
- Parkkonen P, Hyoty H, Ilonen J, Reijonen H, Yla-Herttuala S, Leinikki P. Antibody reactivity to an Epstein-Barr virus BERF4-encoded occurring also in Asp-57 region of HLA-DQ8 beta chain. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 287-93.
- Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Conti A, Ispano M, Fortunato D, Bengtsson A, Bianchi M. Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110: 310-7.
- Pattemore PK, Johnston SL, Bardin PG. Viruses as precipitants of asthma symptoms.I. Epidemiology. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 325-36.
- Pepys J. Skin testing. *Br J Hosp Med* 1975; 14: 412-416.
- Prieto L, Gutiérrez V. La entidad del asma intrínseca. *Med Clin* 1998; 110: 135-137.
- Quiralte J, Sanchez-Garcia F, Torres MJ, Blanco C, Castillo R, Ortega N, de Castro FR, Perez-Aciego P, Carrillo T. Association of HLA-DR11 with the anaphylactoid reaction caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 685-9.
- Rachelefsky G, Park MS, Siegel S, Terasaki PI, Katz R, Saito S. Strong association between B-lymphocyte group-2 specificity and asthma. *Lancet* 1976; 2(7994):1042-4.
- Rackerman FM. A working classification of asthma. *Am J Med* 1947; 3: 601-6.
- Raghavan M. Immunodeficiency due to defective antigen processing: the molecular basis for type 1 bare lymphocyte syndrome. *J Clin Invest* 1999; 103: 595-6.
- Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with succesful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18: 478-82.
- Raychaudhuri S, Morrow WJ. Can soluble antigens induce CD8+ cytotoxic T-cell responses? A paradox revisited. *Immunol Today* 1993; 14: 344-8.
- Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 21-31.
- Rihs HP, Chen Z, Rueff F, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X, Moneret-Vautrin DA, Bruning T. HLA-DQ8 and the HLA-DQ8-DR4 haplotype are positively associated with the hevein-specific IgE immune response in health care workers with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 507-14.
- Rollini P, Mach B, Gorski J. Linkage map of three HLA-DR beta-chain genes: evidence for a recent duplication event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7197-201.
- Romagnani S. The role off lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 399-408.
- Rosenwasser LJ, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S152-5.

- Rosenwasser LJ. Genetics of asthma and atopy. *Toxicol Lett* 1996; 86: 73-7.
- Ruffilli A, D'Amato M, Menna T, Maggi E, Sacerdoti G, Lahoz C. Responsiveness to the major pollen allergen of *Parietaria officinalis* is associated with defined HLA-DRB1* alleles in Italian and Spanish allergic patients. *Adv Exp Med Biol* 1996; 409: 75-9.
- Sakihama T., Smolyar A., Reinherz E. L. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. *Immunol Today* 1995; 16: 581-587.
- Sánchez-Guerrero IM, Herrero N, Muro M, Vegara RP, Campos M, García-Alonso AM, Alvarez MR. Co-stimulation of cultured peripheral blood mononuclear cells from intrinsic asthmatics with exogenous recombinant IL-6 produce high levels of IL-4-dependent IgE. *Eur Respir J* 1997; 10: 2091-2096.
- Sanchez-Velasco P, Mendizabal L, Anton EM, Ocejo-Vinyals G, Jerez J, Leyva-Cobian F. Association of hypersensitivity to the nematode *Anisakis simplex* with HLA class II DRB1*1502-DQB1*0601 haplotype. *Hum Immunol* 2000; 61: 314-9.
- Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WO. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993; 341: 332-4.
- Sasazuki T, Kimura A. 11th International HLA Workshop DNA Component Report, Yokohama, Japan, 1991. En: *HLA 1991*. London, Oxford Science 1992.
- Schwartz BD. HLA molecules: sentinels of the immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 211-2.
- Senechal H, Geny S, Desvaux FX, Busson M, Mayer C, Aron Y, Oster JP, Bessot JC, Peltre G, Pauli G, Swierczewski E. Genetics and specific immune response in allergy to birch pollen and food: evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II allele HLA-DR7. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 395-401.
- Shinbara M, Kondo N, Agata H, Fukutomi O, Nishida T, Kobayashi Y, Orii T. T cell proliferation restricted by HLA class II molecules in patients with hen's egg allergy. *Exp Clin Immunogenet* 1995; 12: 103-10.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-9.
- Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994; 7: 125-9.
- Sjostedt L, Willers S, Orbaek P. Human leukocyte antigens in occupational allergy: a possible protective effect of HLA-B16 in laboratory animal allergy. *Am J Ind Med* 1996; 30: 415-20.
- Soriano JB, Ercilla G, Sunyer J, Real FX, Lazaro C, Rodrigo MJ, Estivill X, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Morell F, Anto JM. HLA class II genes in soybean epidemic asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1394-8.

- Sparholt SH, Georgsen J, Madsen HO, Svendsen UG, Schou C. Association between HLA-DRB3*0101 and immunoglobulin-E responsiveness to Bet v I. *Hum Immunol* 1994; 39: 76-8.
- Spiegelberg HL, Beck L, Stevenson DD, Ishioka GY. Recognition of T cell epitopes and lymphokine secretion by rye grass allergen Lolium perenne I-specific human T cell clones. *J Immunol* 1994; 152: 4706-11.
- Spieksma FTM, Charpin H, Nolard N, Stix E: City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). IV summer weed pollen (Rumex, Plantago, Chenopodiaceae, Artemisia) 1976 and 1977. *Clin Allergy* 1980; 10: 319-29.
- Stephan V, Schmid V, Frischer T, Sparholt S, Forster J, Wahn V, Kuehr J. Mite allergy, clinical atopy, and restriction by HLA class II immune response genes. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7: 28-34.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989, 18; 299: 1259-60.
- Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, Strannegard O. Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. *Allergy* 1998; 53: 249-54.
- Strumvoll S, Kerstin W, Lindhom J, Spitzauer S, Colombo P, Duro G, Kraft D, Geraci D, Valenta R. Identification of cross-reactive and genuine Parietaria judiaca pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 974-9.
- Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43: 18-27.
- Tautz C, Rihs HP, Thiele A, Zwollo P, Freidhoff LR, Marsh DG, Bauer X: Association of class II sequences encoding DR1 and DQ5 specificities with hypersensitivity to chironomid allergen Chi t I. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 918-25.
- Terasaki PI, McClelland JD, Park MS, McCurdy B. Microdot assay of human serum cytotoxins. In: Ray JG, Hare DB, Pederson PD, Kayhoe DE, Eds. *Manual of tissue typing techniques*. Washington, DC: Department of Health, Education and Welfare Publications, 1974: 67.
- Texier C, Puvelle S, Busson M, Hervé M, Charron D, Ménes A, Maillère B. HLA-DR restricted peptides candidates for bee venom immunotherapy. *J Immunol* 2000; 164: 3177-84.
- The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 1997; 15: 389-392.
- Thorsby E, Ronningen KS. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 371-7.
- Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997; 53: 1-11.
- Torío A, Sánchez-Guerrero I, Muro M, Herrero N, Marín L, Pagán J, García-Calatayud MC, Alvarez-López MR: Association between DRB1*01 and allergic patients to *Artemisia vulgaris*. *Eur J Immunogenet* 1998; 25 (supl. 1): 65.

- Torío A, Sánchez-Guerrero I, Muro M, Herrero N, Pagán J, Minguela A, Marín L, Moya-Quiles MR, Sanchís MJ, Alvarez-López MR. Analysis of the phenotypic distribution of HLA class I and class II in atopic and non-atopic asthma patients. *Eur J Immunogenet* 2000; 27: 81-5.
- Torío A, Sánchez-Guerrero I, Muro M, Villar LM, Minguela A, Marín L, Moya-Quiles MR, Montes-Ares O, Pagán J, Alvarez-López MR. HLA Class II allele frequencies in atopic asthma. Association between DRB1* 01 - DQB1*0501 and *Artemisia vulgaris* allergic asthma. *Human Immunology* , 2003; 64: 811-815.
- Torres-Galván MJ, Quiralte J, Blanco C, Castillo R, Carrillo T, Pérez-Aciego P, Sánchez-García F. Linkage of house dust mite allergy with the HLA region. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 198-203.
- Turton CW, Morris L, Buckingham JA, Lawler SD, Turner-Warwick M. Histocompatibility antigens in asthma: population and family studies. *Thorax* 1979; 34: 670-6.
- Ulbrecht M, Eisenhut T, Bonisch J, Kruse R, Wjst M, Heinrich J, Wichmann HE, Weiss EH, Albert ED. High serum IgE concentrations: association with HLA-DR and markers on chromosome 5q31 and chromosome 11q13. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 828-36.
- Undem BJ, Carr MJ. The role of nerves in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2: 159-65.
- Vallier P, Dechamp C, Vial O, Deviller P. A study of allergens in celery with cross-sensitivity to mugwort and birch pollen. *Clin Allergy* 1988; 18: 491-500.
- Van Herwerden L, Harrap SB, Wong ZY, Abramson MJ, Kutin JJ, Forbes AB, Raven J, Lanigan A, Walters EH. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. *Lancet* 1995; 346: 1262-5.
- Van Neerven RJJ, Ebner C, Yssel H, Kapsenberg ML, Lamb JR: T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunol Today* 1996; 17: 526-32.
- Van Uden J, Raz E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 902-10.
- Von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 358-64.
- Walker C, Virchow JC, Bruijnzeel PLP, Blaser K T cell subsets and their soluble products in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* 1991; 146: 1829-1835.
- Wang SZ, Forsyth KD. Asthma and respiratory syncytial virus infection in infancy: is there a link?. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 927-35.
- Wang WX, Yang SZ, Chui XW, Zhang HL. Association of HLA-Bw61 with asthma in Chinese. *Tissue Antigens* 1988; 32: 215-7.
- Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324: 1110-8.
- Welliver Rc, Wong Dt, Sun M, Middleton E, Vaughan RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med* 1981; 305: 841-6.

- Wierenga EA, Snoek M, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1519-26.
- Wilkinson J, Holgate ST. Candidate gene loci in asthmatic and allergic inflammation. *Thorax* 1996; 51: 3-8.
- Wohlleben G, Erb KJ. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol* 2001; 22: 618-26.
- Woolf B: On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19: 251-5.
- Wopfner N, Willeroidee M, Hebenstreit D, van Ree R, Aalbers M, Briza P, Thalhamer J, Ebner C, Richter K, Ferreira F. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biol Chem* 2002; 383: 1779-89.
- Woszczek G, Kowalski ML, Borowiec M. Association of asthma and total IgE levels with human leucocyte antigen-DR in patients with grass allergy. *Eur Resp J* 2002; 20: 79-85.
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705.
- Wurtzen PA, van Neerven RJ, Arned J, Ipsen H, Sparholt SH. Dissection of the grass allergen-specific immune response in patients with allergies and control subjects: T-cell proliferation in patients does not correlate with specific serum IgE and skin reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 241-9.
- Wüthrich B, Schindler C, Leuenberg P, Ackermann-Liebrich U. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss study on air pollution and lung diseases in adults. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 149-56.
- Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG. TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1261-9.
- Young RP, Barker RD, Pile KD, Cookson WO, Taylor AJ. The association of HLA-DR3 with specific IgE to inhaled acid anhydrides. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 219-21.
- Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, Rosenberg WMC, Bell JI, Hopkin JM, Cookson WO: HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 431-9.
- Yssel H, Johnson KE, Schneider PV, Wideman J, Terr A, Kastelein R, De Vries JE. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. *J Immunol* 1992; 148: 738-45.

Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN- γ independent and IL-4 dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J Immunol* 1991; 146: 1836-42.

Zwollo P, Ehrlich-Kautzky E, Scharf SJ, Ansari AA, Erlich HA, Marsh DG. Sequencing of HLA-D in responders and nonresponders to short ragweed allergen, Amb a V. *Immunogenetics* 1991; 33: 141-51.