

17.7.15

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



* 5 3 0 9 5 7 0 3 8 X *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ESTUDIOS SOBRE EL PAPEL DE LA INMUNOGLOBULINA G₄ EN LA ALERGIA

TESIS DOCTORAL
por
LUCIA JIMENO NOGALES

Director: Dr. Manuel Lombardero Vega

V^o B^o

Madrid, 1992

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Investigación Biológica de Alergia e Inmunología Abelló, S.A. bajo la dirección del Dr. Manuel Lombardero, a quien también quiero agradecer su paciencia y su confianza, sobre todo durante los primeros meses. También deseo agradecer:

- Al Dr. José Carreira, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, a pesar de las dificultades y por su confianza en mí.

- Al Dr. Jaime Moscoso del Prado, que ha colaborado en el desarrollo de esta tesis, por sus ideas, sus críticas y su amistad.

- Al Dr. Agustín Zapata, por su colaboración, sus agradables conversaciones e intercambios científicos, así como por facilitarme la burocracia.

- Al Dr. Carlos Fernández, mi tutor.

- A Isabel Courinha, responsable de la estética de esta tesis, por las horas alegres y depresivas compartidas delante del ordenador.

- A todos los demás compañeros del laboratorio, a quienes se la dedico por orden alfabético y sin títulos. A Carmen Audera, por ser mi médica y profesora de inglés particular y más cosas. A Consuelo Serrano, mi choferesa favorita, porque es una más de mi familia. A Ernesto Soler, responsable de las extracciones de sangre, porque sin su maravillosa técnica con la aguja no hubiera conseguido tantos voluntarios para donar sangre. A Francisco de la Hoz, por sus sensatos consejos sobre mi futuro y por sus alegres cánticos vespertinos. A Florentino Polo, porque sus palabras siempre me han dado ánimos y confianza y algún que otro secretito. A Jaime Ramírez, por soportar también a Urano. A Oscar Duffort, con quien realicé el trabajo de gato, por su brillante idea sobre mi futuro al regalarme un Tarot. A Pilar Ventas, a quien me une la "Suerte", por estar a mi lado. A Rosa Ayuso, por su maravillosa compañía y amistad. A Rosa González, por su ayuda con las manualidades y por compartir cariñosamente muchos momentos. A Teodoro Obispo, por casi todas sus "cositas" y para que no haya dos sin tres. A Teresa Mediavilla, por ser "su Luci" y por sus mimos.

- También quiero agradecer a todos los compañeros del Departamento de Científico y muy especialmente: A Pilar Díaz, por su ayuda con la bibliografía. A Pilar Rico, por suministrarme sueros y por los ratos que hemos pasado tan divertidos entre inmunoterapia e inmunoterapia. A Santiago Martín, responsable de la estadística de este trabajo, por su compañía.

- A toda mi gente: A mis amigos (Elena, Emilia, Enrique, Félix, Isabel, Manrique, Mayte, Mercedes, Pablo y Santos), por soportar alguna neura que otra. A mi familia, a mi hermana Amalia y a mis padres, sin los que no hubiera llegado hasta aquí. Y claro está, a Andrés, por todo.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LA IgG ₄	4
1.2 PROPIEDADES BIOLOGICAS DE LA IgG ₄	5
1.2.1 Concentración sérica	5
1.2.2 Valencia funcional y afinidad	6
1.2.3 Activación del complemento	7
1.2.4 Unión a los receptores Fc	8
1.2.5 Otras propiedades	8
1.3 REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE IgG ₄	9
1.4 PAPEL DE LA IgG ₄ EN LA PROTECCION FRENTE A INFECCIONES	10
1.5. PAPEL DE LA IgG ₄ EN LA ALERGIA	12
1.5.1 Implicación de la IgG ₄ en la liberación de mediadores	15
1.5.2 Comportamiento sérico de la IgG ₄ en enfermedades alérgicas	17
1.5.3 Comportamiento de la IgG ₄ en los tratamientos de Inmunoterapia	19
1.6 OBJETIVOS	21
2. MATERIALES	23
2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION	23
2.2 SUEROS Y MUESTRAS DE SANGRE HUMANA	23
2.3 EXTRACTOS ALERGENICOS	23
2.4 INMUNOGLOBULINAS Y ANTICUERPOS	23
2.5 LINEAS CELULARES	24
2.6 PRODUCTOS QUIMICOS Y ENZIMATICOS	24
2.7 MEDIOS DE CULTIVO	25

2.8 MATERIAL DE CULTIVO	26
2.9 MATERIAL DE INMUNOENSAYO	26
2.10 MATERIAL DE CROMATOGRAFIA	26
2.11 PRODUCTOS RADIATIVOS	27
2.12 MATERIAL FOTOGRAFICO	27
3. METODOS	28
3.1 OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y TECNICAS DE CULTIVO CELULAR	28
3.1.1 Inmunización	28
3.1.2 Fusión celular	29
3.1.3 Clonaje celular	30
3.1.4 Congelación y descongelación de líneas celulares	30
3.2 ENSAYOS DE SELECCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	31
3.2.1 Determinación del título del suero de los ratones inmunizados	32
3.2.2 Selección de híbridos secretores de anticuerpos monoclonales	32
3.3 OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA PURIFICACION	32
3.4 PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	33
3.4.1 Purificación por proteína A-Sepharose	33
3.4.2 Purificación por precipitación con ácido octanoico	34
3.4.3 Control de la purificación	34
3.5 METODOS PARA LA CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	34
3.5.1 Determinación del isotipo	34
3.5.2 Determinación de la K de afinidad	35
3.5.3 Ensayos de competición entre los anticuerpos monoclonales	35
3.5.4 Digestión con papaína	35

3.6 TECNICAS ELECTROFORETICAS	35
3.7 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANAS DE PVDF	36
3.8 INMUNODETECCION DE PROTEINAS EN MEMBRANAS DE PVDF	37
3.9 MARCAJE DE ANTICUERPOS CON ISOTOPOS RADIATIVOS	37
3.10 MARCAJES NO RADIATIVOS	38
3.10.1 Marcaje del GAM con Peroxidasa	38
3.10.2 Marcaje del GAM con Fluoresceína	38
3.10.3 Marcaje del anticuerpo monoclonal G4T.9 con Biotina	38
3.10.4 Marcaje del anticuerpo monoclonal G4T.9 con β -galactosidasa	39
3.11 ENSAYOS DE CUANTIFICACION DE IgG ₄	39
3.11.1 ELISA para la cuantificación de IgG ₄ total	39
3.11.2 ELISA para la cuantificación de IgG ₄ específica	39
3.12 OTROS ENSAYOS	40
3.13 ENSAYOS DE LIBERACION DE MEDIADORES	41
3.13.1 Ensayo de liberación de histamina	41
3.13.2 Ensayo de liberación de leucotrieno C ₄	41
3.14 DETECCION DE IgG ₄ EN BASOFILOS POR INMUNOFLUORESCENCIA	42
3.14.1 Preparación y tinción de basófilos	42
3.14.2 Análisis por inmunofluorescencia	42
3.15 ANALISIS ESTADISTICO	42
4. RESULTADOS	43
4.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTI-CUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG ₄	43
4.1.1 Producción de anticuerpos monoclonales	43
4.1.2 Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-IgG ₄	46
4.1.2.1 Determinación de la clase y constante de afinidad de los anticuerpos monoclonales	46

4.1.2.2	Determinación del número de epítomos definidos por los anticuerpos monoclonales	47
4.1.2.3	Localización de los epítomos definidos por los anticuerpos monoclonales	47
4.2	ENSAYOS DE VALORACION DE IgG ₄	51
4.2.1	ELISA para la cuantificación de IgG ₄ total	51
4.2.2	ELISA para la cuantificación de IgG ₄ específica	55
4.2.2.1	Preparación de la curva de referencia	56
4.2.2.2	Propiedades del ensayo	58
4.3	VALORACION DEL COMPORTAMIENTO DE LA IgG ₄ EN ALERGIA	61
4.3.1	Determinación de los niveles de IgG ₄ total	61
4.3.2	Determinación de los niveles de IgG ₄ específica	62
4.3.3	Comportamiento de la IgG ₄ en Inmunoterapia	64
4.4	ESTUDIOS DE LIBERACION DE MEDIADORES INDUCIDA POR IgG ₄	71
4.4.1	Inducción de liberación de histamina por los anticuerpos monoclonales anti-IgG ₄	71
4.4.2	Comparación de las respuestas de liberación de histamina mediadas por IgG ₄ e IgE	72
4.4.3	Efecto del empleo de un 2º anticuerpo anti-IgG de ratón sobre la liberación de histamina inducida por los AcM anti-IgG ₄	74
4.4.4	Efecto del D ₂ O sobre la inducción de liberación de histamina por los anticuerpos monoclonales	75
4.4.5	Inducción de liberación de leucotrieno C ₄ por IgG ₄	76
4.4.6	Presencia de la IgG ₄ en la membrana del basófilo	77
5.	DISCUCION	79
5.1.	OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	79
5.2	ENSAYOS DE CUANTIFICACION DE IgG ₄	81
5.2.1	Cuantificación de IgG ₄ total	81
5.2.2	Cuantificación de IgG ₄ específica	83
5.3	COMPORTAMIENTO SERICO DE LA IgG ₄ EN ALERGIA	88
5.4	COMPORTAMIENTO DE LA IgG ₄ EN LA LIBERACION DE MEDIADORES ANAFILACTICOS	90

6. CONCLUSIONES

96

7. BIBLIOGRAFIA

99

ABREVIATURAS

ACP: Anafilaxis Cutánea Pasiva

Ac: Anticuerpo(s)

AcM: Anticuerpos(s) Monoclonal(es)

Ag: Antígeno(s)

CV: Coeficiente de Variación

DO: Densidad Optica

DS: Desviación Estándar

ELISA: *Ensayo de inmunoadsorción enzimático*

GAM: Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón

Ig: Inmunoglobulina(s)

IT: Inmunoterapia

LH: Liberación de Histamina

LTC₄: Leucotrieno C4

OMS: Organización Mundial de la Salud

RIA: Radioinmunoensayo

1. INTRODUCCION

El sistema inmune humano está formado por dos componentes funcionales: el sistema innato y el adaptativo. El sistema inmune innato previene de la entrada de los agentes infecciosos mediante una gran variedad de barreras fisiológicas corporales (piel, mucosas, etc.). El sistema inmune adaptativo actúa causando una reacción específica contra el agente dañino eliminándolo y además, se caracteriza por desarrollar una memoria específica inmunológica que previene de una reinfección del mismo agente. El componente adaptativo está formado por una gran variedad de células y moléculas, de las cuales los linfocitos y las inmunoglobulinas (Ig) son los más importantes. Existen dos tipos de linfocitos, los T que están implicados en la inmunidad celular y los B, en la humoral. Como consecuencia de una exposición a un determinado antígeno (Ag), las células B se diferencian en células plasmáticas que se caracterizan por sintetizar unas moléculas que reaccionan con el Ag. Estas moléculas son los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas. De las 5 clases de Ig humanas, la IgG es la predominante y se caracteriza por diferenciarse en 4 subclases (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) según sus determinantes antigénicos, sus propiedades físico-químicas y sus funciones biológicas. Desde que se establecieron las bases de este polimorfismo se ha buscado su relevancia fisiológica. Así, sería interesante saber por qué determinados antígenos provocan una respuesta restringida a una subclase, o por qué difieren estas subclases en su capacidad de protección del organismo o por qué determinadas patologías están asociadas con alteraciones de ciertas subclases.

Las cuatro subclases de la IgG humana pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas que son un grupo de glicoproteínas (poseen un 2-3% de carbohidratos) compuestas por 2 cadenas pesadas idénticas (H) y 2 cadenas ligeras idénticas (L) unidas por fuerzas no covalentes y por puentes disulfuro. Las regiones amino terminales de la cadena H (V_H) y de la L (V_L) se caracterizan por tener una gran variabilidad en su secuencia de aminoácidos. En estas regiones existen unas secuencias que exhiben una variabilidad extrema y se denominan regiones hipervariables. Por el contrario, las regiones C-terminales de ambas cadenas poseen muy poca variación en su secuencia. La parte no variable de la cadena ligera se denomina C_L y la de la cadena pesada, C_H. Esta última está formada por los dominios C_H1, región bisagra, C_H2 y C_H3. Funcionalmente, las regiones V están implicadas en el reconocimiento y unión del Ag. Las regiones C sin embargo, son las responsables de las funciones efectoras de la IgG. Entre los brazos Fab (constituídos por los dominios V de ambas cadenas y por los dominios C_L y C_H1) y los dominios C-terminales de la cadena pesada en el Fc, se encuentra la región bisagra. La región bisagra tiene la función de proveer flexibilidad entre los diferentes segmentos de la IgG. Esta función es importante porque parece tener una gran influencia sobre algunas funciones efectoras de la IgG, como más adelante se comentará. La diferenciación de la IgG en 4 subclases está basada en diferencias estructurales y fisicoquímicas y en las distintas funciones efectoras.

Diferencias estructurales y físicoquímicas

Las diferencias estructurales entre las cuatro subclases de IgG, cuyos esquemas se representan en la Figura 1.1, se encuentran en los siguientes puntos:

- Región bisagra. Tanto en términos de residuos implicados como en el número de puentes disulfuro intercatenarios.

- Posición del puente disulfuro entre las cadenas H y L.

- Composición de carbohidratos. Todas las IgG poseen oligosacáridos asociados al Fc, aunque no está bien definido en todos los casos ni su composición de monosacáridos, ni el punto de anclaje. Parece que están unidos al dominio C_H2 a través de un enlace N-glicosídico y se han detectado hasta 20 estructuras diferentes basadas en un núcleo de manosa quitobiosa. También se ha visto que algunas IgG poseen oligosacáridos unidos al Fab a través de enlaces N-glicosídicos (Burton, 1985). Además de mantener la estabilidad de los dominios son importantes porque influyen en la susceptibilidad a la proteólisis y en su vida media en el organismo.

- Secuencia de aminoácidos y marcadores genéticos. Si comparamos las secuencias primarias de las distintas cadenas H encontramos que existe un alto grado de homología, aunque por supuesto existan diferencias antigénicas. Además de estas diferencias de secuencia, existe una variación alotípica que se refiere a la variación genética dentro de una especie que implica alelos diferentes en un locus determinado. Estos alotipos, que se caracterizan normalmente por pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos, son marcadores que no están presentes en todos los individuos y se encuentran tanto en los dominios de la cadena H (Gm) como en la L (Km). Cuando un marcador se comporta como alotípico para una(s) determinada subclase de IgG y como isotípico para otra(s), se denomina isoalotipo. La presencia de estos marcadores es importante porque están asociados con incrementos o disminuciones en las respuestas frente a determinados Ag.

- Proporción entre las cadenas L ($\lambda:\kappa$).

A nivel físicoquímico, las cuatro subclases se diferencian en el peso molecular, coeficiente de sedimentación, movilidad electroforética y susceptibilidad a las digestiones proteolíticas.

Diferencias en las propiedades biológicas

Las diferencias estructurales anteriormente mencionadas son en gran parte responsables de las diferentes propiedades biológicas que presentan las distintas subclases de IgG. Estas propiedades son por un lado, las relacionadas con la unión al antígeno (afinidad y valencia funcional) y por otro, sus funciones efectoras (unión al complemento, unión a los receptores Fc, etc.). Más adelante, se comentarán con detalle.

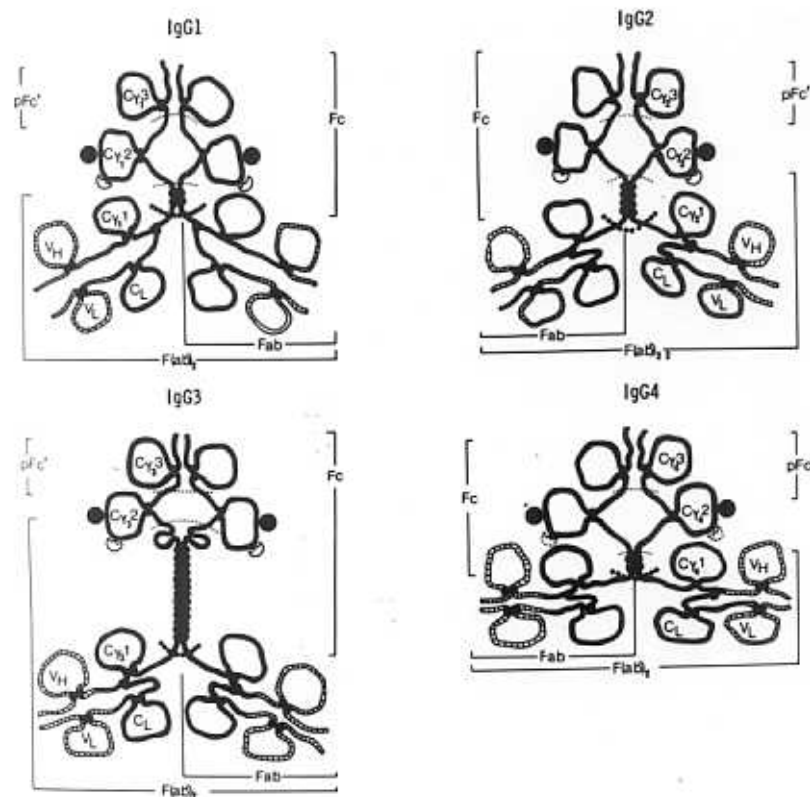


Figura 1.1. ESTRUCTURA DE LAS CUATRO SUBCLASES DE LA IgG HUMANA. En la Figura se representan las regiones constantes (—), regiones variables (▨▨▨), los puntos de digestión proteolítica con papaína (●●●●) y pepsina (○●●●), así como los fragmentos que se originan. También se representan las zonas de unión de oligosacáridos (●) y del componente C1 del complemento (☺).

De todas las subclases de IgG, probablemente la más llamativa sea la IgG₄ porque a pesar de representar sólo el 3-5% del total, llega a ser la Ig dominante en numerosas alteraciones clínicas (parasitosis, atopía, etc.). Además, ha recibido mucha atención debido a sus características biológicas tan especiales y diferentes de las otras subclases. El papel más estudiado de la IgG₄, que es del que se ocupa este trabajo, es su posible función en las enfermedades alérgicas en sus dos vertientes: como anti-cuerpo sensibilizante y/o bloqueante, que más adelante se comentará en detalle.

1.1. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LA IgG₄

Una de las características estructurales más importantes de la IgG₄, debido a su posible incidencia en su comportamiento biológico, es la composición de la región bisagra. Como se ha mencionado, las diferencias en esta región se deben al número de residuos implicados (IgG₁=15, IgG₂=12, IgG₃=62, IgG₄=12) y en el número de puentes disulfuro intercatenarios. La IgG₄ posee dos puentes disulfuro con una flexibilidad restringida que es intermedia entre la de IgG₁ y la de IgG₂, que dificulta el libre movimiento de los brazos Fab. Estas características, pequeño tamaño y flexibilidad limitada, podrán ser las responsables de impedir el acceso del componente C1 del complemento y por tanto, de impedir su activación (Isenman y col., 1975).

En cuanto a las características antigénicas, la IgG₄ posee aminoácidos específicos en todos los dominios C_H. Mediante el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales se ha demostrado la existencia de epítomos expresados en el dominio C_H2 y en el dominio C_H3. También existe un aminoácido específico (Lys 196) en el dominio C_H1 y no se descarta la existencia de otros tipos de determinantes específicos expresados en esta región (Jefferis, 1986). Además de estas diferencias antigénicas y en relación con la existencia de marcadores genéticos, Kunkel y col. (1970) demostraron la existencia de dos isotipos para la IgG₄, el Gm 4a presente también en todas las IgG₁ y IgG₃ y el Gm 4b presente en todas las IgG₂. Aunque no existe ningún dato que lo demuestre, se ha sugerido (Stanworth, 1983b) que estos isotipos podrían ser responsables de los diferentes papeles que la IgG₄ parece jugar. Además de estas variantes, la aplicación de varios reactivos monoclonales anti-IgG₄ ha revelado la existencia de otras dos variantes antigénicas (Walter y col., 1986). Una de ellas es la paraproteína War, que se caracteriza por expresar epítomos de IgG₂ en el dominio C_H2 y la otra es la paraproteína Sla que representa una variante que es deficiente en la expresión de los epítomos Fc de la IgG₄. La influencia de estas variaciones estructurales menores sobre las funciones efectoras aún no se ha determinado, pero de nuevo, podrían jugar un papel importante a la hora de diferenciar los distintos comportamientos de la IgG₄.

Otro distintivo estructural importante entre las subclases es su composición en oligosacáridos. En el caso concreto de la IgG₄ se ha sugerido que podría poseer un grupo carbohidrato extra en la región Fab (Halpern, 1983) y que la existencia de pequeñas variaciones en la composición de azúcares podría influir en la patología molecular de esta subclase (Stanworth, 1983b).

La IgG₄ se diferencia del resto de las subclases en la proporción de las cadenas L. De tal manera, que la relación λ:κ es la siguiente: IgG₁=2.4, IgG₂=1.1, IgG₃=1.4, IgG₄=8.0.

Finalmente, otra característica estructural de la IgG₄ que hay que mencionar y que en este caso no se trata de un distintivo especial, es la posición del puente disulfuro entre las cadenas H y L. En la IgG₄ se realiza la unión entre la región C-terminal del dominio C_L y la Cys situada en la posición 131 del dominio C_{H1}.

A nivel fisicoquímico, la IgG₄ se caracteriza por tener un peso molecular de 146.000, el punto isoeléctrico más bajo (7.2) de las subclases de IgG y la mayor movilidad electroforética, probablemente debido a su más bajo contenido en aminoácidos básicos. Esta última característica sirvió para relacionar a la IgG₄ con un comportamiento como anticuerpo anafiláctico porque los Ac de IgG descritos como anafilácticos se diferencian precisamente por su mayor movilidad.

La otra gran diferencia entre las subclases es el grado de susceptibilidad a las digestiones proteolíticas con diferentes tipos de enzimas, como la papaína y la pepsina. Así por ejemplo, la IgG₄ necesita la presencia de Cys para ser digerida por la papaína (igual que la IgG₂), porque parece ser que es necesario reducir los puentes disulfuro inter cadenas H antes de la digestión (Burton y col., 1986). Por el contrario y junto con la IgG₃ es la más sensible a la digestión con pepsina.

1.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA IgG₄

De todas las subclases de IgG, la IgG₄ es la que posee las propiedades biológicas más atípicas como se detalla a continuación.

1.2.1. Concentración sérica

Con el reconocimiento de que ciertas alteraciones de los niveles séricos de las subclases de IgG parecían estar asociadas a diversos tipos de enfermedades, se comenzó a dar mucha importancia al establecimiento de valores de referencia normales que se puedan encontrar en individuos sanos. Sin embargo, hasta ahora, no ha sido fácil alcanzar este objetivo y los resultados varían según las diferentes investigaciones, sobre todo para la IgG₄. Probablemente, alguna de estas diferencias se pueda explicar por la diversidad de técnicas y reactivos empleados, pero también por las variaciones producidas debido a factores como la edad, sexo, raza, enfermedades no manifestadas, etc.

La IgG₄ procedente de la madre a través de la placenta y la leche se va reemplazando gradualmente por la sintetizada en el niño, siendo este proceso lento puesto que hasta los 11 años no se alcanzan los niveles adultos (Lee y col., 1986).

En adultos es la menos abundante de las 4 subclases, representando entre un 0.4 y un 4 % del total de IgG. Se caracteriza además, por seguir una distribución sesgada en la población igual que la IgE, con unas desviaciones estándar de la media

muy amplias lo que hace muy poco preciso establecer valores normales. En la tabla siguiente se resumen la media y rangos de referencia publicados por varios autores:

Referencia	X(g/l) IgG₄	Rango	Ensayo	Ac	Calibrador
Morell y Skvarill (1971)	0.46	0.03-2.9	RIA	P	WHO67/97
Van Der Giessen (1975)	0.6	0.05-2.03	RID	P	Estándar propio
Shakib y col. (1975)	0.08	0.015-0.185	RID	P	Mezcla de paraproteína
French y Harrison (1984)	0.24	0.03-5.4	RID	M	WHO67/97
Auconturier y col. (1984)	0.46	0.01-1.87	CEI	M	Mezcla de paraproteínas
Layton y Stanworth (1984)	0.10	0.01-0.53	ELISA	M	Estándar propio

Tabla 1.1. P=policlonal; M=monoclonal; RIA=radioinmunoensayo; RID=inmunodifusión radial; CEI=inmunoensayo competitivo; ELISA=enzimoinmunoensayo; X representa el valor medio de concentración.

Las concentraciones en los individuos sanos se ven alteradas, como ya se ha comentado, por múltiples factores entre los que destaca el sexo. De tal forma, que parece que existe una tendencia a que la concentración de IgG₄ al igual que la de IgE, sea superior en hombres que en mujeres (Merret y col., 1983).

Finalmente, parece que su representación tanto en la superficie de las células B como en otros fluidos corporales es del 1 % del total de la IgG.

1.2.2. Valencia funcional y afinidad

La propiedad que tienen los anticuerpos IgG de formar inmunocomplejos reside precisamente en su capacidad para que cada molécula de IgG una 2 moléculas de Ag. La IgG₄, sin embargo, a pesar de tener la misma estructura que las otras sub-clases, es incapaz de comportarse como bivalente, como comprobaron Van der Zee y

col.(1986a) estudiando la formación de inmunocomplejos IgG₄-albúmina de gato y fosfolipasa (PLA). Estos autores comprobaron que los Ac IgG₄ a diferencia de los IgG₁, eran incapaces de unirse a cualquiera de estos Ag adsorbidos a una fase sólida y al mismo Ag marcado añadido en solución. Esta aparente monovalencia funcional explicaría que los complejos formados por la IgG₄ sean muy pequeños e incapaces de precipitar. Esta propiedad podría ser debido a la escasa longitud y a la rigidez de la región bisagra (Oj VT y col., 1984, Klein M, 1981). Sin embargo, cuando se ha tratado de mejorar la movilidad de los brazos Fab mediante reducción o digestión con pepsina, la IgG₄ no ha cambiado su condición de anticuerpo monovalente.

Relacionado también con la unión al Ag, la afinidad describe la fuerza de la interacción entre el sitio de unión del Ac y el determinante antigénico y por tanto es una característica muy importante en la efectividad de la respuesta inmune. Los estudios realizados inicialmente sobre la afinidad de los anticuerpos IgG₄ los llevaron a cabo Devey y col., (1985) aplicando la técnica de la precipitación con polietilenglicol 8000 al 3% para separar el Ag unido al anticuerpo del Ag libre. Sin embargo, es posible que estos resultados hayan sido debidos a la técnica empleada puesto que posteriormente, no se han podido reproducir. Tanto Van der Zee y col. (1986b) como más recientemente Devey y col. (1988) han comprobado que los anticuerpos IgG₄ no son de baja afinidad.

1.2.3. Activación del complemento

La habilidad para activar la vía clásica del complemento es una de sus principales funciones efectoras, que desencadena un conjunto de reacciones biológicas que producen inflamación y conducen a la eliminación de los agentes infecciosos. La vía clásica del sistema es activada por la interacción entre anticuerpos IgG agregados o complejos Ag-IgG con el componente C1, a través de un sitio de unión en el dominio C_H2 aún no bien definido, en el que los residuos Glu 318, Lys 320 y Lys 322 parecen esenciales (Burton, 1985).

La IgG₄, a diferencia de las otras subclases, tanto en estado nativo como agregado es incapaz de unirse al C1 y activar la cascada del complemento (Ishizaka y col., 1967). Por el contrario, los fragmentos Fc de IgG₄ actúan como potentes activadores, lo que implicaría que probablemente, el sitio de unión se encuentre impedido estéricamente por el Fab debido a la rigidez de la región bisagra. La flexibilidad de esta región no es, sin embargo, la única causa que posibilita la interacción, de hecho, hay otros factores como la contribución del C_H3 o la glicosilación del C_H2. En el caso concreto de la IgG₄, se ha demostrado recientemente (Tao y col. 1991) que existe también una estructura responsable de su comportamiento diferencial localizada en la zona C-terminal del C_H2 (residuos 292-340).

A esta característica hay que sumarle su capacidad de inhibir la precipitación y la activación del complemento por complejos Ag-IgG₁, no sólo impidiendo la interacción sino reduciendo la agregación de los complejos necesaria para la activación del complemento (Van der Zee y col., 1986b).

1.2.4. Unión a los receptores Fc

Otra función efectora importante es su habilidad para unirse a los receptores Fc (reconocen la región Fc de la IgG), los cuales están implicados en toda una serie de procesos importantes en la inmunidad celular como la fagocitosis o la liberación de mediadores inflamatorios. Según la clasificación de Anderson y Looney (1986) existen tres clases de receptores Fc (Fc_γR) para la IgG humana: Fc_γRI, de alta afinidad expresado fundamentalmente en monocitos, Fc_γRII, de afinidad intermedia expresado en una gran variedad de poblaciones celulares (monocitos, células B, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas) y finalmente, el Fc_γRIII, de baja afinidad que aparece en neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células K. Todos estos tipos celulares exhiben un patrón de afinidad para las 4 subclases muy similar: IgG₁ > IgG₃ > IgG₄ >> IgG₂. En este caso, la baja afinidad relativa de la IgG₄ no parece ser debida a un problema estérico porque los fragmentos aislados de Fc presentan la misma afinidad.

Por otro lado, se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar la existencia de receptores específicos para estas Ig en basófilos y mastocitos con el fin de llegar a entender los mecanismos de los procesos alérgicos. Dentro de este contexto, es interesante comentar que Ishizaka (1979) demostró la existencia de receptores Fc en estos tipos celulares para IgG agregada. Más recientemente (Anselmino y col., 1989), se ha podido comprobar que los basófilos poseen receptores Fc_γRII a los que la IgG₄ agregada se une con mayor afinidad (IgG₁ > IgG₂ = IgG₄ >> IgG₃) y cuya implicación en la Alergia no está determinada. Más adelante se comentará más detalladamente la presencia o ausencia, de receptores específicos para IgG₄ en basófilos.

1.2.5. Otras propiedades

Finalmente y a pesar del comportamiento diferencial que hemos visto que exhibe la IgG₄, comparte algunas propiedades con las otras subclases. Su vida media en plasma, semejante a la IgG₁ e IgG₂, es de 11-21 días. Une proteína A de *Staphylococcus aureus* a través de un sitio no muy bien determinado entre las regiones C_H2 y C_H3, en el que la existencia de una histidina en posición 435 es fundamental. También une proteína G con la misma o incluso mayor afinidad que las otras subclases.

1.3. REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE IgG₄

Se sabe que existe una restricción en la síntesis de las diferentes subclases de IgG como respuesta a diferentes tipos de antígenos. En el caso de la IgG₄, tanto su lenta aparición en los niños hasta alcanzar los niveles adultos, como su tardía aparición en las respuestas inmunes hacen pensar en un proceso de maduración y regulación diferente al resto de las subclases. A la hora de estudiar la presión selectiva hacia una u otra subclase como respuesta a un Ag hay que tener en cuenta fundamentalmente, el tipo y presentación del Ag y los mecanismos de control de las células B productoras de IgG₄.

Se producen anticuerpos IgG₄ frente a un gran número de proteínas, casi todas células T-dependientes, incluyendo antígenos alimentarios, de parásitos, venenos, etc, tanto si son antígenos inhalados o ingeridos. Por otro lado, parecen existir evidencias que sugieren que la respuesta de IgG₄ se modifica con el tiempo de estimulación. En este sentido, Aalberse y col. (1983a) demostraron que la proporción de anticuerpos IgG₄ anti-PLA en un grupo de apicultores aumentaba con el número de picaduras. Sin embargo, hasta recientemente, no se tenían datos sobre su comportamiento en la respuesta humana primaria y secundaria después de una inmunización. Puesto que para muchos Ag naturales es difícil definir la exposición primaria y secundaria ya que no es fácil excluir contactos previos, el grupo de Bird y col. (1990) eligió a la glicoproteína hemocianina de lapa (KLH) como Ag. Según estos resultados, la IgG₄ sigue un desarrollo totalmente diferente a las otras subclases. Como respuesta a la inmunización primaria, no se detecta IgG₄ durante los 4 primeros meses y sólo a partir del 6º, comienza a aumentar el título de los anticuerpos IgG₄ coincidiendo además, con la pérdida de título de los anticuerpos IgG₁. Además, la respuesta secundaria de IgG₄ es tardía, sugiriendo que se debe producir un retraso en algún mecanismo requerido en la maduración de las células B comprometidas. En cuanto a la afinidad, el perfil de maduración también es diferente para la IgG₄; las poblaciones de anticuerpos de IgG₄ de alta afinidad aparecen al final de la respuesta primaria coincidiendo con la pérdida de afinidad en los anticuerpos IgG₁ y una vez establecidas, persisten durante años. En la generación de las células B de memoria capaces de producir una respuesta rápida y de gran afinidad de IgG después de una segunda estimulación con el Ag, parece de gran importancia la retención del Ag en las células foliculares dendríticas. Los sitios donde el Ag persiste en forma de inmunocomplejos largos períodos de tiempo es en las células foliculares dendríticas en los centros germinales y esta permanencia es dependiente de la fijación de complemento por inmunocomplejos Ag-Ac. Recientemente, se ha observado (Bird y col., 1988) que cuando existe una deficiencia genética del C3 o de otro componente inicial del complemento, que parecen esenciales para la localización de los inmunocomplejos en

los centro germinales, existe también una clara deficiencia de esta subclase, lo que apoyaría la idea de que el desarrollo de los anticuerpos IgG₄ dependiera de la retención antigénica en estos centros.

Uno de los factores más importantes en el estudio de la regulación de la IgG₄ es el papel de las células T. Las células T juegan un papel importante en la expresión isotípica, actuando a través de diferentes linfoquinas en la activación y diferenciación de las células B. En los últimos cinco años se han conseguido avances importantes en el estudio de los mecanismos de regulación de las subclases de IgG y de la IgE. En este avance, han resultado de gran importancia los estudios realizados en ratón por el grupo de Mosmann y col. (1986). Estos autores han descrito la existencia de células T-helper (Th) con patrones diferentes de secreción: Th1 que secretan interleuquina (IL)-2 e interferón (IFN)- γ y linfoquinas y Th2 que secretan IL-4, IL-5 y probablemente IL-6. Asimismo, se sabe que la IL-4 induce la síntesis en ratón de IgE e IgG₁ y que el IFN- γ y la IL-2, la inhiben. En el caso humano, aunque la existencia de esta división de células T no está claramente demostrada, si se sabe que existen diferentes tipos de células T con diferentes modelos de producción de linfoquinas. La síntesis de IgG₄ humana (como la de IgG₁ de ratón) junto con la de IgE es inducida *in vitro* por IL-4 e inhibida por IL-2 e IFN- γ (Spiegelberg, 1990). Puesto que la IgG₄ humana parece análoga a la IgG₁ de ratón, al menos en su regulación por IL-4 y en otras propiedades como su incapacidad para activar complemento y su alta movilidad electroforética, el estudio del mecanismo de regulación de la IgG₁ podría servir como modelo para ayudar a comprender lo que está ocurriendo con la IgG₄ humana.

Finalmente, aunque las células T regulen la maduración de las células B, también pueden existir mecanismos intrínsecos específicos de las células B que aún no se conocen. En este sentido, la respuesta tardía de IgG₄ podría simplemente reflejar el cambio de clase a este isotipo que es el más distal del gen, pero también pudiera ser que se formasen células B comprometidas como respuesta al primer contacto con el Ag, pero que no se diferenciaron y maduraron hasta contactos posteriores con el Ag.

1.4. PAPEL DE LA IgG₄ EN LA PROTECCION FRENTE A INFECCIONES

Los anticuerpos IgG₄ humanos parecen jugar un papel excepcional dentro del resto de las subclases de IgG. A pesar de representar menos del 5% del contenido total de IgG, su contribución en algunos casos es muy superior a esta proporción, llegando a ser la subclase predominante. Debido a las características estructurales y biológicas que ya se han mencionado, así como las patologías que parecen estar asociadas con ella, hacen que probablemente sea la subclase humana de IgG más

importante desde el punto de vista clínico. Los niveles de los anticuerpos IgG₄, tanto totales como específicos, se encuentran alterados en diferentes tipos de enfermedades y normalmente estas alteraciones van paralelas a las de IgE. Además de las alteraciones que sufre esta Ig en la Alergia y su relación con la hipersensibilidad que más adelante se detallará, esta subclase parece estar asociada a diferentes tipos de afecciones que se caracterizan porque los niveles de IgG₄ se encuentran muy desplazados de la media.

-Altos niveles de IgG₄

Fibrosis quística caracterizada por la aparición de anticuerpos IgG₄ específicos que parecen estar asociados con un bloqueo del aclaramiento inmune normal y de los mecanismos inflamatorios (Moss, 1988).

Enfermedades pulmonares crónicas acompañadas de altos niveles en suero de IgG₄, que están asociadas a un gran número de síndromes (bronquitis crónica, micosis, *síndrome de Loffler*, etc.).

Infecciones parasitarias. La respuesta más característica que se asocia con las enfermedades parasitarias por nematodos (esquistosomiasis y filariasis) es una elevación de los niveles totales y específicos de IgE. Sin embargo, el papel de la IgE no está bien definido; parece ser que a través de la activación de las células inflamatorias y de la liberación de factores que amplifican esta respuesta provoca la destrucción de estos parásitos (Capron y col., 1982). Paralelamente, se detectan también aumentos muy acusados en los niveles de IgG₄ que probablemente estén encaminados a modificar la respuesta inmune del huésped. Aunque no se sabe el papel que pueda jugar, el patrón de reconocimiento antigénico que exhibe coincide con el de la IgE en la filariasis y se ha sugerido que podría actuar evitando las reacciones de hipersensibilidad, como lo demuestra el hecho de que en la mayoría de los pacientes que padecen estas enfermedades las respuestas alérgicas son nulas.

-Deficiencias en los niveles de IgG₄

Las deficiencias de IgG₄ pueden ser un fenómeno aislado o presentarse en combinación con deficiencias de otras subclases de IgG (Oxelius, 1979), o incluso de otros isotipos. Normalmente aparecen asociadas con otras deficiencias según el siguiente orden: IgG₂ > IgA > IgG₁ > IgE. Estas alteraciones se caracterizan normalmente por estar asociadas principalmente a enfermedades respiratorias. El principal problema que plantea el estudio de las inmunodeficiencias de IgG₄ ha sido el empleo de ensayos con la suficiente sensibilidad para valorar niveles bajos de IgG₄ y poder establecer claramente los niveles de IgG₄ que se consideran por debajo de lo normal. Heiner y col. (1983) establecieron una clasificación según la cual concentraciones entre 0.1-10 µg/ml de IgG₄ están asociadas siempre con este tipo de enfermedades y por encima de 10 µg/ml, existe un solapamiento entre individuos sanos y pacientes. Es interesante comentar que puesto que la IgG₄ no activa complemento e inhibe la formación de inmunocomplejos, su ausencia o su presencia en concentraciones

anormalmente bajas llevaría a un aumento en la formación de estos complejos por otras subclases lo que provocaría una predisposición a desarrollar procesos inflamatorios y a contraer infecciones, que es precisamente lo que ocurre en estas enfermedades asociadas con la deficiencia de IgG₄.

Todos estos datos junto con la proporción tan elevada de esta Ig en la leche materna parecen indicar que la IgG₄ ejerce una importante función como anticuerpo protector en la resistencia inmune.

1.5. PAPEL DE LA IgG₄ EN LA ALERGIA

De todas las subclases humanas de IgG, la que mayor atención ha recibido ha sido la IgG₄, precisamente por su aparente asociación con las reacciones de hipersensibilidad.

Cuando una reacción inmunitaria se produce de forma exagerada causando lesiones después de un segundo contacto con el Ag se aplica el término de hipersensibilidad, y de los 4 tipos existentes, el que más caracteriza a las enfermedades alérgicas es el tipo I o hipersensibilidad inmediata. El término de alergia se definió inicialmente como "reactividad alterada", indicando que la respuesta inmune que se produce en las reacciones alérgicas implica toda una serie de mecanismos efectores que están dirigidos contra antígenos (denominados en este caso alergenos) ambientales que intrínsecamente no son perjudiciales. Más tarde, se definió el término de atopía que indica un estado de hipersensibilidad anormal al que están predispuestos un grupo determinado de individuos. La sintomatología atópica incluye toda una serie de enfermedades como asma, rinitis, urticaria, eczema atópico, etc.

El mecanismo de acción en el que están basadas estas reacciones de hipersensibilidad (también llamadas anafilácticas) está basado en la sensibilización de mastocitos o basófilos por parte de unos anticuerpos como consecuencia de la exposición a un Ag. Tras un segundo contacto con el Ag, se desencadenan una serie de reacciones encaminadas a la liberación de mediadores que son los responsables de las manifestaciones clínicas que se producen. Este tipo de Ac capaces de sensibilizar son los denominados citotrópicos o anafilácticos, que cuando sólo son capaces de sensibilizar células de la misma especie se denominan homocitotrópicos. En el caso humano, estos anticuerpos se identificaron inicialmente con la IgE.

Las características más importantes de la IgE aparecen en la Tabla 1.2 . Se diferencia fundamentalmente de los Ac IgG en su concentración sérica, representando menos del 0.001% del contenido total de Ig y por su estructura, ya que posee un dominio de Fc extra (C_H4) y por un alto porcentaje de carbohidratos (12%). Por el contrario, se asemeja a la IgG₄ fundamentalmente porque no activa complemento.

<u>PROPIEDADES</u>	<u>IgE</u>
Peso molecular	188.000
Dominios CH	5
Carbohidratos	12%
Coefficiente sedimentación	82
Porcentaje en suero	0.001%
Activación de complemento	Negativo
Vida media	2 días

Tabla 1.2. PROPIEDADES DE LA IgE

Finalmente, como ya se ha mencionado, lo más característico es su implicación en la sensibilización de mastocitos y basófilos. Como respuesta a un Ag, en este caso alergeno, se produce una síntesis de IgE por parte de las células B previa presentación del Ag por las células presentadoras de antígeno (APC) y la cooperación de células T. Esta IgE se une a mastocitos y basófilos a través de su receptor de alta afinidad $Fc_\epsilon RI$ y cuando se produce la agregación de los receptores (puenteo de receptores o "crosslinking"), se inicia la activación celular. Como resultado de la acción de las fosfolipasas A_2 , C y D, bien por interacción directa con el receptor agregado o a través de una proteína G, se generarían inositol-fosfatos y diacilglicerol, que actúan como potentes segundos mensajeros y ácido araquidónico que por la acción de lipooxigenasas y ciclooxigenasas darían lugar a la formación de mediadores no preformados (leucotrienos y prostaglandinas). Junto con el aumento de la tasa de hidrólisis de fosfolípidos, se produce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . La formación de canales de Ca^{2+} que permiten su entrada en la célula es fundamental ya que este es necesario no solo para activar a la fosfolipasa A_2 , sino para la liberación de mediadores preformados. Todos estos cambios, que se detectan a los pocos segundos de la agregación del receptor de IgE, provocan por mecanismos no bien conocidos una agregación de microtúbulos y la liberación de los mediadores preformados, como la histamina, almacenados en gránulos de secreción (Metzger, 1991).

Aunque los anticuerpos IgE sean los principales responsables de las reacciones de hipersensibilidad I, existen datos que sugieren la implicación de otras Ig en este tipo de comportamiento. Existen una serie de sugerencias que según algunos autores, podrían apuntar hacia la IgG_4 como el segundo anticuerpo anafiláctico, que están basadas en los siguientes datos:

- La existencia de propiedades comunes con la IgE, como su regulación. La síntesis de IgE y de IgG_4 es inducida por IL-4 e inhibida por IL-2 e IFN- γ . Sin embargo, aunque aparentemente existe esta regulación paralela de ambas Ig *in vitro*, no está claro si esto se corresponde con lo que de verdad está pasando en el

organismo. De todos los aspectos asociados con su mecanismo de regulación, el más relacionado con el tema de este trabajo es precisamente las diferencias que puedan existir en los pacientes atópicos. En este sentido, sería interesante saber si el estado de atopía está asociado con alguna alteración en el efecto de la IL-4 sobre la secreción de IgG₄ e IgE. Recientemente, se han hecho estudios sobre el efecto de IL-4 e IFN- γ en la secreción de IgE e IgG₄ en pacientes alérgicos, aunque sin obtenerse ninguna conclusión. Así, Spielgelberg y col. (1991) encontraron diferencias en la secreción de IgE e IgG₄ entre individuos normales y pacientes con dermatitis atópica, de tal forma que en los controles se producía mucha más IgG₄ que IgE, mientras que en los alérgicos aunque también existía esta diferencia, esta era muy pequeña. Estos datos sin embargo, no han sido corroborados por otros autores (Nüsslein y col., 1991) que no han encontrado ningún efecto diferente en la regulación de IL-4 sobre la producción de IgE o IgG₄ en un grupo de pacientes con diversas enfermedades alérgicas.

- El comportamiento de la IgG₄ en la mediación de liberación de histamina en los estudios realizados *in vitro* (Introducción 1.5.1).

- El comportamiento sérico de la IgG₄ en las enfermedades alérgicas. Se sabe que existe un incremento selectivo de los niveles específicos y totales de esta subclase humana asociado con ciertas condiciones de hipersensibilidad (Introducción 1.5.2).

Sin embargo, el papel de la IgG₄ en la Alergia está aún por definir y existen datos que podrían sugerir que su comportamiento no sería el de un anticuerpo sensibilizante, sino que tendría una función protectora, lo que llevaría a estudiar su papel en los tratamientos de las enfermedades alérgicas. De todos los tratamientos existentes encaminados a erradicar la sintomatología alérgica los más utilizados y eficaces son los de *inmunoterapia (IT)* o *hiposensibilización*, que consisten en la administración de repetidas dosis crecientes del alérgeno. El interés por estos tratamientos surgió cuando se observó que la sangre de pacientes tratados con extractos polínicos transferida a un paciente no tratado aminoraba los síntomas. Posteriormente, se demostró que existía un factor que bloqueaba la acción de la IgE y que más tarde se identificó con el isotipo IgG. La formación de este tipo de anticuerpos es uno de los mecanismos más importantes, aunque no el único, que puede ser responsable de la mejoría clínica que experimentan los pacientes sometidos a IT. Estos Ac se denominan bloqueantes y su función consiste en unirse al antígeno formando complejos no precipitantes, evitando de esta forma que el Ag se una a la IgE ligada a los basófilos y mastocitos. Aunque aún no se han identificado de forma concluyente, existen sugerencias que podrían indicar que la IgG₄ sería responsable de este comportamiento, entre las que destacan las siguientes:

Algunas de sus propiedades biológicas, como su monovalencia y su incapacidad para formar inmocomplejos de gran tamaño y de activar el complemento, que le llevarían a ejercer una función inmune protectora.

Los títulos tan elevados de IgG₄ que poseen los apicultores asociados a una gran protección frente a las picaduras de abeja.

Y fundamentalmente, su comportamiento durante los tratamientos de IT.

1.5.1. Implicación de la IgG₄ en la liberación de mediadores

Además de la IgE, parece que hay otras Ig de clase IgG implicadas en las reacciones de hipersensibilidad, que desde la demostración de la existencia de unos anticuerpos sensibilizantes con un coeficiente de sedimentación 7S y una movilidad electroforética alta en cobayas, se han descrito en numerosas especies animales. Parish (1970) fue el primero en presentar evidencias sobre estos anticuerpos en el hombre. Mediante reacciones de ACP (anafilaxia cutánea pasiva), demostró que sueros de pacientes alérgicos a alimentos y a la toxina del tétanos eran capaces de transferir una actividad sensibilizante a la piel del mono, aunque sólo durante 1-4 horas, a diferencia de la actividad mediada por IgE que permanece varios días (por esta razón se les denominó sensibilizantes a corto plazo). Se diferencian también de la IgE porque son termoestables, es decir, su capacidad para sensibilizar tejidos no se ve afectada por el calentamiento a 56°C. En cuanto a la posibilidad de que existan receptores específicos en basófilos para estos anticuerpos de igual forma que para la IgE, Ishizaka y col.(1972) observaron que anticuerpos anti-IgG eran capaces de inducir liberación de histamina (LH) en algunos individuos atópicos y que los basófilos de algunos de estos pacientes contenían IgG en pequeñas cantidades. A partir de este momento, la mayoría de los estudios realizados han intentado determinar cuál es la subclase de IgG humana responsable de este comportamiento.

El primer dato que hizo que se pensara en que la IgG₄ podría comportarse como anticuerpo anafiláctico lo obtuvieron Stanworth y Smith (1973) mediante estudios de inhibición de ACP en monos. Estos autores observaron que al igual que podían inhibir la sensibilización cutánea mediada por IgE mediante la inyección previa de una proteína de IgE, conseguían los mismos resultados con una proteína de IgG₄. Y en estos datos se basaron para sugerir que, o bien las proteínas de IgG₄ interaccionaban con los receptores Fc de la IgE en el basófilo, o bien lo hacían con receptores específicos de IgG₄ que de alguna manera estaban interrelacionados y que la ocupación de los de IgG₄ obstruía la unión posterior de la IgE. Sin embargo, ninguna de estas dos teorías ha sido demostrada hasta ahora y además, estos resultados iniciales que parecían implicar a la IgG₄ en la anafilaxis, no pudieron ser reproducidos por otros autores como por ejemplo, Malley (1974). Esta controversia inicial fue el inicio de lo que ha ocurrido hasta ahora en los estudios que se han realizado encaminados a definir el papel de la IgG₄ en las reacciones de hipersensibilidad. Fundamentalmente, se han realizado dos tipos de experimentos:

1.- Determinar si se produce liberación de histamina (LH) después de incubar leucocitos humanos con anticuerpos anti-IgG₄.

2.- Determinar la capacidad sensibilizante de la IgG₄. Para realizar estos experimentos, los leucocitos humanos se incuban con mielomas de IgG₄ o con sueros con alto contenido en IgG₄ específica frente a un determinado alérgeno. Posteriormente se comprueba si al añadir los Ac anti-IgG₄ se produce un aumento en la LH, o si la incubación con el alérgeno conduce a la liberación de histamina. En la Tabla 1.3 se muestra un resumen de los trabajos publicados al respecto.

Referencias	Anticuerpo anti-IgG₄	Liberación histamina	Sensibilización
Vijay y Perelmutter (1977)	Policlonal (oveja)	Positiva	Positiva
Nakagawa y col. (1981, 1983)	Policlonal (oveja)	Positiva	Positiva
Van Toorenberger y Aalberse (1981, 1982)	Policlonal (conejo, oveja) (+50% D ₂ O)	Negativa	Negativa
Fagan y col. (1982)	Monoclonal (+33% D ₂ O)	Positiva	Negativa
Poulsen y col. (1988)	Policlonal/monoclonal	Negativa	Negativa
Beavais y col. (1990)	Monoclonal (Fc) (+40% D ₂ O)	Positiva/Negativa	NR

Tabla 1.3. LIBERACION DE HISTAMINA MEDIADA POR IgG₄. (NR) Experimento no realizado.

Como se puede ver en la tabla, sólo algunos investigadores han descrito la mediación de la IgG₄ en la LH mediante la incubación con Ac anti-IgG₄ policlonales (Vijay y Perelmutter, Nakagawa y col.) o monoclonales (Fagan y col.). Sin embargo, otros autores representados fundamentalmente por el grupo de Aalberse, fueron incapaces de reproducir los mismos resultados. Más controvertida es aún la aparente actividad sensibilizante de la IgG₄ ya que sólo dos grupos de investigación consiguieron que después de incubar leucocitos humanos con IgG₄ (paraproteínas o sueros con concentraciones altas de IgG₄) se produjera un aumento en la LH posterior mediada por anticuerpos anti-IgG₄ (Vijay y Perelmutter y Nakagawa y col.). Aunque en la tabla no se menciona, en ningún caso se ha podido demostrar que la IgG₄ pueda

mediar la liberación de forma directa, es decir incubando las células con un suero con IgG₄ específica frente a un alérgeno y utilizando éste como agente desencadenante (lo que ocurre *in vivo* con la IgE). Todos estos datos llevaron a muchos autores a considerar que la IgG₄ no se comportaba como un anticuerpo anafiláctico. Además de estos resultados iniciales, más recientemente, se han llevado a cabo estudios de sensibilización y LH mediada por IgG₄ (Poulsen y col., 1988 y Beauvais y col., 1990) y de nuevo los resultados obtenidos resultan conflictivos y poco aclaratorios. Existen dos aspectos que han podido contribuir a la hora de crear esta controversia. Uno de ellos, es el empleo de diferentes tipos de reactivos (algunos policlonales, otros monoclonales) con características diferentes y especificidades no siempre bien definidas. El otro factor que también hay que considerar, es la realización de los experimentos bajo condiciones no fisiológicas, utilizando agua pesada (D₂O). El D₂O es un agente que estabiliza los microtúbulos potenciando la LH (Grant y col. 1977). El empleo de este agente conduce a liberaciones de histamina espontáneas muy elevadas, lo que puede inducir a errores si no se comparan los resultados en su ausencia. De hecho, Beauvais y col. (1990) obtuvieron LH sólo en presencia de D₂O.

1.5.2. Comportamiento sérico de la IgG₄ en las enfermedades alérgicas

Como los resultados iniciales obtenidos mediante los experimentos de anafilaxis cutánea pasiva y liberación de histamina no parecían muy concluyentes, se buscaron nuevos datos que pudieran apoyar la teoría de que la IgG₄ es un anticuerpo anafiláctico. Para ello, se llevaron a cabo determinaciones de sus niveles séricos en diferentes patologías alérgicas, fundamentalmente asma, eczema, y alergia alimentaria. El fin de estos experimentos era estudiar las alteraciones que se producían en la concentración de IgG₄ y su posible relación con la sintomatología alérgica. Sin embargo, los resultados que hasta ahora se han obtenido y que se detallan en este capítulo, no son concluyentes.

Asma

El asma bronquial es una enfermedad crónica caracterizada por una hiperirritabilidad de la mucosa bronquial. Se distinguen 2 tipos: asma intrínseco, que no tiene origen alérgico y asma extrínseco o atópico, que es el más común y tiene un origen alérgico y suele ir acompañado de otras manifestaciones atópicas como rinitis y eczema, así como con un aumento de los niveles de IgE. Se caracteriza porque sólo se producen ataques como consecuencia de la exposición alérgica (polen, ácaros, epitelios de animales, etc.). Los pacientes asmáticos manifiestan 2 tipos de respuesta bronquial como consecuencia de la inhalación de alérgenos, una inmediata, típica de reacción tipo I, y una tardía varias horas después, que no siempre se produce y que parece ser la responsable de la sintomatología más grave y no esta asociada a IgE. En

cuanto a la respuesta inmunológica, de acuerdo con Gwynn y col., (1979) existen 3 tipos:

- Respuesta de IgE
- Respuesta combinada de IgE/IgG₄
- Respuesta de IgG₄

Según los estudios de Gwynn y col. (1982), la mayoría de los pacientes asmáticos sufren un incremento de los niveles de IgG₄ total, ya sean atópicos o no. Además aparecen anticuerpos IgG₄ específicos frente a numerosos alérgenos, no sólo frente a alimentos sino también frente a polen y polvo de casa (respuesta característica de IgE). Según estos autores estos Ac podrían jugar un papel clínicamente importante ya que podrían ser responsables de la respuesta asmática tardía cuando no están acompañados de anticuerpos IgE se produce una respuesta tardía tras la provocación con el alérgeno y cuando además está presente la IgE la respuesta es dual, inmediata y tardía. No obstante, en estudios realizados más recientemente, no se ha podido establecer ninguna correlación entre presencia de Ac IgG₄ específicos y severidad de la enfermedad, lo que sugeriría que estos anticuerpos estarían indicando exclusivamente una mera exposición al alérgeno (Homburger y col.,1988).

Dermatitis atópica y alergia alimentaria

La implicación de la IgG₄ en estas dos situaciones clínicas parece estar estrechamente relacionada. La dermatitis atópica suele estar asociada con asma y rinitis y se caracteriza por desarrollarse una elevación muy acusada de los niveles de IgE, lo que en principio parece indicar que se trata de una forma de hipersensibilidad alérgica. Sin embargo, a diferencia de las patologías respiratorias claramente mediadas por IgE, el eczema es una respuesta tardía y el papel patológico de la IgE no parece claro. Esta enfermedad se caracteriza además porque está asociada con niveles extremadamente altos de IgG₄. Este alto contenido en IgG₄ total también va acompañado de la aparición de anticuerpos específicos frente a alérgenos inhalantes y sobre todo alimentarios (Shakib y col., 1984), cuya relevancia clínica está sin determinar.

Existen algunos datos que sugieren la mediación de los anticuerpos IgG₄ en la hipersensibilidad generada por los alimentos que se caracteriza por ser de dos tipos: una inmediata, que va asociada con urticaria, asma y anafilaxis y es dependiente de IgE y otra tardía, que se manifiesta con asma y sobre todo eczema y no parece depender de IgE. Sin embargo, a la hora de considerar el papel que pueda jugar la IgG₄, los datos son contradictorios y hay que distinguir las respuestas que se producen en niños y en adultos. Para algunos autores (Shakib, 1988), la aparición de estos anticuerpos en niños no tienen ninguna relevancia ya que también están presentes en individuos sanos. Según esta teoría, formarían parte de la respuesta inmune general frente a los alimentos, de tal forma que aparecerían como consecuencia de una exposición diaria a los Ag e irían disminuyendo con la edad salvo en aquellos casos

en los que existe una permeabilidad intestinal anormal, donde como es lógico se produce una estimulación antigénica crónica. En adultos, de nuevo, no es fácil establecer la correlación entre alérgeno alimentario, IgG_4 y sintomatología, porque aunque es en los pacientes atópicos donde los niveles de IgG_4 son significativamente más elevados (Morgan y col., 1990), en la mayoría de los individuos sanos es posible detectar su presencia.

Todos estos resultados indican por tanto, que aún no está determinado si las alteraciones séricas que experimentan la IgG_4 son responsables de la sintomatología alérgica. En esta falta de acuerdo influyen la dificultad para establecer valores de referencia normales, debido al tipo de distribución de la IgG_4 , así como la variabilidad en los ensayos empleados.

1.5.3. Comportamiento de la IgG_4 en los tratamientos de Inmunoterapia

Se ha sugerido que la IgG_4 podría participar en las reacciones de hipersensibilidad con un papel diferente al anafiláctico. Por un lado, no todos los investigadores han podido demostrar su mediación en los procesos de LH. Por otro, como se ha mencionado anteriormente, no existe una clara correlación entre la aparición de estos anticuerpos y la sintomatología alérgica y si existe correlación, es con la aparición de reacciones tardías, diferenciándose así del comportamiento de la IgE . Finalmente, existe cierta evidencia experimental sobre el papel protector de la IgG_4 en ciertas condiciones en las que se produce una estimulación antigénica prolongada (tratamientos de IT, apicultores, etc.). Estos hechos llevaron a Aalberse y col.(1983a) a sugerir que la producción de esta subclase reflejaba una estimulación crónica, natural o no, pudiendo tener un papel fisiológico como anticuerpo bloqueante.

Aunque no está claro ni su mecanismo de acción ni su eficacia, la mejoría clínica asociada a los tratamientos de IT (administración de dosis repetidas de alérgeno) se ha atribuido a una serie de mecanismos inmunológicos entre los que se incluyen la supresión de la síntesis de IgE y la producción de Ac IgG específicos del alérgeno que son los denominados bloqueantes, que se caracterizan por ser termostables, por competir por el Ag con los anticuerpos anafilácticos (para lo cual han de estar dirigidos frente a las mismas moléculas que la IgE) y por no formar complejos precipitantes (Van der Zee, 1986a).

Durante la IT se produce una respuesta restringida de IgG_1 e IgG_4 , aunque a lo largo del tratamiento se produce un cambio gradual de tal forma que la producción predominante es de IgG_4 . Aunque algunos autores sugieren que ambas Ig actuarían como bloqueantes (Djurup y col., 1985), todas las evidencias parecen apuntar a la IgG_4 como la responsable de este comportamiento, implicando a la IgG_1 en la supresión de la síntesis de IgE . El problema fundamental surge a la hora de

correlacionar la eficacia y mejoría del tratamiento con los hechos inmunológicos ocurridos. En este sentido, no está claro el valor predictivo ni de la disminución de los niveles de IgE, ni de la presencia de IgG₄. Sólo en las alergias a venenos esta correlación es clara, mientras que en las alergias a alérgenos inhalantes los resultados son contradictorios.

La evidencia más clara de que los Ac IgG bloqueantes ejercen un papel protector proviene de los resultados obtenidos en los tratamientos de hiposensibilización con veneno de abeja, donde su producción está correlacionada con la protección clínica. Además, Lessof y col. (1977) demostraron que la administración pasiva mediante inyecciones de gammaglobulina de apicultores a pacientes alérgicos estos adquirirían protección frente a nuevas picaduras. Como consecuencia de los tratamientos de IT con venenos, se producen Ac IgG₁ e IgG₄, aunque más del 70% de los anticuerpos específicos del componente mayoritario del veneno, PLA₂, son de clase IgG₄ (Heiner, 1980, Aalberse y col., 1983a, Urbanek y col., 1986), manteniéndose niveles altos de esta subclase, así como la protección clínica incluso 2 años después de finalizar el tratamiento. Sin embargo, la contribución de la IgG₁ parece ser cuantitativamente más importante en las fases iniciales del tratamiento. Estos datos se corroboran por el comportamiento de ambas Ig en suero de apicultores, que están expuestos de forma natural a mayor cantidad de veneno que los pacientes con IT. En estos individuos los niveles de IgG₄ específica son muy elevados y se correlacionan con el número de picaduras que hayan recibido, mientras que la IgG₁ sólo es predominante en apicultores principiantes.

De todos los tratamientos de hiposensibilización con alérgenos inhalantes, quizás los más estudiados son los realizados frente a pólenes de gramíneas. Al igual que con los venenos, la respuesta predominante es de IgG₄ y esto inicialmente llevó a algunos autores (Devey y col., 1976; Van der Giessen y col., 1976) a sugerir que también ejercía un papel protector. Sin embargo, existen algunas evidencias obtenidas por algunos autores que indican que la determinación de los niveles de IgG₄ específica no sirve como valor predictivo de la mejoría clínica del paciente. En este sentido, Djurup y Malling (1987) realizaron 3 estudios diferentes con distintos tipos de pólenes y encontraron que en el 50% de los pacientes no se producía mejoría, aún teniendo niveles altos de IgG₄. En la misma línea, ya el grupo de Aalberse (1983b) había obtenido resultados similares, observando además, que la presencia de niveles altos de IgG₄ específica al principio del tratamiento conduciría a una falta de éxito al final de la IT, porque indicarían que este tipo de pacientes serían más sensibles al alérgeno.

En cuanto a la producción de IgG₁ e IgG₄ en IT con otro tipo de alérgenos como *Dermatophagoides* (Nakagawa, 1991), hongos (Malling y Djurup, 1988) o epitelios de animales (Cuesta, 1989), los resultados obtenidos hasta ahora, siguen la misma trayectoria anteriormente expuesta.

El hecho de que la mayoría de los datos experimentales existentes sean contradictorios, debido en gran medida a la diversidad existente en la metodología empleada en cada caso (extractos, ensayos, tipos de tratamientos, etc.), hace que sólo se haya definido el papel fisiológico de la IgG₄ de forma cuantitativa y en relación con otras subclases, como inmunoglobulina predominante durante la IT.

1.6 OBJETIVOS

Los datos que hasta ahora se han comentado en la Introducción reflejan la existencia de una gran controversia sobre la función que cumple la IgG₄ en las reacciones alérgicas. El objetivo de este trabajo precisamente, ha sido obtener más información que permita clarificar el papel de esta Ig humana, tanto como anticuerpo bloqueante como anafiláctico. Para ello, es necesario disponer de reactivos y métodos que permitan determinar la relevancia de esta subclase. En este sentido, aunque hay varios anticuerpos monoclonales (AcM) anti-IgG₄ descritos (Jefferis y col., 1985), la mayoría presenta problemas en su utilización y se caracterizan por ser específicos de un número muy restringido de epítomos en la molécula de IgG₄. Por otro lado, la falta de resultados reproducibles en las determinaciones de IgG₄, parece indicar la necesidad de disponer de métodos de cuantificación de IgG₄ de gran sensibilidad y precisión. A este respecto, hay que considerar también la dificultad planteada a la hora de comparar diferentes valoraciones de IgG₄ específica frente a alérgenos. Esto es así, debido a que existen muy pocos métodos que permitan cuantificar el contenido de IgG₄ específica, al igual que el de IgG₄ total, de forma objetiva, mediante el empleo de preparaciones de referencia (Adkinson, 1988). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se decidió comenzar el trabajo preparando nuestros propios reactivos y ensayos de valoración.

En este trabajo, se han perseguido los siguientes objetivos:

1.- Obtención de AcM que fueran específicos de IgG₄, intentando aumentar la respuesta dirigida frente a epítomos debilmente inmunogénicos. Para ello, se llevó a cabo una estrategia de tolerización frente a los epítomos comunes de las cuatro subclases de IgG antes del proceso de inmunización.

2.- Desarrollo de métodos de valoración de IgG₄.

- Puesta a punto de un ELISA de gran sensibilidad y con un amplio rango de trabajo para cuantificar IgG₄ total.

- Puesta a punto de un ELISA de gran sensibilidad para valorar IgG₄ específica que además, fuera cuantitativo.

3.- Cuantificación de los niveles de IgG₄ total y específica en diferentes patologías alérgicas, centrándose sobre todo en el comportamiento sérico de esta Ig durante los

tratamientos de inmunoterapia. El objetivo principal en este caso, fue el estudio de la IgG₄ como anticuerpo bloqueante. Para ello se analizaron los siguientes puntos:

- Niveles de IgG₄ total
- Niveles de IgG₄ específica
- Correlación entre IgG₄ total y específica
- Determinantes antigénicos frente a los cuales está dirigida la respuesta de IgG₄ en la inmunoterapia.

4.- Estudios sobre la posible implicación de la IgG₄ en la liberación de mediadores anafilácticos: histamina, leucotrienos, etc. Para ello, se llevaron a cabo experimentos en los que se determinó la liberación de mediadores después de incubar los leucocitos humanos con los diferentes AcM anti-IgG₄ obtenidos en este trabajo. Estos resultados se compararon además, con los obtenidos con AcM anti-IgE. El objetivo de este estudio fue determinar el posible carácter anafiláctico de esta inmunoglobulina.

2. MATERIALES

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Los ratones Balb/c utilizados para la obtención y producción de los anticuerpos monoclonales fueron suministrados por Iffa-Credo (Lyon, Francia).

2.2. SUEROS Y MUESTRAS DE SANGRE HUMANA

Para la determinación de IgG₄ total, utilizamos un suero previamente calibrado en su contenido de IgG₄ frente a la referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 67/69, amablemente cedido por A. Jiménez (Hospital La Paz, Madrid, España). Como suero de referencia para el ensayo de IgG₄ específica, utilizamos una mezcla de sueros de pacientes sometidos a un tratamiento de IT con *Phleum pratense*, suministrados por el Dr. Fernández de Corres (Hospital Santiago Apóstol, Vitoria, España). El grupo de sueros de donantes no atópicos utilizados como controles en diversos estudios de este trabajo fueron suministrados por el Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España). La procedencia del resto de los sueros de pacientes atópicos se indica en cada caso. Las muestras de sangre empleadas en los experimentos de liberación de histamina fueron donadas voluntariamente por trabajadores de Alergia e Inmunología Abelló, S.A.

2.3. EXTRACTOS ALERGENICOS

Todos los extractos alérgicos empleados proceden de Alergia e Inmunología Abelló, S.A.

2.4. INMUNOGLOBULINAS Y ANTICUERPOS

Las 17 paraproteínas humanas que representan a las diferentes subclases de IgG fueron suministradas por el Dr. F. Skvaril (WHO/IUIS, Ig Subcomite) (Tabla 4.2). La IgG₄ humana P-L fue amablemente cedida por el Dr. P. Lerch (Red Cross, Ginebra, Suiza). La IgA humana policlonal procede de Sigma (St. Louis, EEUU), la IgM humana policlonal de Miles Laboratories (Naperville, EEUU) y la IgE humana monoclonal de Serotec (Oxford, Gran Bretaña). Las cadenas ligeras humanas purificadas fueron cedidas generosamente por el Dr. Conde (Hospital Ramón y Cajal). Los antisueros de oveja específicos de las 4 subclases de IgG humana se obtuvieron de Miles Laboratories. Los antisueros de ratón utilizados para la determinación del isotipo de los AcM se compraron a Nordic Immunologic Labs (Tilburg, Holanda). Los anticuerpos de cabra anti-ratón (GAM) fueron obtenidos en

nuestro laboratorio. Se prepararon por cromatografía de afinidad a partir de una mezcla de sueros procedentes de 2 cabras previamente inmunizadas con IgG de ratón. Los AcM anti-IgE así como el AcM anti-IgG₁ utilizados en los ensayos de liberación de histamina y de inmunoterapia fueron obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Sánchez-Madrid y col., 1984; Moscoso del Prado y col., 1991; Morago y col., 1985). El anticuerpo monoclonal anti-IgG₄, SK-44, procede de ICN Immunologicals (Lisle, EEUU).

2.5. LINEAS CELULARES

Los hibridomas secretores de anticuerpos específicos de cadenas ligeras humanas, HG3/6.1 y HG8/2.1, fueron preparados en nuestro laboratorio (Morago y col., 1985). En la preparación de hibridomas se empleó el mieloma de ratón X63-Ag8.653 y al igual que el mieloma de ratón P3-X63Ag8, secretor de inmunoglobulina γ 1, κ de especificidad desconocida, fueron cedidos generosamente por el Dr. T. Springer (Harvard Medical School, Boston, EEUU).

2.6. PRODUCTOS QUIMICOS Y ENZIMATICOS

-Acrilamida	Bio-Rad (Richmond, EEUU)
-Agarosa (Tipo V)	Sigma (St. Louis, EEUU)
-Aminopterina	“
-6-biotinamido hexanoato de sulfosuccinimidilo (NHS-LC-biotina)	Pierce Company (EEUU)
-5(6)-carboxifluoresceín-N-hidroxisuccinimidilo (FLUOS)	Boehringer Mannheim(Alemania)
-Cisteína	Sigma
-1,4-diazobicyclo(2,2,2)octano	Fluka (Suiza)
-Estreptavidina-Peroxidasa (conjugado)	Amersham (Gran Bretaña)
-o-fenilendiamina (OPD)	Dakopatts (Dinamarca)
- β -galactosidasa	Boehringer Mannheim
-Heparina	Labor. Leo (España)
-Iodoacetamida	Sigma
-Maleimido hexanoato de N-hidroxisuccinimidilo (MHS)	Boehringer Mannheim
-NN' metilenbisacrilamida	Bio-Rad

-Octanoico	Sigma
-Papaína	Sigma
-Seroalbúmina (SAB)	Boehringer Manheim
-(2,6,10,14) tetrametilpentadecano (pristane)	Sigma
-Tween 20	Sigma

El resto de los productos utilizados y cuya referencia no se indica en el texto fueron de Merck (Darmstadt, Alemania).

2.7. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los diferentes medios de cultivo celular utilizados en este trabajo se detalla a continuación:

Medio RPMI. Por cada 500 ml de medio se emplearon:

RPMI 1640 (Flow, Irvine, Gran Bretaña)	5.2 g
Co ₃ HNa (Merck)	1 g
Glutamina 200 mM (Gibco, Paisley, Gran Bretaña)	10 ml
Penicilina/Estreptamicina (Gibco)	5 ml
Agua purificada (Equipo Alpha-Q, Millipore, Bedford, EEUU)	hasta 500 ml

Para el crecimiento habitual de células se empleó medio RPMI conteniendo del 5 al 20% de suero de ternera fetal, STF, (Biochrom KG, Berlín Alemania). Durante el proceso de fusión celular el medio RPMI se utilizó sin suplemento de STF.

La esterilización de todos los medios de cultivo se llevó a cabo mediante filtración a través de una membrana estéril Millipak 20 con un poro de 0.22 µm (Millipore). Una vez esterilizados, los medios se almacenaron a 4°C. El STF se filtró también por una membrana de 0.22 µm (Millipak 40, Millipore) y se almacenó a -30°C.

Medio selectivo HAT. Para su preparación, 500 ml de RPMI-STF(20%) se suplementaron con:

HT (100x)	5 ml
Aminopterina (1000x)	0.5 ml

Estas soluciones se prepararon como se detalla a continuación:

HT (100x)- Se resuspendieron 136 mg de hipoxantina y 38.8 mg de Timidina

(Merck) en 100 ml de agua destilada, y la mezcla se disolvió a 70°C. Se esterilizó por filtración y guardó a -30°C.

Aminopterina (1000x)- Se disolvieron 3.5 mg de aminopterina (Sigma) en 1 ml de NaOH 0.1 N y posteriormente se añadieron 19 ml de agua destilada. Una vez esterilizada por filtración se guardó en oscuridad a -30°C.

La filtración de estas soluciones se llevó a cabo mediante membranas estériles de 0.22 µm Minisart (Sartorius, Gottingen, Alemania).

Medio HT. Tiene la misma composición que el medio HAT, pero no contiene aminopterina.

Solución de Polietilenglicol (PEG) al 50% (p/v). 5 g de PEG 4000 (Merck) se esterilizaron en autoclave y seguidamente, se añadieron 5 ml de medio RPMI de forma gradual y agitando. La solución preparada se almacenó protegida de la luz a 4°C.

2.8. MATERIAL DE CULTIVO

Durante las primeras etapas de crecimiento, los hibridomas se cultivaron en placas estériles de plástico de 96 y 24 pocillos (Costar, Cambridge, EEUU). Posteriormente, para los cultivos a mayor escala se utilizaron frascos estériles de 25, 80 y 175 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los criotubos estériles para la conservación de las líneas celulares congeladas también fueron suministrados por Nunc, de igual modo que los tubos empleados en las centrifugaciones y lavados celulares. Como incubador de CO₂ se empleó el modelo 3029 Forma Scientific (Ohio, EEUU), ajustado a 37°C, 5% (v/v)CO₂ y 100% de humedad relativa. Las cabinas de flujo laminar vertical fueron de Telstar (Terrasa, España).

2.9. MATERIAL DE INMUNOENSAYOS

Algunos radioinmunoensayos (RIA) fueron realizados en placas de plástico flexible de cloruro de polivinilo (PVC) de 96 pocillos (Mic 2000 Dynatech, Cambridge, EEUU). Pero la mayoría de los ensayos se llevaron a cabo en pocillos de poliestireno Immunolon II (Dynatech) y en placas de 96 pocillos de poliestireno (Costar).

2.10. MATERIAL DE CROMATOGRAFÍA

La proteína A-Sepharose CL4B y el Sephadex G-25 empaquetado en columnas PD-10 (Vol. 9.1 ml) fueron adquiridos a Pharmacia (Uppsala, Suecia). El Ultrogel ACA-34 procede de IBF (Francia).

2.11. PRODUCTOS RADIATIVOS

En todos los marcajes radiactivos realizados en el presente trabajo se utilizó el isótopo I^{125} suministrado por Medgenix Diagnostics (Fleurs, Belgica).

2.12. MATERIAL FOTOGRÁFICO

Las películas de Rayos X para autoradiografía, AX, proceden de Konica Corporation (Tokio, Japón). Las cajas negras y las pantallas amplificadoras SMIT U2, fueron adquiridas en Radiología SL (Madrid, España). Tanto la solución fijadora FX-40 como la reveladora D-19 se compraron a Kodak-Eastman (Richmond, N.Y. EEUU). El carrete de fotos utilizado para el microscopio de fluorescencia fue Kodak 5054 TMZ.

3. METODOS

3.1. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y TECNICAS DE CULTIVO CELULAR

3.1.1. Inmunización

Se realizaron dos experimentos de fusión celular utilizando ratones inmunizados con dos protocolos diferentes.

Inmunización I.- Se inyectaron ratones hembras Balb/c de 40 días intraperitonealmente (i.p.) utilizando agujas de calibre 23G (Terumo, Bélgica) con 50 µg de una mezcla de 3 paraproteínas Ste, Fo y Bru de isotipo G₄ (IgG₄mix), emulsionadas con adyuvante completo de Freund (AFC). A las 2 y 8 semanas, se repitió el proceso con adyuvante incompleto. Por último, 4 días antes de la fusión celular, se inyectó la misma cantidad de IgG₄mix en tampón fosfato salino (PBS), por vía intravenosa (i.v.), utilizando agujas de calibre 25G (Tabla 3.1).

TIEMPO	DOSIS
0	50 µg IgG ₄ mix (AFC) i.p.
2 semanas	50 µg IgG ₄ mix (AFI) i.p.
8 semanas	50 µg IgG ₄ mix (AFI) i.p.
16 semanas	50 µg IgG ₄ mix (PBS) i.v.

Tabla 3.1. Protocolo de inmunización (Fusión I).

Inmunización II.- En este caso, se llevó a cabo, previamente a la inmunización con IgG₄, un tratamiento de tolerización frente a las otras 3 subclases de IgG. Para inducir el estado de tolerancia, ratones Balb/c recién nacidos fueron inyectados i.p. (agujas de calibre 25G) con 20 µg de una mezcla de paraproteínas humanas de isotipo G₁, G₂ y G₃ (IgGmix) en PBS como se indica en la Tabla 3.2. A las 7 semanas de edad, se comenzó el proceso de inmunización, en el que sólo se dieron 2 inyecciones i.p. y 1 i.v., administrándose en cada caso 60 µg de una IgG₄ diferente (Tabla 3.2).

En ambos tratamientos, los ratones fueron sangrados 10 días después de la segunda inyección i.p. para obtener el título de anticuerpos anti-IgG₄ y anti otras subclases en el correspondiente suero.

EDAD	DOSIS	TRATAMIENTO
2 días	20 µg IgG mix (PBS) i.p.	Tolerancia
5 días	20 µg IgG mix (PBS) i.p.	
13 días	20 µg IgG mix (PBS) i.p.	
7 semanas	60 µg IgG ₄ Ste (AFC) i.p.	Inmunización
9 semanas	60 µg IgG ₄ Fo (AFI) i.p.	
12 semanas	60 µg IgG ₄ Bru (PBS) i.v.	

Tabla 3.2. Protocolo de tolerancia e inmunización (Fusión II).

3.1.2 Fusión celular

El procedimiento seguido para la hibridación celular fue el descrito por Kohler y Milstein (1975) con las posteriores modificaciones introducidas para mejorar el proceso de obtención de anticuerpos monoclonales (Galfré y Milstein, 1981 y Springer y col. 1982).

El ratón seleccionado se sacrificó 4 días después de la inyección i.v. Antes de la extirpación del bazo se extrajeron, como fuente de macrófagos, las células peritoneales mediante lavado del peritoneo con 10 ml de PBS; después de centrifugar a 300 g durante 5 min en una centrífuga de mesa (Selecta, Martorell, España) el sedimento celular se lavó por centrifugación con medio RPMI. El sedimento final se resuspendió en 2 ml del mismo medio y se mantuvo a 4°C hasta su uso. Estas células se utilizaron para favorecer el crecimiento de los hibridomas. Seguidamente, se extrajo el bazo y se transfirió a una placa Petri estéril (5 cm de diámetro, NUNC) que contenía 1 ml de RPMI, para proceder a la obtención de las células por frotamiento mecánico. La suspensión de estas células se lavó 2 veces en las mismas condiciones antes descritas y se resuspendieron en 5 ml de medio.

Paralelamente, se recogieron las células del mieloma de ratón a partir de cultivos *in vitro* en fase exponencial ($0.2-0.5 \times 10^6$ células/ml), se lavaron 2 veces y se resuspendieron en 5-10 ml de RPMI (concentración final, $5-10 \times 10^6$ células/ml).

Una vez realizado el conteo de ambos tipos celulares, mediante un hemocitómetro NEUBAUER (Hawksley, Gran Bretaña) en un microscopio de contraste de fases OLYMPUS MI (Olympus, Japón) y después de comprobar que el porcentaje de células viables en la suspensión de mielomas era superior al 90%, se mezclaron todas las células de bazo y las de mieloma necesarias en una proporción 4:1 y dicha mezcla se centrifugó a 300 g 5 min aspirándose el sobrenadante. A continuación, se realizó el proceso de hibridación celular a 37°C mediante la adición de

1 ml de PEG lentamente y con agitación durante 1 min. Posteriormente, se diluyó el PEG añadiendo 5 ml de RPMI de forma gradual durante 3 min y a continuación, 12 ml más durante 1 min. Finalmente y después de 3 min de reposo, se centrifugó y el sedimento celular se resuspendió en medio selectivo HAT que contenía las células peritoneales. La suspensión celular final se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillo (0.2 ml por pocillo) de forma que cada uno contuviese unas 150.000 células de bazo y 5000 peritoneales. Desde ese momento, las placas se mantuvieron en el incubador de CO₂.

Después de la fusión, se empleó como medio de cultivo, medio HAT, ya que la línea de mieloma de ratón utilizada era deficiente en el enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa necesaria para la síntesis de purinas por la vía de rescate. Al contener el medio aminopterina, que inhibe la síntesis de novo de purinas, las células de mieloma al igual que los esplenocitos no fusionados, dejan de ser viables y sólo los híbridos células de bazo-mieloma pueden crecer en cultivo. Esto es así porque estos híbridos pueden sintetizar purinas mediante la vía de rescate utilizando hipoxantina y timidina como precursores.

Como control de la efectividad del medio HAT, así como de la ausencia de revertientes, las células de mieloma no utilizadas para fusionar, se mantuvieron en medio HAT, comprobándose que no eran viables.

A los 6 días después de la fusión se cambió el medio de cultivo (todavía HAT) y a los 8, se eliminó la aminopterina añadiendo cada 2 días medio HT.

3.1.3. Clonaje celular

A los 10 (Fusión I) y 8 (Fusión II) días después de la hibridación, cuando los clones alcanzaron aproximadamente 1 mm de diámetro se llevaron a cabo los ensayos de selección (Métodos 3.2). Los híbridos elegidos se clonaron por la técnica de dilución límite (Campell, 1984).

Las células seleccionadas se diluyeron con medio RPMI con STF al 20% a una concentración final de 300, 30, 3 y 0.3 células por ml y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Una vez crecidos los clones, se eligió la placa con un porcentaje de pocillos con crecimiento menor del 50% y se realizó un ensayo para detectar los clones que seguían secretando anticuerpos anti-IgG₄. De estos, se escogieron 2 y se subclonaron siguiendo el protocolo descrito.

3.1.4 Congelación y descongelación de líneas celulares

Aproximadamente entre 0.5 y 2 millones de células se resuspendieron en 0.5 ml de STF y se añadieron, lentamente y en baño de hielo, 0.5 ml de dimetil

sulfóxido (DMSO) al 20% (v/v) en STF por cada vial de congelación. Posteriormente los viales se almacenaron a -80°C y a las 24 h se transfirieron a un depósito de nitrógeno líquido (Locator 8, Thermolyne, Quimigranel).

Los viales con las células congeladas se descongelaron rápidamente en un baño de 37°C , transfiriéndose a un tubo que contenía 1 ml de RPMI-STF al 20%. Después de añadir 9 ml más de medio en frío para diluir el DMSO, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml del mismo medio distribuyéndose en placas de 24 pocillos.

3.2 ENSAYOS DE SELECCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se llevaron a cabo ensayos tipo ELISA o RIA en fase sólida con las siguientes condiciones generales:

- El volumen de ensayo fue de 50 μl por pocillo.
- Las diferentes proteínas utilizadas en la fase sólida se adsorbieron a 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS durante 1 h a 37°C .
- El proceso de saturación se llevó a cabo con seroalbúmina (SAB) al 1% y Tween-20 al 0.05% en PBS (PBS-SAB-T) durante 20 min.
- El resto de las incubaciones (sobrenadantes, sueros etc.) se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con Tween-20 al 0.05% en PBS (PBS-T).
- Las incubaciones con el segundo anticuerpo de cabra anti-ratón (GAM) marcado con I^{125} (RIA) se realizaron añadiendo 100.000 cpm/pocillo y después de lavar se determinó la radiactividad incorporada en un contador gamma Packard Multiprias 1 (Packard Instruments, Downers Grove, EEUU).
- Cuando se empleó el GAM conjugado con peroxidasa (ELISA), este se utilizó diluido 1:3500 y después de incubar durante 1 h, se añadió el sustrato enzimático (0.03% H_2O_2 y 0.66 mg/ml de OPD en tampón citrato-fosfato 50 mM, pH6.0). A los 30 min, se detuvo la reacción adicionando 50 μl de H_2SO_4 y se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm en un lector de placas de 96 pocillos KUCO 21(SCINICS, Tokio, Japón) utilizando como valor de referencia, la densidad óptica (DO) a 630 nm.
- Como controles positivos de los ensayos se utilizó el sobrenadante de cultivo de la mezcla de hibridomas anti-cadenas ligeras (HG3/6.1 y HG8/2.1) y el líquido ascítico diluido 1:10.000 del AcM comercial anti-IgG₄ SK-44. Como controles negativos, empleamos sobrenadante de cultivo de la línea P3-X63Ag8 y PBS-SAB-T.

3.2.1. Determinación del título del suero de los ratones inmunizados

Previamente a las 2 fusiones se determinó el título (definido como la dilución del suero a la que se obtiene la mitad de la señal máxima) de anticuerpos anti-IgG₄ y otras subclases de IgG en el suero de los ratones inmunizados. Para ello, se adsorbió a placas de PVC IgG₄mix e IgGmix. Después se añadieron 50 µl de diluciones seriadas (factor 10, 7 puntos) del suero de los ratones y posteriormente, se incubó con el GAM marcado radiactivamente como se indica en las condiciones generales.

3.2.2. Selección de híbridos secretores de anticuerpos monoclonales

Fusión I- El proceso de selección se hizo mediante un RIA en fase sólida en placas de PVC. En un primer paso, los sobrenadantes de los hibridomas se ensayaron frente a una IgG₄ diferente de las empleadas en la inmunización, IgG₄ P-L. Con los clones cuya señal fue al menos 3 veces superior al control negativo, se llevó a cabo una 2^o selección encaminada a identificar los hibridomas secretores de anticuerpos específicos de IgG₄. Para ello, los sobrenadantes de cultivo se ensayaron frente a IgG₄mix por un lado, y frente a IgGmix por otro, y sólo aquellos que reconocieron a la mezcla de IgG₄ y no a la de las otras subclases fueron seleccionados para su posterior clonaje y subclonaje.

Fusión II- En este caso se siguieron las mismas indicaciones antes expuestas, pero utilizando un ELISA en placas de poliestireno (Costar).

3.3. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA PURIFICACION

Para purificar los AcM se obtuvieron previamente cantidades del orden del mg, bien a partir del sobrenadante de cultivos (cultivo *in vitro*), o bien a partir de líquido ascítico de ratón (cultivo *in vivo*).

Cultivo *in vitro*: Una vez descongelada la línea productora del anticuerpo que se pretende obtener, esta se creció en frascos de 175 cm empleando medio RPMI con STF al 5% y una vez alcanzada la fase de saturación se recogió el sobrenadante mediante centrifugación, con una concentración aproximada de 5-20 µg/ml.

Cultivo *in vivo*: El procedimiento seguido fue básicamente el de Stanker y col.,1985. Los ratones Balb/c se inyectaron i.p. con 0.5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano. Diez días después, se inyectaron de nuevo i.p., 2 x 10⁶ células en 0.5 ml de PBS por ratón. A los 12 días después, cuando se observó la aparición del

tumor se procedió a la extracción del líquido ascítico mediante agujas de calibre 18G, repitiendo el proceso cada 2 días. Después de incubar el líquido ascítico 30 min a temperatura ambiente y 2 h a 4°C, se centrifugó a 800 g (Centrífuga Sorvall RC5B, DuPont Instruments, Newton, EEUU) durante 30 min para eliminar fundamentalmente hematíes, voloviéndose a centrifugar a 20.000 g a 4°C para eliminar la fase lipídica.

Tanto el sobrenadante como el líquido ascítico se almacenó a -30°C hasta su uso.

3.4. PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La purificación de los AcM se llevó a cabo utilizando diversas técnicas en función de las características del anticuerpo (clase, subclase, etc.) y de la procedencia del material (sobrenadante de cultivo o líquido ascítico). La mayoría de los anticuerpos (G4.1, G4T.9, G4T.11 y G4T.12) se purificaron de líquido ascítico por el método de la precipitación con ácido octanoico (Reik y col., 1987). Sin embargo, el anticuerpo G4T.2 tuvo que purificarse por cromatografía de afinidad en columna de proteína A-Sepharose (Ey y col., 1978). Cuando la purificación se realizó a partir de sobrenadante de cultivo, se llevó a cabo siempre por cromatografía en columna de proteína A-Sepharose tras una previa concentración del anticuerpos mediante una precipitación con sulfato amónico. Esta se realizó adicionando lentamente y en agitación a 4°C sulfato amónico hasta una concentración final del 50% de saturación (31,3 g/100 ml de medio), centrifugando posteriormente la mezcla a 10.000 g durante 10 min y el sedimento resultante se resuspendió en tampón Tris ClH 0.1 M pH 8.6.

3.4.1. Purificación por proteína A-Sepharose

Tanto el líquido ascítico como el sobrenadante de cultivo concentrado por la precipitación con sulfato amónico, se diluyeron 1/2 y se dializaron frente al tampón Tris-ClH 0.1M, ClNa 2M, pH8.6, filtrándose por 0.8 µm. Seguidamente, la suspensión dializada se pasó a través de una columna de 5 ml de Proteína A-Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris-ClH 0.1M, ClNa 2M, pH8.6. Una vez que todo el volumen de la muestra hubo pasado, la columna se lavó con 3-4 volúmenes del mismo tampón. La elución de los anticuerpos fijados se realizó con Dietilamina 50 mM, recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 300 µl de Tris 1M pH 6.8. La presencia de proteínas en las fracciones eluidas se detectó por absorbancia a 280 nm, mezclándose aquellas correspondientes al pico de proteína y dializándose frente a PBS a 4°C.

3.4.2. Purificación por precipitación con ácido octanoico

Este método consiste en una doble precipitación sucesiva con ácido octanoico y sulfato amónico. Por cada volumen de líquido ascítico se añadieron 2 de tampón acetato 60 mM pH 4, ajustando el pH a 4.8 con NaOH 1M. Seguidamente, se llevó a cabo la 1ª precipitación adicionando lentamente y con agitación 33 µl de octanoico por cada ml de líquido ascítico original, incubándose durante 30 min. Después de la centrifugación se separó el sobrenadante y se dializó frente a PBS conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.2 mM. La muestra dializada se precipitó a continuación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50% (p/v). El sedimento obtenido, después de centrifugarse, se resuspendió en 2-3 ml de PBS y se dializó también frente a PBS a 4°C y se guardó congelado a -30°C.

3.4.3. Control de la purificación

En todos los caso, la pureza de los anticuerpos se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Métodos 3.6.). La actividad se determinó mediante un ELISA en fase sólida en el que los AcM se ensayaron a diferentes concentraciones (100 µg/ml-1 ng/ml), siguiendo el procedimiento descrito en Métodos 3.2.

3.5. METODOS PARA LA CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

3.5.1. Determinación del isotipo

Uno de los primeros pasos en la caracterización de los AcM es la determinación del isotipo. Esta determinación se realizó mediante la técnica de doble inmunodifusión radial, siguiendo el método descrito por Ouchterlony (1948).

El procedimiento se llevó a cabo en una placa de vidrio sobre la que se solidificó una solución de agarosa al 1 % en tampón veronal 24 mM, tris 73 mM, lactato cálcico 0.3 mM a pH 8.6. Una vez formado el gel se perforaron pocillos de 3 mm de diámetro, según una simetría hexagonal con una separación de 1cm y se aplicaron las muestras. Cada antisuero específico se aplicó en el pocillo central (volumen de 10 µl) y los sobrenadantes, en los pocillos de alrededor (volumen 10 µl). Las muestras se dejaron difundir durante 48 h en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Por último, el gel se lavó con ClNa 0.1M y se presionó colocando 5 hojas de papel de filtro Whatman nº1 y un peso de 1Kg durante 30 min, posteriormente, se volvió a lavar y se tiñó con una solución de azul de Coomassie al 0.5% (p/v) en etanol:ácido acético:agua (45:5:50) y se destiñó con la misma solución sin azul de Coomassie.

3.5.2. Determinación de la K de afinidad

La K de afinidad (Kaf) fue estimada por un radioinmunoensayo no competitivo siguiendo el método descrito por Beatty y col. , (1987). El ensayo se realizó adsorbiendo el Ag, en este caso IgG₄mix, a la fase sólida a 4 concentraciones diferentes: 5, 2.5, 1.25 y 0.625 µg/ml. Para cada par de concentraciones de Ag se estimó la K de afinidad después de incubar con diluciones seriadas de cada AcM (factor 3, concentración máxima 200 µg/ml), aplicando la fórmula general:

$$Kaf = (n-1)/2(n[Ac']_t - [Ac]_t), \text{ siendo } n = [Ag]_t/[Ag']_t$$

Las $[Ac]_t$ y $[Ac']_t$ son las concentraciones totales estimadas de anticuerpo para obtener una señal del 50% del máximo, habiendo adsorbido el antígeno a las concentraciones $[Ag]_t$ y $[Ag']_t$ respectivamente.

3.5.3. Ensayos de competición entre los anticuerpos monoclonales

Uno de los datos más importantes en la caracterización de un panel de AcM es determinar el número de epítomos que reconocen en la molécula de Ag. Este análisis se realizó mediante un RIA de competición.

Se adsorbió a placas de PVC de 96 pocillos 50 µl de IgG₄mix a 5 µg/ml en PBS y después de la saturación con PBS-SAB, se incubó con 25 µl por pocillo de diluciones sucesivas de los anticuerpos anti-IgG₄ purificados (15 ng-15 µg por pocillo). A los 30 min, se añadieron 25 µl de los diferentes AcM marcados con I¹²⁵ (100.000 cpm/25 µl). Después de 30 min de incubación y de los correspondientes lavados, se midió la radiactividad incorporada en un contador gamma. Como controles negativos del ensayo (0% inhibición) se emplearon un AcM anti-*Fel d* I (Duffort y col., 1988) y el diluyente empleado en el RIA (PBS-SAB).

3.5.4. Digestión con papaína.

Se disolvieron 100 µg de cada una de las 3 IgG₄ de la mezcla (Bru, Ste y Fo) y 1 µg de papaína en 200 µl de PBS que contenía Cys 10 mM y EDTA 2 mM y se incubó a 37°C durante 30 min. El proceso de digestión se detuvo tras la adición de iodoacetamida a una concentración final de 30 mM.

3.6. TECNICAS ELECTROFORETICAS

Para comprobar el grado de pureza de los anticuerpos monoclonales, así como para analizar los fragmentos producidos después de la digestión proteolítica de la molécula de IgG₄, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en

presencia del detergente aniónico SDS (SDS-PAGE). El protocolo seguido, con pequeñas modificaciones, fue el de Laemmli (1970).

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de pH discontinuo de 16 x 14 cm² de área y 0.75 mm de grosor que constaban de gel concentrador y gel separador. En la preparación de ambos geles se utilizó una solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% (p/v) con una relación entre ellas de 36,5 : 1. El gel concentrador se preparó a una concentración del 5% de acrilamida en tampón Tris ClH 0.125 M pH 6.8 con 0.1% de SDS (Vol. final, 2 ml) y en el gel separador la concentración de acrilamida osciló entre el 10 y el 15%, según los experimentos, en tampón Tris ClH 0.38 M pH 8.8 con 0.1% de SDS (p/v) (Vol. final, 15 ml). Las muestras se disolvieron en un tampón Tris ClH 0.08 M pH 6.8 que contenía 2% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol y 0.005% (p/v) de azul de bromofenol. En la mayoría de los casos, se añadió además, un 5% (v/v) del agente reductor 2-mercaptoetanol. Las muestras se hirvieron durante 2 min antes de su aplicación en el gel.

Todas las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, EEUU) a voltaje constante de 40V, durante 12-14 h utilizando como tampón de electrodos Tris 0.025 M, glicina 0.192M pH 8.3, conteniendo 0.1% (p/v) de SDS. Finalmente, los geles se fijaron y tiñeron con azul de Coomassie al 0.2% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (45.5:7:46.5) y se destiñeron en ácido acético:metanol:agua (5:25:70).

3.7. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANAS DE PVDF

Para realizar la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida se siguió básicamente el método de Towbin y col., (1977), pero utilizando como membrana de transferencia, Immobilon (Millipore). Esta membrana es de PVDF (difluoruro de polivinilideno) y se caracteriza por tener una mayor capacidad de adsorción y fijación de las proteínas que las habitualmente utilizadas de nitrocelulosa.

Una vez realizada la separación electroforética, el gel se equilibró durante 15 min en el tampón de transferencia (Tris 25 mM y Glicina 192 mM en metanol 20% (v/v), pH 8.2-8.3). Paralelamente, la membrana de PVDF se humedeció con metanol y agua y posteriormente, se equilibró también con el tampón de transferencia durante 15 min. El gel se situó sobre la membrana de PVDF y a ambos lados se colocó una lámina de papel 3MM (Whatman). Este conjunto se situó entre dos soportes de material poroso y todo ello, entre dos soportes de plástico, introduciéndose, con la membrana de PVDF hacia el lado anódico, en la cubeta de transferencia (Hoefler Scientific Instruments). La transferencia se llevó a cabo durante 2 h a

250 mA con refrigeración. Finalizado el proceso, la membrana se utilizó bien para tinción, bien para ser procesada para inmunodetección (Métodos 3.8). La tinción se realizó con una solución de negro amido al 0.1% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (10:2:88) y se destiñó con una solución de metanol:ácido acético:agua (50:7:43).

3.8 INMUNODETECCION DE PROTEINAS EN MEMBRANAS DE PVDF

Una vez realizada la electroforesis y transferencia de las proteínas a la membrana se llevó a cabo el proceso de identificación de aquellas estructuras reconocidas por un determinado anticuerpo. Las membranas de PVDF, con las proteínas adsorbidas, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con PBS-L (leche en polvo al 1% (p/v) en PBS-T) para saturar todos los puntos de la membrana con capacidad de adsorción inespecífica de proteínas. A continuación, las membranas se incubaron en primer lugar, con los AcM a 10 µg/ml en PBS-L y después de los lavados con PBS-T, con GAM marcado con I¹²⁵ (150.000 cpm por membrana). Finalmente y después del proceso de lavado, las membranas se secaron y se procedió a realizar la autoradiografía (Materiales 2.12).

3.9. MARCAJE DE ANTICUERPOS CON ISOTOPOS RADIATIVOS

El marcaje con I¹²⁵ se efectuó según el método de Hunter y Greenwood (1962), con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo mezclando 10 µl (10 µg) de proteína con 10 µl de tampón fosfato 250 mM y añadiendo 300 µCi de I¹²⁵Na y 10 µl de Cloramina-T (1 mg/ml en tampón fosfato 50 mM pH 7.5). Esta mezcla se dejó 1 min a temperatura ambiente agitando de vez en cuando. Posteriormente, se añadieron 0.5 ml de Tirosina (0.5 mg/ml en tampón fosfato 50 mM pH 7.5) y después de 5 min de incubación se añadió 0.5 ml de IK (1 mg/ml en PBS-SAB). La proteína marcada se purificó por cromatografía de filtración en gel a través de una columna PD10 previamente equilibrada con PBS-SAB. Las fracciones correspondientes al pico de proteína marcada, con una actividad específica de alrededor de 10 µCi/µg, se mezclaron y conservaron a 4°C.

3.10. MARCAJES NO RADIATIVOS

3.10.1. Marcaje del GAM con Peroxidasa

El marcaje se realizó siguiendo el método de Tijssen y Kurstak (1984). Se disolvieron 10 mg de GAM en 1 ml de tampón carbonato sódico pH 9.2. Paralelamente, se activó la peroxidasa, previamente disuelta en tampón carbonato 0.1 M pH 8.1 (3.5 mg en 3.5 ml), incubándola con 350 μ l de IO_4Na 10 mM durante 2h a temperatura ambiente en oscuridad. La mezcla de peroxidasa y GAM se incubó en presencia de Sephadex G-25 (1/6 p/v) 3 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras separar el conjugado, este se estabilizó mediante la adición de 1/20 del volumen total de BH_4Na (5 mg/ml en NaOH 0.1 mM). A los 30 min, se añadió de nuevo BH_4Na (1/10 del volumen total en este caso) incubándose durante 1 h a 4°C. El GAM conjugado se purificó por una columna de AcA 34 equilibrada con PBS y aquellas fracciones que lo contenían se mezclaron y se dejaron en presencia de 1% de SAB y 50% de Glicerol. El anticuerpo así marcado se almacenó a -30°C. La actividad del conjugado se determinó mediante un ELISA frente a un anticuerpo de ratón y PBS-SAB como controles positivos y negativos respectivamente.

3.10.2. Marcaje del GAM con Fluoresceína

A 5 mg de GAM disueltos en 0.5 ml de tampón bicarbonato sódico 0.1 M, pH 8.5 se le añadió 0.85 ml de una solución de FLUOS (5(6)-carboxifluoresceinato de N hidroxisuccinimidilo) en DMSO, correspondiendo a un exceso molar de 10 veces. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El conjugado se separó mediante una filtración en gel a través de una columna PD10 equilibrada con tampón carbonato 0.1 M, pH 8.5. El eluido se dializó frente a PBS, añadiéndose posteriormente SAB a una concentración final del 1%, y se almacenó a -30°C.

3.10.3. Marcaje del anticuerpo monoclonal G4T.9 con Biotina

Se disolvieron 50 μ l de NHS-LC Biotina a 20 mg/ml en DMSO y se añadieron a 1 ml de AcM G4T.9 en tampón carbonato 0.1 mM pH 8.5. La mezcla se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. La biotina en exceso se separó mediante filtración a través de una columna PD10 y se recogieron las fracciones correspondientes al pico del anticuerpo conjugado (volumen: 1.2 ml y concentración : 3.2 mg/ml). Posteriormente, el anticuerpo biotinizado se diluyó 1/10 en una solución de glicerina al 50% en PBS y se almacenó a -30°C. Finalmente, se determinó el título del anticuerpo biotinizado mediante un ELISA en fase sólida adsorbiendo como control positivo IgG_4mix y, como negativo, IgGmix e incubando con diferentes diluciones del anticuerpo conjugado.

3.10.4. Marcaje del anticuerpo monoclonal G4T.9 con β - Galactosidasa

A 1 ml del AcM G4T.9 purificado (1 mg/ml en PBS) se le añadieron 10 μ l de MHS (Maleimidohexanoato de N-hidroxisuccinimidilo), preparado a 20 mg/ml en dioxano, incubándose durante 1 h a 37°C. El MHS en exceso que no reaccionó se separó mediante filtración en gel de Sephadex G-25 (columna PD10 previamente equilibrada con 30 ml de Cl_2Mg 10 mM en PBS). Posteriormente, se añadieron 40 mg de β -galactosidasa incubándose durante 1 h a 30°C. Después de la adición de β -mercaptoetanol a una concentración final de 10 mM, el AcM conjugado se separó de la enzima y el AcM libres mediante filtración en una columna de Ultrogel AcA 34. El anticuerpo se almacenó a 4°C en presencia de SAB al 1% y N_3Na al 0.05%. La actividad del anticuerpo se determinó siguiendo el mismo procedimiento anterior (Métodos 3.10.3).

3.11. ENSAYOS DE CUANTIFICACION DE IgG_4

3.11.1. ELISA para la cuantificación de IgG_4 total

Procedimiento. Se incubaron placas Costar con 100 μ l/pocillo del anticuerpo G4T.2 a una concentración de 5 μ g/ml en tampón carbonato pH 9.6 durante 1h a 37°C. Posteriormente y previa saturación con PBS-SAB, se añadieron 50 μ l de las muestras de sueros y de la curva patrón incubándose durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-T, se incubó cada pocillo con 50 μ l del anticuerpo G4T.9 biotinizado diluido 1/5000 en PBS-T durante 1 h también. Tras 4 lavados, se añadieron 50 μ l de streptavidina peroxidasa diluida 1/4000 y se incubó durante 1 h. Finalmente, se añadieron 50 μ l de sustrato enzimático de peroxidasa (Métodos 3.2.2) , deteniéndose el desarrollo de color a los 30 min mediante la adición de 50 μ l de SO_4H_2 y leyéndose la DO a 492 nm, utilizándose como filtro de referencia 630 nm.

Curva patrón. La concentración de IgG_4 total de cada muestra de suero se calculó por interpolación en la zona lineal de la curva estándar. Esta curva se construyó utilizando diluciones seriadas con factor 1/2, desde una concentración de 1 μ g/ml a 1 ng/ml, de un suero humano previamente calibrado en su contenido en IgG_4 frente a la referencia internacional OMS 67/69, según el método de Aucouturier y col., 1985.

3.11.2. ELISA para la cuantificación de IgG_4 específica

Procedimiento. Se añadieron 100 μ l de extracto alérgico a 10 μ g/ml en PBS (que es el extracto utilizado como referencia) a pocillos de Immunolon II y se

dejó incubando toda la noche a 4°C. Después de la saturación con PBS-SAB, se añadieron 50 µl de las muestras de suero y de la curva patrón y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente y después de 3 lavados, se llevó a cabo una segunda incubación, también de 1 h y a temperatura ambiente, con el anticuerpo G4T.9 marcado con β-galactosidasa. Tras 3 nuevos lavados, se añadieron 100 µl del sustrato enzimático (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) a cada pocillo, incubándose 30 min a 37°C. Finalmente, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de CO₃Na₂ 1M y se determinó la DO a 405 nm (filtro de referencia de 630 nm).

Curva patrón. La concentración de IgG₄ específica en cada muestra se calculó por interpolación en la zona lineal de una curva patrón previamente calibrada como se indica a continuación.

Inicialmente se seleccionó un suero de referencia que tuviera una concentración de IgG₄ total baja y altos niveles de IgG₄ específica a *Phleum pratense*. La cantidad de anticuerpos de IgG₄ específicos presentes en ese suero se calculó entonces mediante el proceso de absorción alérgica siguiente: se incubaron alícuotas del suero diluidas 1/35 durante toda la noche a 4°C con el extracto de *Phleum pratense* acoplado covalentemente a discos de papel activado con BrCN en constante agitación (40 µl por disco). Después de esta incubación, se determinó por duplicado el contenido en IgG₄ total y el nivel de específica en el suero absorbido. Como resultado, no se pudo detectar IgG₄ específica después de la absorción y la diferencia entre los niveles de IgG₄ total antes y después del tratamiento se tomó como la concentración de IgG₄ específica de ese suero de referencia. Este suero, posteriormente, se utilizó para calibrar una mezcla de sueros con altos niveles de IgG₄ específica frente a *Phleum pratense* con la que finalmente construimos la curva patrón (Resultados 4.2.2.1).

3.12. OTROS ENSAYOS

La valoración de IgE específica de los sueros de inmunoterapia se llevó a cabo mediante un enzoinmunoensayo comercial (Hamlet-IgE, Alergia e Inmunología Abelló S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente, después de unir el alérgeno a la fase sólida, se incubaron 100 µl de las muestras de suero para analizar durante 2 h a temperatura ambiente. Después se incubaron 100 µl de AcM anti-IgE (Materiales 2.4) marcado con β-galactosidasa. Los pasos posteriores del ensayo son los que se indican para el ELISA de IgG₄ específica (Métodos 3.11.2). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades con respecto a unos sueros tomados como referencia.

La valoración de IgG₁ específica se realizó mediante un enzoinmunoensayo puesto a punto en nuestro laboratorio. Después de unir el alérgeno a la

fase sólida, se incubaron 50 μ l de las muestras de suero diluídas 1:25 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 50 μ l del AcM anti-IgG₁ (Materiales 2.4) marcado con biotina, incubándose durante 1 h. Los pasos siguientes de adición de sustrato y revelado de la reacción enzimática son los indicados para el ensayo de cuantificación de IgG₄ total (Métodos 3.11.1). La cantidad de IgG₁ de cada muestra se calculó por comparación con una curva de referencia cuyo contenido en IgG₁ está expresado en unidades arbitrarias.

3.13. ENSAYOS DE LIBERACION DE MEDIADORES

3.13.1. Ensayo de liberación de histamina

La determinación de histamina liberada se realizó mediante un RIA comercial de inhibición en fase sólida (Immunotech, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados (10 μ /ml) y se diluyeron en el tampón comercial de liberación para posteriormente, incubarse durante 30 min a 37°C con los anticuerpos anti-IgG₄ y anti-IgE, así como con tampón de liberación como control de la liberación espontánea. La histamina liberada se midió en el plasma diluido después de centrifugar las muestras, representando los valores de liberación obtenidos los porcentajes liberados sobre el contenido total de histamina de cada sangre. Para calcular el contenido de histamina total, esta se determinó después de lisar las células sanguíneas mediante un proceso de congelación y descongelación rápido.

En algunos experimentos, al tampón de liberación se le añadió un 40% de óxido de deuterio (D₂O), o EDTA 10 mM.

Finalmente, en otra serie de experimentos, después de la incubación con los diferentes AcM, se midió la histamina en los sobrenadantes y las células se resuspendieron y reincubaron con el GAM a 25 μ g/ml, determinándose la histamina por el procedimiento habitual.

3.13.2. Ensayo de liberación de leucotrieno C₄

Para medir el contenido de leucotrieno C₄ (LTC₄) liberado se utilizó un RIA de competición en fase sólida comercial (Amersham, Gran Bretaña). Para ello previamente se purificó la fracción mononuclear de la sangre mediante un gradiente en Ficoll-Paque (Pharmacia, Suecia) (Métodos 3.14.1.). Después de centrifugar y lavar, las células se resuspendieron en el tampón de liberación comercial a una concentración de 10⁷ células/ml, con un porcentaje aproximado del 2% de basófilos (observado mediante tinción con azul de toluidina). 100 μ l de esta suspensión celular se incubó con 50 μ l del AcM anti-IgG₄(Fab) a 1 mg/ml durante 45 min a

37°C, y después de centrifugar se determinó el contenido de LCT₄ en picogramos en los sobrenadantes siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.14.DETECCION DE IgG₄ EN BASOFILOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.14.1. Preparación y tinción de basófilos

Se recogió la sangre en un tubo heparinizado (10 unidades/ml) y se diluyó en PBS en una proporción 1:1, añadiéndose 5 ml sin mezclar sobre 4.5 ml de un gradiente de Ficoll-Paque. Después de centrifugar 15 min a 800 g se recogieron las células de la interfase y se lavaron con PBS. Finalmente, se resuspendieron en 250 µl de PBS y se fijaron y tiñeron a la vez con una mezcla de azul de toluidina y paraformaldehído (0.2% y 2% p/v en PBS respectivamente) según Stallman y Aalberse, 1977. A los 10 min, la mezcla se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en 200 µl también de PBS.

3.14.2. Análisis por inmunofluorescencia

Se incubaron alícuotas de la suspensión celular preparada como se ha descrito anteriormente, con los AcM anti-IgG₄(Fab) y anti-IgG₄(Fc) a 100 µg/ml en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Este proceso fue seguido, tras un lavado, de una segunda incubación con GAM conjugado con fluoresceína diluido 1:20 en PBS. Después de lavar, las células se resuspendieron en una solución de glicerol en tampón carbonato a pH8.5 (9:1) que contenía 2.5% de 1,4-diazobis(2,2,2) octano. Finalmente, se transfirieron alícuotas de esta suspensión a portas y los basófilos y la inmunofluorescencia específica se visualizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BH2 (Olympus, Japón).

3.15 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico para comparar las distintas poblaciones de IgG₄ entre individuos atópicos, no atópicos, mujeres, hombres y antes y después de la inmunoterapia, se llevó a cabo mediante t de Student. Para ello se calcularon los logaritmos de cada muestra, para normalizar las poblaciones y homogeneizar las varianzas. Se tomó como grado de significación p<0.05.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG₄

4.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales

Para obtener anticuerpos monoclonales específicos de IgG₄ se llevaron a cabo dos experimentos de fusión distintos.

Fusión I- En este primer experimento, se utilizaron ratones que habían sido sometidos a un protocolo convencional de inmunización con una mezcla de proteínas de IgG₄ (Tabla 3.1). Como resultado, el título de anticuerpos frente a IgG₄ en el suero de estos ratones fue de 10⁴, aunque no se encontraron diferencias significativas con los títulos obtenidos frente a las otras 3 subclases de IgG. Después de la fusión celular, se detectó crecimiento celular, es decir, formación de híbridos, en el 53% de los pocillos de un total de 530. Cuando a los 10 días, se realizó con el sobrenadante de cultivo de los hibridomas el primer ensayo de selección (Métodos 3.2), se identificaron 15 como positivos ya que reconocían a la IgG₄ P-L. Sin embargo, después de realizar el ensayo de selección frente a las otras subclases de IgG, solamente 5 (30%) de ellos resultaron ser específicos de IgG₄, puesto que el resto reconocían a alguna o a todas las demás subclases de IgG. Una vez clonados estos hibridomas elegimos uno de ellos para estudios posteriores, el denominado G4.1, por su comportamiento durante el clonaje, su rápido crecimiento y su aparente alta afinidad.

Fusión II- Debido a los resultados anteriores, se trató de mejorar la respuesta inmune del ratón frente a los epítomos específicos de IgG₄, aumentando de esta forma el rendimiento de la fusión. Para ello, se sometió a los ratones a un tratamiento previo a la inmunización con IgG₄ para hacerles tolerantes frente a las otras tres subclases, como se indica en Métodos 3.1.1, Tabla 3.2. Este cambio en el esquema de inmunización trajo consigo un aumento en el título de anticuerpos anti-IgG₄ en el suero de los ratones (10⁵), que además fue de 100 a 10000 veces superior que el exhibido frente a cada una de las otras subclases de IgG. A los 8 días de la fusión celular, el análisis de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas obtenidos trajo consigo la selección de 12 líneas que secretaban anticuerpos capaces de reconocer a la IgG₄ humana de P-L. De ellos y después de realizar un ensayo doble frente a IgG₄mix e IgGmix, 10 (85%) resultaron ser totalmente específicos de la subclase humana IgG₄. Finalmente, una vez clonadas estas 10 líneas celulares, se eligieron 4 de ellas, G4T.2, G4T.9, G4T.11 y G4T.12 para estudios posteriores debido a sus buenas características de crecimiento y afinidad.

Como se puede ver en la Tabla 4.1, la comparación de ambas fusiones indica que como consecuencia del tratamiento de tolerización, la respuesta fue significativamente diferente (p=0.018, prueba exacta de Fisher) puesto que la mayoría de los

anticuerpos obtenidos fueron específicos de IgG₄, disminuyendo la respuesta dirigida frente a los epítomos compartidos por otras subclases de IgG.

	1ª SELECCION	2ª SELECCION	
	AcM específicos anti-IgG	AcM específicos (anti-IgG₄)	AcM no específicos (anti-otras IgG)
Fusión I	15	5(30%)	10(70%)
Fusión II	12	10(85%)	2(15%)

Tabla 4.1. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FUSION I Y II. Los valores representan el número de hibridomas secretores de AcM.

Los AcM producidos por los 5 clones específicos de IgG₄ elegidos fueron expandidos bien a través de cultivo celular, o bien produciendo líquido ascítico, para posteriormente purificarse y llevar a cabo su estudio y caracterización como se indica en Métodos 3.5. Pero antes, se evaluó de forma más detallada la especificidad de los AcM seleccionados para confirmar su capacidad de reconocer exclusivamente a la inmunoglobulina G₄. Para ello, se realizó un ELISA (Métodos 3.2) en el que se determinó la capacidad de unión de los AcM seleccionados frente a un panel de 17 paraproteínas humanas de IgG, así como frente a otras Igs (IgA, IgE e IgM) y a cadenas ligeras humanas λ y κ. Es interesante comentar que en el grupo de las 17 proteínas quedaban representadas las diferentes variedades alo e isoalotípicas de la IgG humana, así como las diferentes cadenas ligeras, como se indica en los paréntesis de la Tabla 4.2. Como se observa en la tabla, los 5 AcM seleccionados reconocen a todas las paraproteínas de isotipo G₄, tanto del isoalotipo 4a como 4b y con diferentes cadenas ligeras, y además, no exhiben ninguna unión significativa frente al resto de las subclases de IgG y otras inmunoglobulinas. Estos experimentos, que indican la total especificidad de los AcM obtenidos, fueron corroborados por técnicas de inmunodetección en membranas de PVDF. Este experimento se realizó llevando a cabo una electroforesis en condiciones reductoras de las diferentes proteínas de IgG. Posteriormente, se realizó una transferencia y las membranas de PVDF se incubaron con los diferentes AcM (Métodos 3.7 y 3.8), comprobándose que los cinco AcM elegidos eran específicos de IgG₄.

Proteína en la fase sólida (1)	Anticuerpos monoclonales (2)						
	α Cad λ	γ κ	G4T.1	G4T.2	G4T.9	G4T.11	G4T.12
	(control+)						
IgG ₁							
Ho(κ ,za)	1.3	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03
Hu(κ ,f)		0.04	0.04	0.05	0.06	0.06	0.05
Mi(λ ,f)		0.04	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04
Lab(λ ,za)		0.03	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
IgG ₂							
Bi(κ ,N ⁺)	1.2	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Ei(κ ,N ⁻)		0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04
Iss(λ ,N ⁻)		0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05
Pa(λ ,N ⁺)		0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05
IgG ₃							
Hae(κ ,b)	1.3	0.06	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Hum(λ ,b)		0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03
Rey(κ ,b)		0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.06
Ruf(λ ,b)		0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04
IgG ₄							
Bru(4b, κ)	1.2	1.65	1.50	1.75	1.40	1.40	1.70
Ste(4a, κ)		1.48	1.45	1.70	1.53	1.53	1.68
Fo(4a, λ)		1.50	1.40	1.68	1.45	1.45	1.63
We(4a, λ)		1.60	1.40	1.60	1.40	1.40	1.60
P-L		1.58	1.40	1.65	1.45	1.45	1.60
IgA	1.4	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05
IgM	1.3	0.03	0.02	0.03	0.03	0.05	0.04
IgE	1.3	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
Cad λ	1.5	0.03	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03
Cad κ	1.5	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03

Tabla 4.2. ESPECIFICIDAD DE LOS AcM ANTI-IgG₄. El ensayo se realizó según se indica en Métodos 3.2, adsorbiendo las diferentes Ig y cadenas ligeras a los pocillos (1) e incubando con los AcM mencionados (2). Se utilizó como 2º anticuerpo GAM marcado con peroxidasa. Los resultados muestran la media de los valores obtenidos por duplicado de DO a 492 nm (filtro de referencia 630 nm). El control negativo de unión inespecífica obtenido con el mieloma P3-X63Ag8 fue de 0.03 unidades de DO_{492 nm}.

4.1.2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-IgG₄

La total caracterización de un anticuerpo monoclonal es un proceso largo y complejo que depende del tipo de información que se quiera obtener y sobre todo del uso posterior del anticuerpo. Habitualmente, sobre todo si se dispone de un grupo de diferentes AcM, se llevan a cabo experimentos que nos ofrecen información sobre la clase, afinidad, y número de epítomos reconocidos para poder seleccionar aquellos que más nos interesen.

4.1.2.1. Determinación de la clase y constante de afinidad de los anticuerpos monoclonales

El conocimiento de la clase y constante de afinidad de un anticuerpo monoclonal es importante para determinar el protocolo de purificación más conveniente (purificación por afinidad, etc), así como para prever su utilidad en una determinada técnica (inmunoprecipitación, inmunodetección, ELISA, etc.).

El isotipo de los anticuerpos se determinó por doble inmunodifusión radial (Métodos 3.5.1). Como se puede ver en la Tabla 4.3, todos los AcM obtenidos en la Fusión II son de clase IgG₁ y sólo el AcM G4.1 (Fusión I) es de clase IgG_{2a}.

La constante de afinidad (K_{af}) se determinó mediante un RIA no competitivo según se indica en Métodos 3.5.2 y los resultados que se muestran en la Tabla 4.3, indican que el anticuerpo de menor afinidad ($2.08 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) se corresponde con el AcM G4T.2 y el de mayor ($4.93 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), con el AcM G4T.9.

AcM	Isotipo	K afinidad* (M ⁻¹)
G4.1	γ2a	$2.47 \pm 0.28 \times 10^9$
G4T.2	γ1	$2.08 \pm 0.54 \times 10^8$
G4T.9	γ1	$4.93 \pm 0.90 \times 10^9$
G4T.11	γ1	$1.93 \pm 0.37 \times 10^9$
G4T.12	γ1	$9.70 \pm 1.93 \times 10^8$

Tabla 4.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS AcM ANTI-IgG₄.
(*). Estos resultados muestran el valor medio obtenido de 6 determinaciones diferentes.

4.1.2.2. Determinación del número de epítomos definidos por los anticuerpos monoclonales

Uno de los principales aspectos en la caracterización de un panel de AcM es determinar si están dirigidos frente al mismo, o a diferentes epítomos (determinantes antigénicos) en la molécula del Ag. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de competición, en el que se determinó si la unión del AcM marcado con I^{125} a la molécula de IgG_4 se inhibía en presencia de los otros AcM sin marcar. Los resultados que aparecen en la Figura 4.1, muestran que la unión del AcM G4T.2 al Ag se inhibe únicamente por el mismo AcM siguiendo una curva dependiente de la concentración, lo que nos indica que este AcM reconoce un epítomo diferente al resto. Por otro lado, los otros 4 AcM, G4.1, G4T.9, G4T.11 y G4T.12, parecen reconocer el mismo epítomo o determinantes antigénicos muy próximos y relacionados puesto que la unión de cada anticuerpo a la IgG_4 es inhibida por los otros AcM, en grados diferentes dependiendo de la concentración utilizada. Estos resultados parecen sugerir que los AcM estudiados definen al menos 2 epítomos diferentes, no solapantes, en la molécula de IgG_4 :

- Epítomo A reconocido por G4T.2
- Epítomo B reconocido por G4.1, G4T.9, G4T.11 y G4T.12

Otra característica importante de estos determinantes antigénicos es que aparentemente, no se encuentran repetidos en la molécula de IgG_4 , porque cada anticuerpo marcado radiactivamente no es capaz de unirse al Ag si este se presenta por el mismo AcM adsorbido a la fase sólida.

4.1.2.3. Localización de los epítomos definidos por los anticuerpos monoclonales

La información obtenida con los experimentos de competición cruzada, se complementó con la localización de los determinantes antigénicos A y B en las regiones Fab y Fc de la molécula de IgG_4 . La digestión con papaína de IgG_4 humana (Métodos 3.5.4) produjo fragmentos Fab, Fc, así como otros, resultados de digestiones parciales, como cadena pesada (H) y restos de cadenas ligeras. Estos fragmentos fueron separados mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y se transfirieron posteriormente a una membrana de PVDF, llevándose a cabo una inmunodetección por parte de los diferentes AcM. Para poder caracterizar claramente los distintos fragmentos, llevamos dos controles, por un lado, un anticuerpo anti- IgG_4 comercial SK-44, específico de Fc (Jefferis y col., 1985) y por otro, una mezcla de AcM específicos de cadenas ligeras (Materiales 2.4) como marcadores

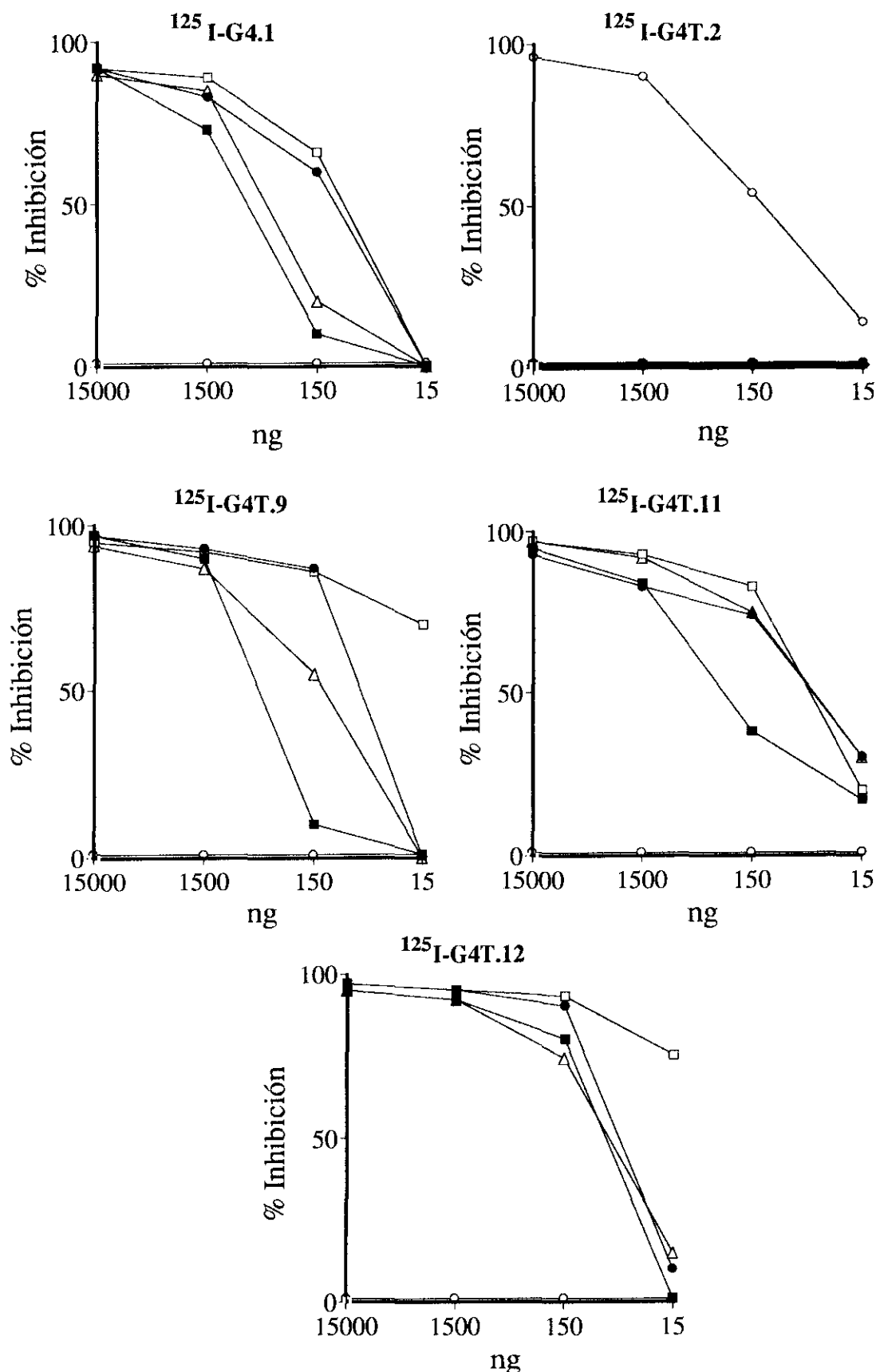


Figura 4.1. ENSAYOS DE COMPETICION DE LOS AcM ANTI-IgG₄. Se llevaron a cabo como se indica en Métodos 3.5.3. El porcentaje de inhibición se calculó según la fórmula : $[1 - (\text{cpm inh}/\text{cpm max})] \times 100$, donde cpm inh. se corresponde con la radiactividad unida a la fase sólida en presencia del AcM inhibidor (Δ G4.1; \circ G4T.2; \square G4T.9; \bullet G4T.11; \blacksquare G4T.12) y cpm max, con la radiactividad en ausencia del AcM inhibidor (PBS-SAB).

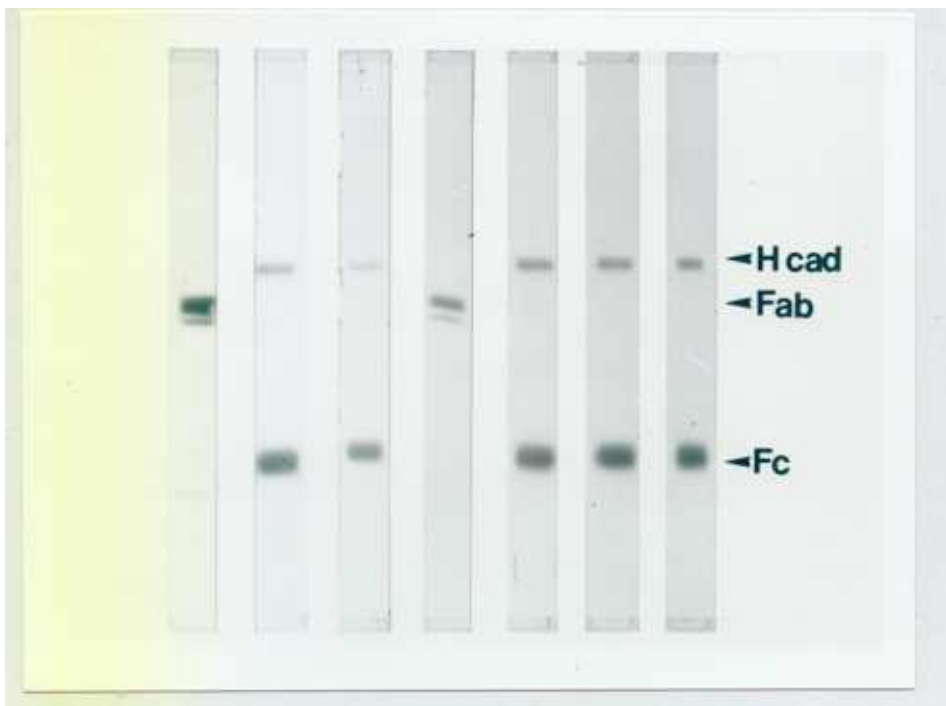


Figura 4.2. LOCALIZACION DE LOS EPITOPOS A Y B EN LA MOLECULA DE IgG₄. La autoradiografía de la figura muestra los fragmentos Fab y Fc de la molécula de IgG₄ Bru incubados en 1º lugar con el AcM: (2) anti-cadena ligeras; (2) SK-44; (3) G4.1; (4) G4T.2; (5) G4T.9; (6) G4T.11 y (7) G4T.12 y posteriormente con el GAM marcado con I¹²⁵.

del fragmento Fab. Como se puede observar en la Figura 4.2, los resultados obtenidos indican que el epítipo A (definido por el AcM G4T.2) está localizado en la región Fab pues reconoce el mismo fragmento que la mezcla de los anticuerpos anti-cadenas ligeras. Por el contrario, el determinante B reconocido por el resto de los AcM parece estar localizado en la región Fc de la molécula debido a que su patrón de reconocimiento es el mismo que el del anticuerpo comercial. Debido a estos resultados, se decidió denominar al AcM G4T.2 anti-Fab y al resto, anti-Fc. Aunque los resultados que se muestran en la figura fueron obtenidos con la digestión de la paraproteína Bru, se obtuvieron resultados similares con el resto de la proteínas de IgG₄ utilizadas en este trabajo.

Finalmente, es interesante comentar que el AcM G4T.2 a diferencia de los anti-Fc, no parece unirse a la cadena H que queda después de la digestión con papaína. Este último dato se corresponde con el débil reconocimiento de la cadena H por parte de este anticuerpo después de la separación de la molécula de IgG₄ por

SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol y su posterior inmunodetección (Figura 4.3). Este resultado podría indicar que el epítipo reconocido por el AcM G4T.2, o bien está definido por ambas cadenas (H y L), o bien está localizado en la cadena H, pero se trata de un epítipo conformacional que pierde su actividad funcional en las condiciones del experimento.

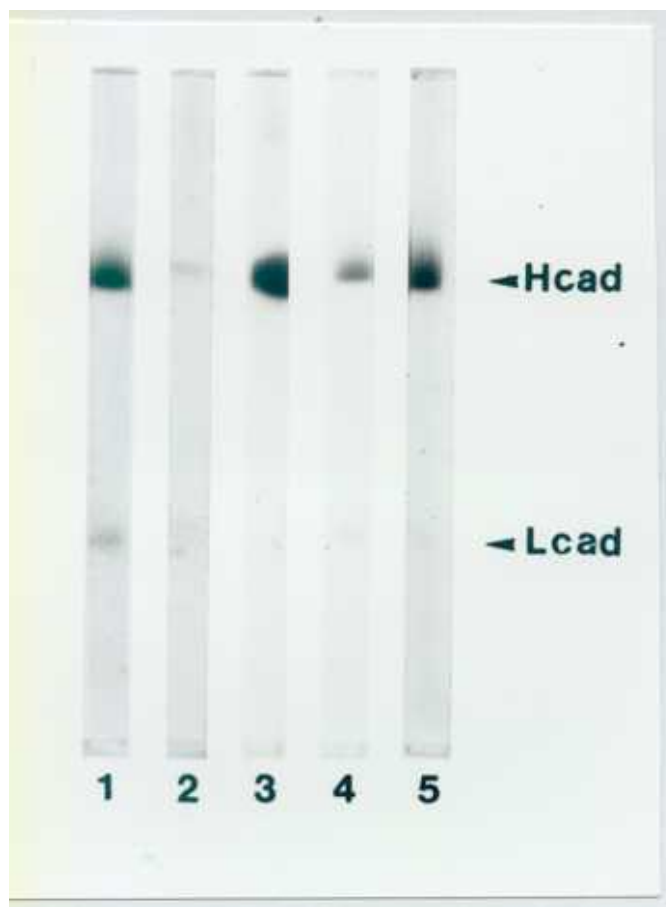


Figura 4.3. RECONOCIMIENTO DE LA CADENA PESADA DE LA MOLECULA DE IgG_4 . La autoradiografía de la muestra dos cad. pesada (H) y ligera (L) de la molécula IgG_4 Bru separadas mediante SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol incubados en 1º lugar con los AcM: (1) G4.1; (2) G4T.2; (3) G4T.9; (4) G4T.11 y (5) G4T.12 y posteriormente con el GAM marcado con I^{125} .

4.2. ENSAYOS DE VALORACION DE IgG₄

4.2.1. ELISA para la cuantificación de IgG₄ total

El hecho de que los AcM anti-IgG₄ obtenidos en este trabajo definan dos epítomos diferentes, nos ha permitido desarrollar un ensayo tipo "sandwich" para valorar esta subclase, que se caracteriza porque el Ag posee dos puntos de enlace con los anticuerpos. Inicialmente, se probaron diferentes combinaciones de AcM y los mejores resultados se obtuvieron immobilizando el AcM anti-Fab (G4T.2) a la fase sólida y empleando el AcM anti-Fc G4T.9 marcada radiactiva o enzimáticamente, siguiendo el procedimiento del esquema:

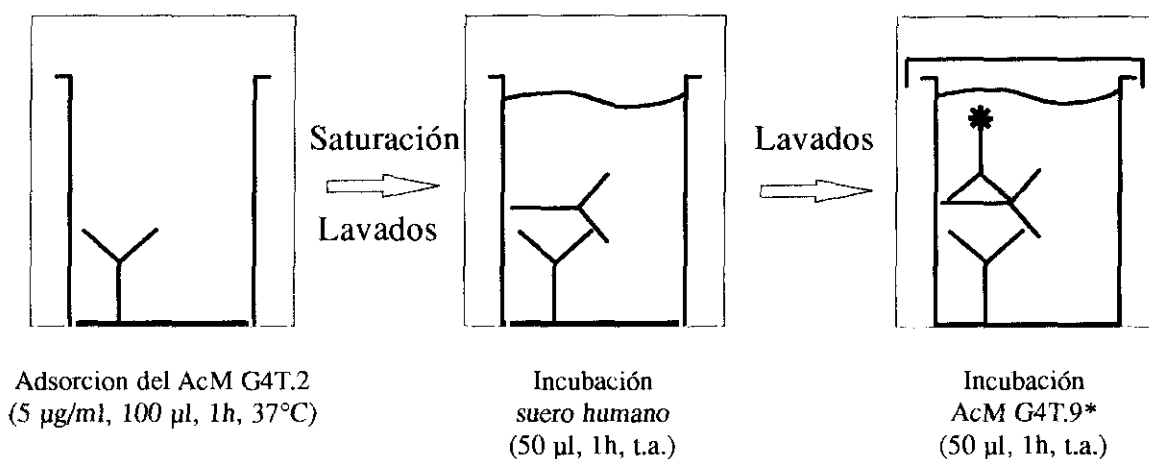


Figura 4.4. ENSAYO DE CUANTIFICACION DE IgG₄ TOTAL. El símbolo (*) indica que este AcM G4T.9 se utilizó bien marcado con I¹²⁵ o bien conjugado con Biotina o β-galactosidasa.

Las curvas de referencia obtenidas con el suero calibrado en su contenido en IgG₄ como se indica en Métodos 3.11.1 y utilizando el anticuerpo G4T.9 marcado con I¹²⁵, β-galactosidasa y biotina fueron muy semejantes, con sensibilidades del orden de 1 ng, y por razones de comodidad de marcaje, estabilidad del conjugado y además, mayor sensibilidad, se puso a punto el ensayo de cuantificación de IgG₄ total utilizando el AcM G4T.9 conjugado con biotina.

Es importante a la hora de desarrollar un inmunoensayo determinar los parámetros que nos van a indicar la utilidad del sistema en cuanto a su calidad analítica, como: especificidad, límite de detección, precisión intra e interensayo, recuperación y rango de trabajo.

La sensibilidad (definida como el valor de la concentración, en este caso del suero calibrado, cuya densidad óptica media (DO) menos 3 desviaciones estándar, DS, es igual a la DO más 3DS del diluyente) se calculó después de ensayar 3

veces el diluyente frente a la curva construida a partir de diluciones seriadas del suero calibrado (Métodos 3.11.1) desde 1 $\mu\text{g/ml}$. Como se observa en el gráfico de la Figura 4.5, esta se encuentra por debajo de 1 ng/ml , aproximadamente en 0.5 ng/ml . En cuanto al rango de trabajo que nos permite este ensayo cuantitativo con la curva obtenida, está comprendido entre 4 y 200 ng/ml .

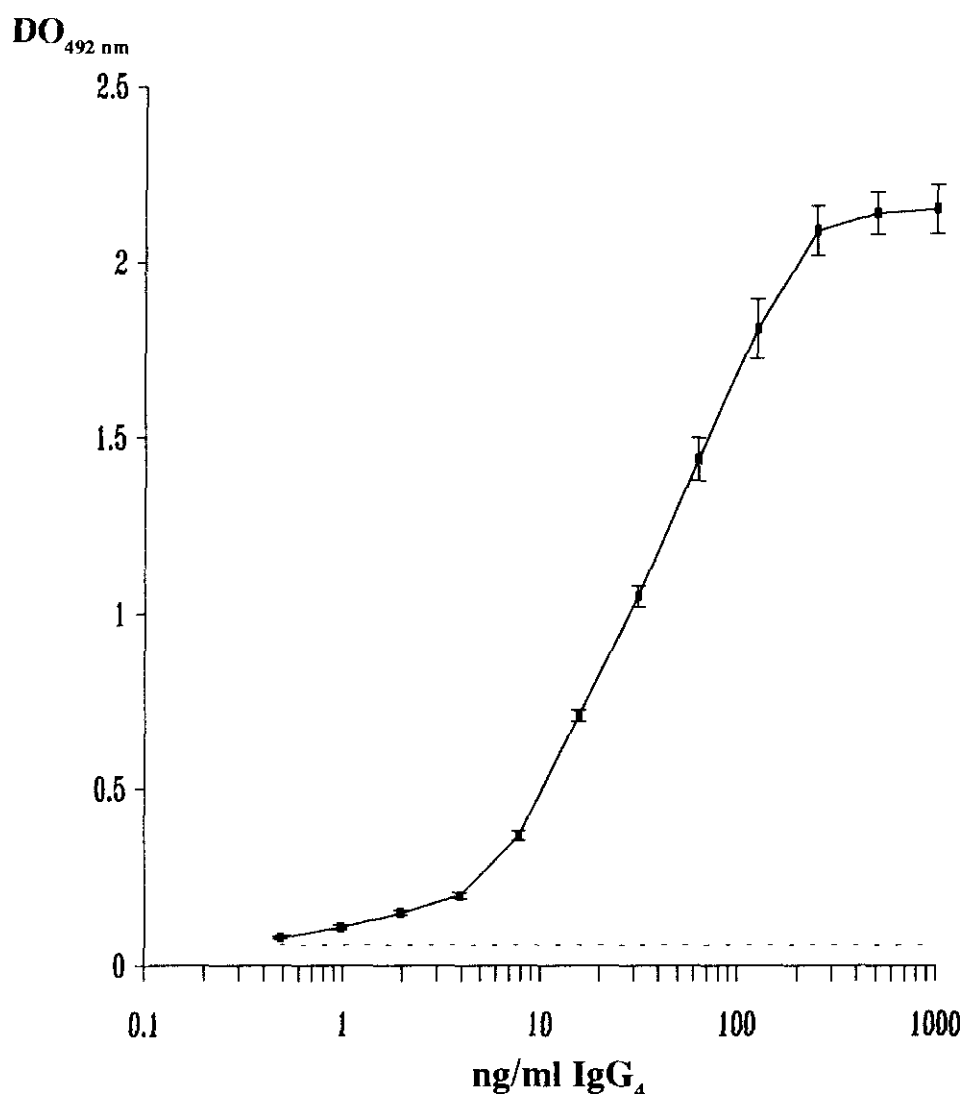


Figura 4.5. CURVA ESTANDAR PARA LA VALORACION DE IgG₄ TOTAL. Curva preparada a partir del suero calibrado de referencia con diluciones factor 1/2. Cada punto corresponde al valor medio de DO_{492 nm} de 3 determinaciones y su correspondiente DS. La línea de puntos representa la DO+3DS para el diluyente (0.06).

La precisión, expresada como coeficiente de variación (CV) tanto intra como interensayo, y que da cuenta de la variabilidad en una misma medida como consecuencia de los errores acumulados, se calculó utilizando 6 sueros humanos con un

rango de concentraciones de IgG₄ entre 0.082 y 1.42 mg/ml. La variación intraensayo se determinó ensayando 6 sueros 8 veces en el mismo experimento y se obtuvo un CV medio de 4.15%. En cuanto a la evaluación de la variación interensayo, se llevó a cabo midiendo el contenido de IgG₄ de las 6 muestras en 6 experimentos diferentes obteniendo un CV medio de 6.08% (Tabla 4.4).

<u>Suero</u>	<u>Intraensayo</u>			<u>Interensayo</u>		
	<u>media±DS</u> <u>IgG₄ mg/ml</u>	<u>n</u>	<u>CV(%)</u>	<u>media±DS</u> <u>IgG₄ mg/ml</u>	<u>n</u>	<u>CV(%)</u>
1	0.156 ± 0.005	8	3.2	0.154 ± 0.009	6	5.8
2	0.339 ± 0.013	8	3.8	0.334 ± 0.020	6	6.0
3	0.636 ± 0.013	8	2.0	0.641 ± 0.024	6	3.9
4	0.760 ± 0.020	8	2.6	0.755 ± 0.030	6	4.0
5	1.420 ± 0.107	8	7.5	1.420 ± 0.140	6	6.9
6	0.086 ± 0.005	8	5.8	0.087 ± 0.006	6	6.9

Tabla 4.4. PRECISION DEL ENSAYO DE IgG₄ TOTAL. n corresponde al número de estimaciones y CV al coeficiente de variación.

El parametro recuperación, que es una valoración de la linealidad del ensayo, se evaluó estudiando los siguientes factores:

-El efecto de la dilución de la muestra, que es lo que habitualmente se conoce como linealidad.

-El efecto de la mezcla de muestras con diferente contenido en IgG₄, que se suele denominar recuperación propiamente dicha.

La linealidad se estudió con los mismos sueros anteriores, ensayándoles a 3 diluciones diferentes (factor 1/2) comprendidas en la zona útil de trabajo del ensayo y el CV obtenido sobre los valores de concentración corregidos por el factor de dilución varió entre un 3 y un 7%. Para determinar la recuperación del ensayo se utilizaron 4 sueros diferentes (número 1, 2, 3 y 6 de la Tabla 4.4). El suero con una concentración de IgG₄ de 86 µg/ml fue suplementado con los otros tres, de 156, 339 y 636 µg/ml respectivamente, y después de ensayar las mezclas se comprobó que el 92, 89 y 95% de la IgG₄ añadida en cada caso fue recuperada.

Aunque los AcM son específicos de IgG₄ (Tabla 4.2), se confirmó la especificidad del ensayo utilizando un panel de paraproteínas de isotipos G₁, G₂ y G₃ (Tabla 4.2). El ensayo de éstas a una concentración de 200 µg/ml, que es 1000 veces superior que el límite superior de la zona útil de trabajo del ensayo, no dió señal significativa en ningún caso. Asimismo, se comprobó que estas inmunoglobu-

linas presentes en los sueros y que no presentan reactividad cruzada en nuestro ensayo, no provocaban ningún tipo de perturbación e interferencia en la valoración de IgG_4 . Para ello, se obtuvieron 4 curvas de calibración diferentes utilizando como diluyente PBS-SAB solo o suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de IgG_1 , IgG_2 e IgG_3 (Figura 4.6). La presencia de estas tres subclases de IgG no alteró significativamente la curva estándar de IgG_4 , no encontrándose diferencias significativas entre la 4 curvas de ensayo obtenidas.

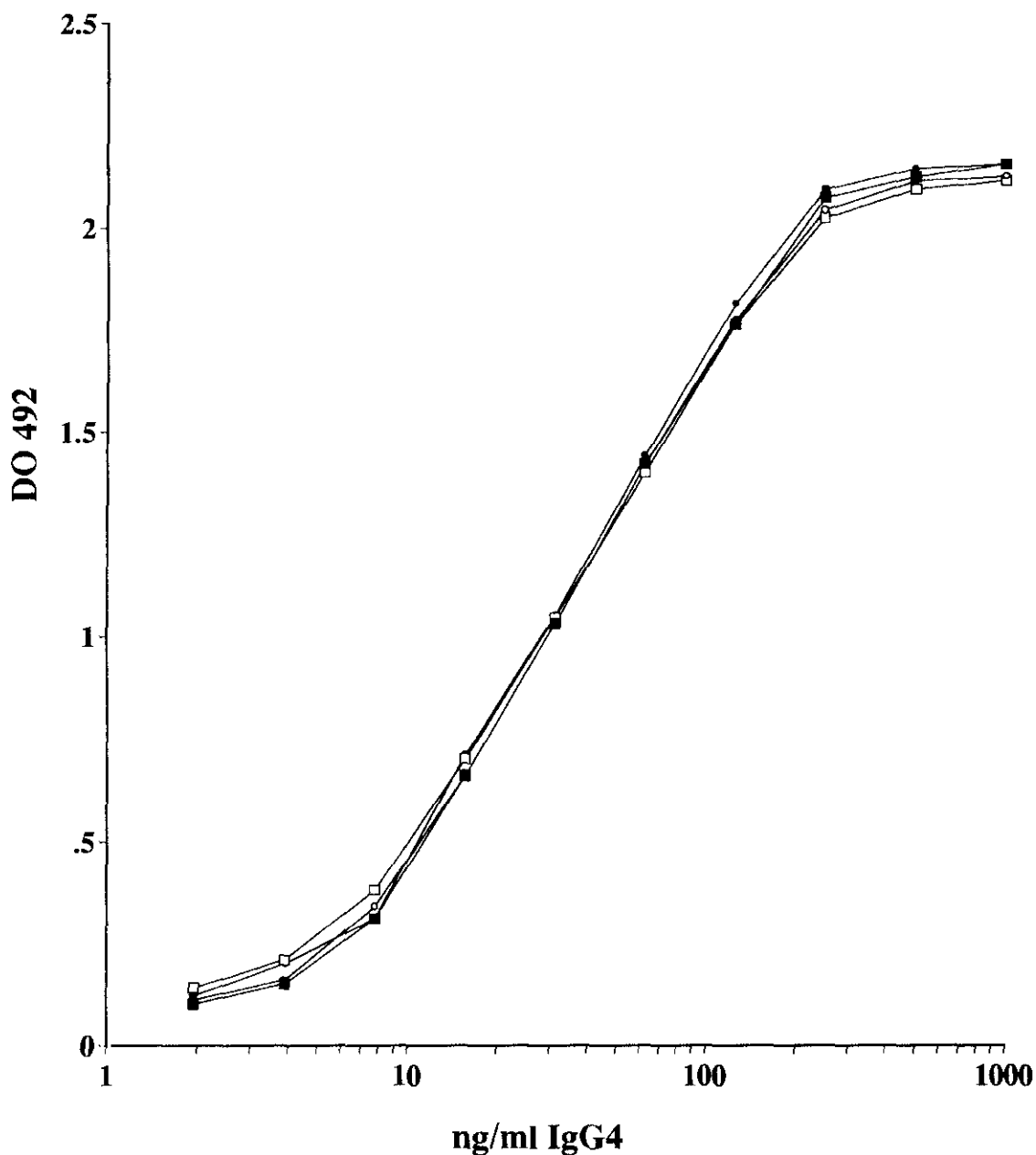


Figura 4.6. EFECTO DE LAS OTRAS SUBCLASES DE IgG EN LA CUANTIFICACION DE IgG_4 TOTAL. Las cuatro curvas de ELISA fueron obtenidas usando suero calibrado diluido en PBS-SAB (●) o diluido en el mismo tampón pero suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de IgG_1 Hu (□), IgG_2 Iss (○) o IgG_3 Si (■).

4.2.2. ELISA para la cuantificación de IgG₄ específica

El estudio del comportamiento de los anticuerpos IgG₄ específicos requiere la disponibilidad de ensayos de gran sensibilidad y reproducibilidad, que además sean cuantitativos. Hasta ahora, la mayoría de los métodos descritos son sólo semi-cuantitativos y muy pocos investigadores han abordado este problema. Es por ello por lo que se ha puesto a punto un ELISA cuantitativo, cuyo esquema se muestra en la Figura 4.7, para la valoración de IgG₄ específica.

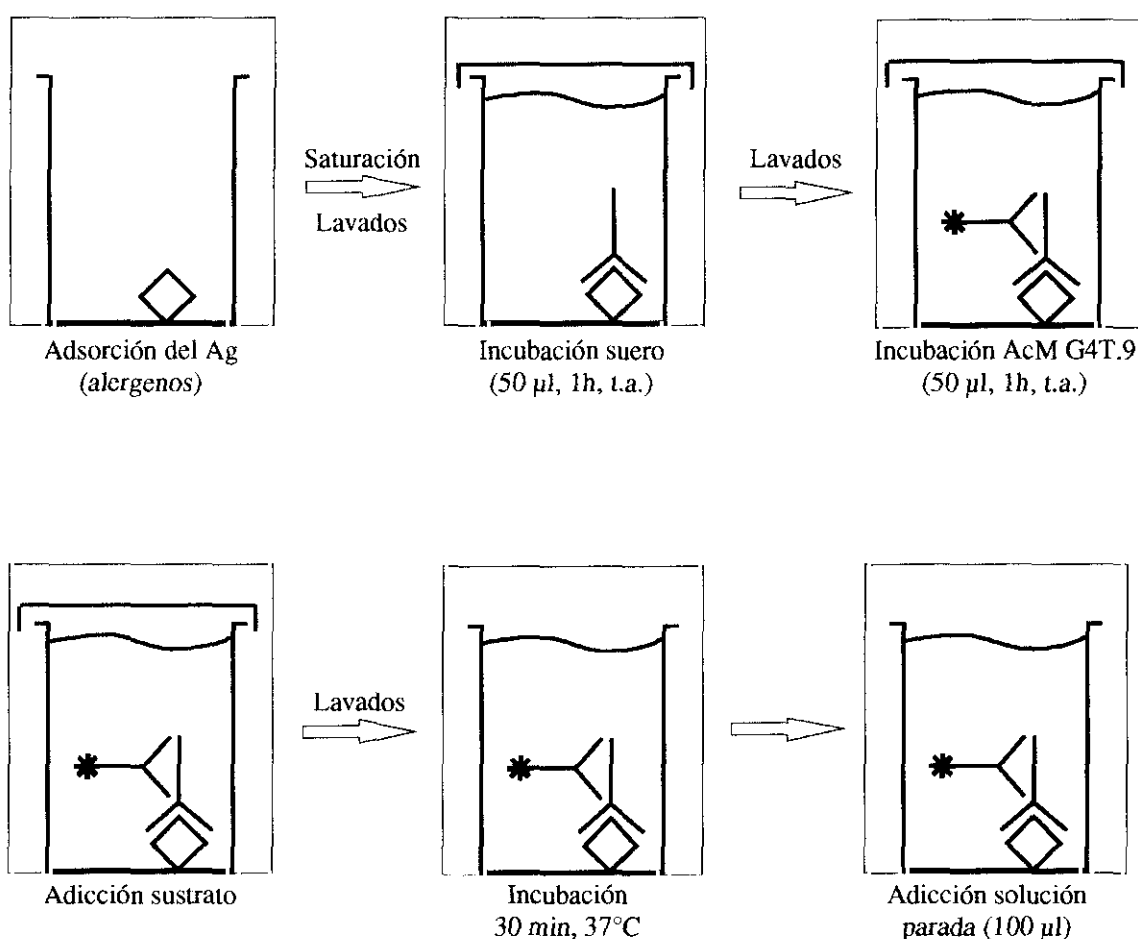


Figura 4.7. ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE IgG₄ ESPECIFICA. El AcM G4T.9 se utilizó en este ensayo conjugado con β-galactosidasa (Métodos 3.11.2).

Como se puede ver en el esquema, el Ag, en este caso los diferentes extractos alérgicos, se adsorbieron al plástico y el AcM anti-IgG₄ seleccionado como anticuerpo trazador fue el de mayor afinidad, el G4T.9. Para que además el método fuera cuantitativo, se determinó el contenido en IgG₄ específica frente a una gramínea de un suero que posteriormente, se empleó como referencia en el ensayo. La calibración de este suero, así como las características del ensayo se describen a continuación.

4.2.2.1. Preparación de la curva de referencia

La construcción de la curva estándar del ensayo se hizo determinando en primer lugar, la cantidad de IgG₄ específica de *Phleum pratense* de un suero tomado como referencia. Esta cantidad se calculó como la diferencia en la concentración de IgG₄ total antes y después de la eliminación de los Ac IgG₄ específicos a este extracto. Esta eliminación se consiguió mediante un proceso de absorción de los Ac IgG₄ específicos a un exceso del extracto de *Phleum* unido a una fase sólida (15 µg de extracto por µl de suero), como se indica en Métodos 3.11.2. Para que con este procedimiento la eliminación de la IgG₄ específica fuera efectiva era necesario disponer de un suero con una concentración de IgG₄ total baja y con un nivel de IgG₄ específica que representara una fracción importante del contenido total de esta subclase. De esta forma, las variaciones en los niveles de IgG₄ específica se reflejarían en variaciones en los de IgG₄ total antes y después de la adsorción, pudiéndose cuantificar con precisión. La localización de un suero de estas características entraña gran dificultad, debido a la que en la mayoría de los casos la contribución de la IgG₄ específica al contenido total de esta subclase es muy baja (Layton y Stanworth, 1984).

Por esta razón, se analizaron 300 sueros de pacientes alérgicos al polen de gramíneas sometidos a un tratamiento de inmunoterapia frente a *Phleum pratense* y se eligió como suero de referencia, uno con una concentración de IgG₄ total de 94.4 µg/ml y altos niveles de específica. Como consecuencia del proceso de absorción, se produjo una eliminación completa de los Ac IgG₄ específicos que, a su vez, se reflejó en una reducción reproducible de la concentración de IgG₄ total hasta 69.6 µg/ml (Tabla 4.5). Representando, por tanto, la diferencia entre la concentración antes y después de la absorción (24.8 µg/ml) el valor de la concentración de los Ac IgG₄ específicos en este suero de referencia. Como control de la especificidad del método, se llevó a cabo un experimento similar con un suero de bajo contenido

<u>IgG₄ total antes de la absorción</u>	<u>IgG₄ total después de la absorción</u>	<u>IgG₄ específica *</u>
100.0	73.9	26.1
99.0	74.7	24.1
90.0	64.1	25.9
88.6	65.7	22.9
<u>X±DS=94.4±5.9</u>	<u>X±DS=69.6±5.5</u>	<u>X±DS=24.8±1.5</u>

Tabla 4.5. CALIBRACION DEL CONTENIDO DE IgG₄ ESPECIFICA DEL SUERO DE REFERENCIA. Los valores representan µg/ml de IgG₄. Los resultados de IgG₄ específica (*) se calcularon como diferencia del contenido de IgG₄ total antes y después de la absorción de la IgG₄ específica.

en IgG₄ total y sin IgG₄ específica frente al extracto de *Phleum*. Como resultado, no se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de IgG₄ total antes ($38.8 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$) y después ($36.0 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$) de la absorción.

Para poder disponer de grandes cantidades de suero estándar para sucesivos análisis, se preparó una mezcla de sueros con altos niveles de IgG₄ específica a *Phleum pratense* y se calibró frente al suero de referencia original. Con este fin, se ensayó tanto el suero de referencia original, como la mezcla de sueros de forma paralela y a distintas diluciones y la concentración de IgG₄ específica de la mezcla se calculó interpolando de aquellas diluciones que dieron valores de absorbancia que estaban dentro de la zona de respuesta lineal del ensayo. Después de realizar el experimento 4 veces se calculó una concentración de $12.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ de IgG₄ anti-*Phleum pratense* y con este estándar se contruyó una curva patrón. La Figura 4.8 muestra la curva de ensayo obtenida con la preparación estándar indicada, cuyas características se describen a continuación.

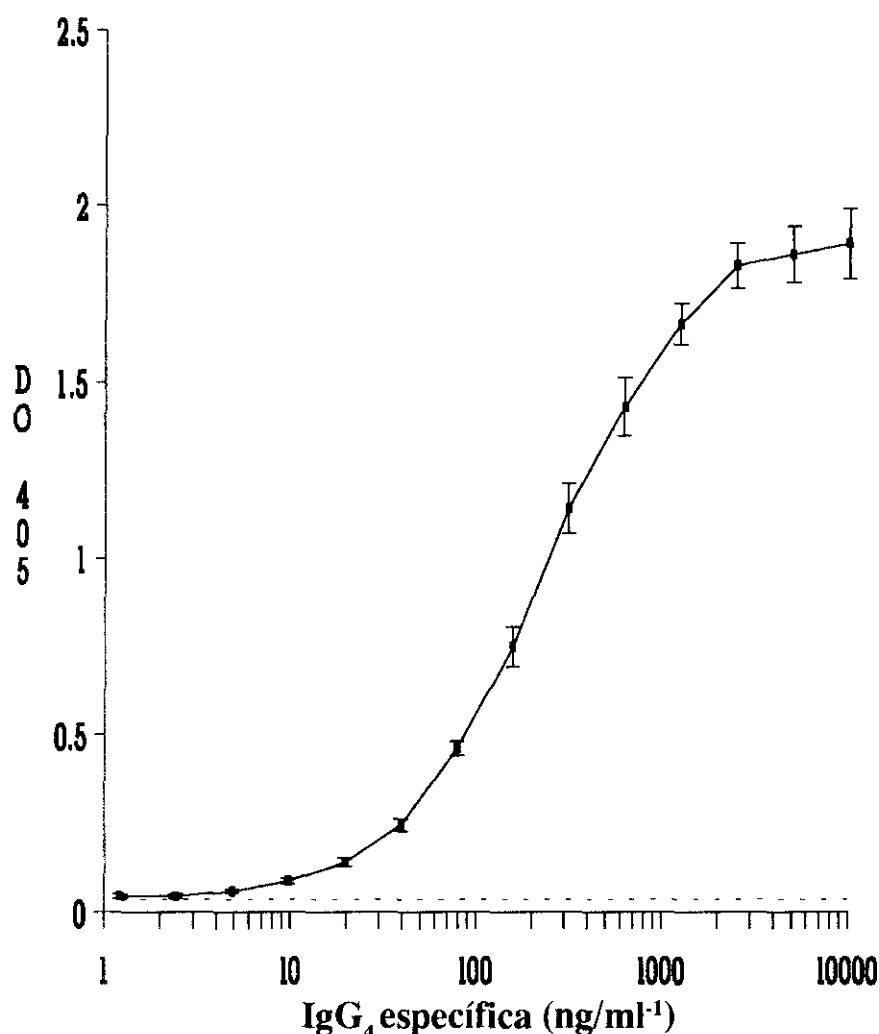


Figura 4.8. CURVA DE CALIBRACION DE IgG₄ ESPECIFICA. Curva preparada a partir de una mezcla de sueros anti-*Phleum pratense* (diluciones, factor 1/2). Cada punto corresponde al valor medio de DO_{405nm} de 3 determinaciones y su correspondiente DS. La línea de puntos representa la absorbancia de 1 suero negativo más 3DS (0.036).

4.2.2.2. Propiedades del ensayo

La construcción de la curva patrón a partir de la mezcla estándar se hizo ajustando la concentración de IgG₄ específica de esta mezcla a 10 µg/ml y ensayándola con diluciones seriadas (1:2) hasta 1.2 ng/ml. Como resultado, se obtuvo la curva que se muestra en la figura 4.8. La sensibilidad, que se definió en los mismos términos que para el ensayo de IgG₄ total, se determinó ensayando 12 veces un suero negativo sin IgG₄ específica a *Phleum pratense*. La sensibilidad obtenida fue de 5 ng/ml. Sobre la misma gráfica también se puede observar que la respuesta alcanza la saturación aproximadamente a una concentración de 1.2 µg/ml, y que el rango efectivo de trabajo es de más de 2 órdenes de magnitud.

La precisión intra e interensayo se calculó con 5 sueros con diferente contenido en IgG₄ específica a *Phleum pratense*, 17.2, 10.6, 4.8, 2.6 y 1.4 µg/ml respectivamente, ensayándolos por cuadruplicado en 6 experimentos diferentes. Como se ve en la Tabla 4.6, obtuvimos un CV medio intraensayo de 8.0% y un CV medio interensayo de 10.1%.

Suero	IgG ₄ específica (µg/ml)	CV(%) intraensayo	CV(%) interensayo
1	17.2	10.7	14.4
2	10.6	8.2	10.0
3	4.8	6.5	6.8
4	2.6	6.9	8.3
5	1.4	7.6	11.1
		X=8.0	X=10.1

Figura 4.6. PRECISION DEL ENSAYO DE IgG₄ ESPECIFICA.

La recuperación del ensayo se investigó con 3 sueros A, B y C con diferente concentración de IgG₄ específica a *Phleum pratense* y un suero negativo. El experimento se realizó mezclando en diferentes proporciones el suero negativo con cada suero positivo y ensayando las mezclas por triplicado, comparando los valores de concentración de las mezclas esperados y obtenidos. Como resultado, como se ve en la Tabla 4.7, la recuperación obtenida fue del 105%, 99.5% y 108.7% respectivamente.

Para asegurar la especificidad del ensayo, se realizaron dos experimentos diferentes empleando en ambos casos como fuente de IgG₄ inespecífica una mezcla de paraproteínas de IgG₄: We, Bru y Fo. En primer lugar, se determinó el contenido de IgG₄ específica a *Phleum pratense* en la mezcla y no se obtuvieron valores por

Sueros		Valor esperado ⁽¹⁾	Valor observado	Recuperación (%)
% Suero A	% Suero(-)			
80	20	8.6	8.2	95
60	40	6.4	6.5	102
40	60	4.3	4.5	109
20	80	2.1	2.4	114
% Suero B				
	% Suero (-)			
80	20	3.9	3.9	100
60	40	2.9	2.1	93
40	60	1.9	2.0	105
20	80	1.0	1.0	100
% Suero C				
	% Suero (-)			
80	20	4.3	4.2	98
60	40	3.2	3.5	109
40	60	2.1	2.5	119
20	80	1.1	1.2	109

Tabla 4.7. RECUPERACION DEL ENSAYO DE IgG₄ ESPECIFICA. Los valores de IgG₄ específica se expresan en todos los casos en µg/ml.

encima del fondo, utilizando concentraciones de IgG₄ total de hasta 500 µg/ml (esta concentración representaría para un suero diluido 1:25 una concentración de IgG₄ total de 12.5 mg/ml, valor muy excepcionalmente encontrado (Magnusson y col., 1986). Por otro lado, se estudió el posible efecto de interferencia de altos niveles de IgG₄ inespecífica en la cuantificación de IgG₄ específica. Para ello, se suplementaron 4 sueros con diferente contenido en IgG₄ específica (9.0, 4.5, 1.8 y 0.9 µg/ml) con 100 µg/ml de la mezcla de paraproteínas de IgG₄ indicada y se ensayaron en paralelo con los mismos sueros no suplementados. Como se observa en la Tabla 4.8, si se comparan los valores esperados y obtenidos no existe ninguna diferencia significativa entre ellos, por lo que se concluyó que niveles altos de IgG₄ no específica no interfieren en el ensayo.

Como control adicional del ensayo, se decidió comparar el ELISA desarrollado con otro método previamente publicado (IgG₄ FAST). Este método se caracteriza por ser un ELISA fluorescente que valora el contenido de IgG₄ en µg/ml utilizando una curva estándar de IgG₄ específica de veneno de abeja purificada por cromatografía de afinidad y su límite de sensibilidad es de 2 µg/ml. El estudio se

llevó a cabo con unos sueros de pacientes alérgicos a veneno de abeja. Como resultado, con el ensayo puesto a punto en este trabajo se detectaron mayor número de sueros positivos, puesto que la sensibilidad es mayor (5 ng/ml) y se obtuvo una correlación excelente entre ambos métodos en la valoración de aquellos sueros con IgG₄ específica superior a 2 µg/ml ($r= 0.9763$, pendiente = 0.8531).

Valor esperado⁽¹⁾	Valor observado⁽²⁾	R⁽³⁾
9.0	10.0	278
4.5	4.5	556
1.8	1.7	1389
0.9	0.8	2780

Tabla 4.8. INTERFERENCIA DE LA IgG₄ NO ESPECIFICA EN EL ENSAYO DE IgG₄ ESPECIFICA. Los niveles de IgG₄ específica se midieron antes (1) y después (2) de la adición de IgG₄ inespecífica. Los valores se expresan en µg/ml. R⁽³⁾ indica la relación entre el contenido de IgG₄ inespecífica/específica de suero suplementado.

4.3. VALORACION DEL COMPORTAMIENTO DE LA IgG₄ EN ALERGIA

El desarrollo de los ensayos de IgG₄ total y específica nos ha permitido disponer de la tecnología necesaria para cuantificar con precisión, especificidad y sensibilidad los niveles de IgG₄ en diferentes patologías alérgicas. El conocimiento de estos niveles y muy especialmente las variaciones que experimentan, puede ser de gran utilidad desde el punto de vista clínico para ayudar a comprender el papel de la IgG₄ en la Alergia. Es por ello, por lo que utilizando los ensayos puestos a punto se ha determinado la concentración de IgG₄ total y específica de determinados alérgenos en pacientes con diferentes patologías alérgicas, así como en el transcurso de tratamientos de inmunoterapia.

4.3.1. Determinación de los niveles de IgG₄ total

Para estudiar las variaciones producidas en el comportamiento sérico de la IgG₄ como consecuencia de las enfermedades alérgicas, se valoró el nivel de IgG₄ total en un grupo de pacientes alérgicos a gramíneas con diferente sintomatología clínica, asma y/o rinitis, antes y después de un tratamiento de hiposensibilización específico con extracto de *Phleum pratense*. Asimismo, como control y para establecer los valores de referencia en individuos sanos, se determinó la concentración de esta subclase en un grupo de donantes no atópicos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9

	n	Rango (mg/ml)	X±DS (mg/ml)
Donantes no atópicos	30	0.03-2.3	0.461±0.481
Atópicos antes de IT	36	0.05-2.6	0.530±0.560
Atópicos después de IT	36	0.05-5	0.697±0.908

Tabla 4.9. NIVELES DE IgG₄ TOTAL EN ATOPICOS Y NO ATOPICOS. (n) representa el número de individuos estudiados en cada grupo y X la media de los valores obtenidos.

Como se puede observar, el valor medio obtenido para el grupo de individuos no atópicos fue de 0.461 mg/ml, con un rango de concentraciones muy amplio, entre 0.03 y 2.3 mg/ml, que solapaba con el obtenido para el grupo de pacientes atópicos. En este último grupo, el valor medio obtenido fue ligeramente, aunque no significativamente superior (0.530 mg/ml). Finalmente, después del

tratamiento de IT, este mismo grupo de individuos experimentó un incremento en la concentración de IgG₄ total, alcanzando el valor medio de 0.697 mg/ml con un rango de variación aún más amplio que en los casos anteriores (0.05-5 mg/ml). En este caso, el aumento medio de IgG₄ total detectado después del tratamiento fue estadísticamente significativo ($p=0.036$), de hecho, si se analiza cada paciente individualmente se comprueba que el 68% de los individuos experimentó en el transcurso de la IT un aumento en la concentración de IgG₄ total significativo.

Por otro lado, se ha descrito que uno de los aspectos que podría afectar a la concentración de IgG₄ es el sexo de los individuos. Para investigarlo, se llevó a cabo un estudio sobre la influencia de esta variable sobre el nivel de IgG₄ total en el grupo de individuos alérgicos (con y sin tratamiento) anteriormente mencionados y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.10.

	IgG₄ total antes IT		IgG₄ total después IT	
	X±DS (mg/ml)	Rango (mg/ml)	X±DS (mg/ml)	Rango (mg/ml)
Mujeres	0.422±0.395	0.05-1.5	0.465±0.312	0.05-2.6
Hombres	0.680±0.722	0.05-1.2	0.930±1.20	0.06-4.5

Tabla 4.10. INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA CONCENTRACION DE IgG₄ TOTAL.

El análisis estadístico de ambas poblaciones indicó que aunque la media de la concentración en hombres sea más alta las diferencias existentes entre ambos grupos antes y después de la IT no fueron estadísticamente significativas. Esto sugiere que no existe una influencia significativa del sexo sobre la concentración de IgG₄ total, en contra de la mayoría de los datos hasta ahora publicados (Magnusson y col., 1986).

Todos estos resultados tomados en conjunto parecen confirmar la dificultad que puede existir a la hora de establecer diferencias entre grupos con distintas características y distintas patologías, debido a la gran variabilidad de valores observados.

4.3.2. Determinación de los niveles de IgG₄ específica

Para comparar el comportamiento de los niveles de IgG₄ específica con los de IgG₄ total, se hizo un estudio paralelo al anterior en el que se analizó la presencia de anticuerpos IgG₄ específicos frente a dos extractos alérgicos (*Phleum*

pratense y epitelio de gato) en el grupo de individuos no atópicos anteriormente mencionado y en dos grupos de pacientes alérgicos sometidos a IT. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.11.

	n	n con IgG ₄ específica	X IgG ₄ (µg/ml)	rango (µg/ml)
1				
Donantes no atópicos	31	2	<0.05	---
Atópicos antes IT	53	26	0.068	<0.05-0.260
Atópicos después IT	53	53	64.6	2.4-260
2				
Donantes no atópicos	31	3	0.1	0.05-0.2
Atópicos antes IT	24	16	1.29	<0.05-10
Atópicos después IT	14	14	12.8	1.3-42

Tabla 4.11. NIVELES DE IgG₄ ESPECIFICA EN ATOPICOS Y NO ATOPICOS. (n) representa el número de individuos en los que se determinó la concentración de IgG₄ específica a (1) *Phleum pratense* y (2) epitelio de gato. X representa la media de las concentraciones de IgG₄.

Como se puede observar en la tabla, en el grupo control de donantes no atópicos, sólo 2 individuos tenían IgG₄ específica detectable frente a *Phleum*, aunque con valores inferiores a 0.05 µg/ml. Por el contrario, el 50% de los individuos alérgicos a esa gramínea tenían IgG₄ detectable, aunque los valores obtenidos en todos los casos fueron menores de 1 µg/ml. Considerando ahora el comportamiento frente al otro extracto alérgico, epitelio de gato, mientras que en el grupo control sólo se detectaron 3 individuos con IgG₄ específica (0.1 µg/ml), el 67% de los pacientes alérgicos a epitelio de gato poseían IgG₄ específica con niveles de hasta 10 µg/ml. La existencia de valores tan elevados en este grupo probablemente indique una mayor exposición al alérgeno que en el caso del polen de gramíneas. Finalmente, ambos grupos experimentaron un cambio dramático y significativo en sus niveles de anticuerpos específicos como consecuencia de los tratamientos de hiposensibilización. La comparación entre las variaciones que se producen en los niveles totales y específicos de esta subclase durante la IT se estudiará con detalle más adelante (Resultados 4.2.3).

Por otro lado y siguiendo con el estudio de los niveles de IgG₄ específica y dejando aparte los tratamientos de IT, hay un campo dentro de la Alergia, que es la alergia a alimentos, donde la valoración de IgG₄ específica podría tener una gran relevancia debido a que en numerosos casos, no se detecta IgE específica. Es por ello por lo que se determinó la concentración de IgG₄ específica a proteínas de la leche en un grupo de 24 niños con diferente sintomatología y niveles de IgE, llevando como control un grupo de niños no atópicos. Los valores medios obtenidos fueron:

- Atópicos = 15.4 ± 24.7 µg/ml
- No atópicos = 1.08 ± 2.5 µg/ml

A diferencia de lo que ocurría con los aeroalergenos, los niveles de IgG₄ específica frente alimentos (en este caso leche) en paciente alérgicos son mucho más elevados, si bien también es más común que los individuos normales los posean aunque su presencia sea significativamente más baja. En cualquier caso, si comparamos estos resultados con los anteriores, podemos observar que, al menos cuantitativamente, la presencia de Ac IgG₄ específicos de alimentos parece ser muy importante y aunque no se ha llevado a cabo un estudio detallado de su relevancia clínica, hay que mencionar como dato importante que de los 24 niños con Ac IgG₄ específicos de leche y sintomatología alérgica, 12 carecían de niveles detectables de IgE.

4.3.3. Comportamiento de la IgG₄ en Inmunoterapia

Uno de los posibles papeles atribuidos a la IgG₄ es el de anticuerpo protector durante exposiciones antigénicas prolongadas, como es el caso de los tratamientos de hiposensibilización. Debido a la importancia clínica de este tipo de tratamientos, en el presente trabajo se ha dedicado un apartado especial para su estudio.

Los resultados expuestos anteriormente indican que, tanto los niveles de IgG₄ total como los de IgG₄ específica aumentan significativamente durante la IT. Para completar con detalle estos datos, se analizó la variación experimentada por los niveles de IgG₄ total y específica con el tiempo y su posible correlación durante un tratamiento de hiposensibilización. Para ello, se cuantificó el contenido de IgG₄ total y específico a lo largo de un tratamiento de IT de 2 años y medio en un grupo de 56 pacientes alérgicos a *Phleum pratense* (el tratamiento fue realizado por el Dr. Fernández de Corrés, Hospital Santiago Apóstol, Vitoria). La Figura 4.9 muestra la evolución en los niveles medios de IgG₄ específica a lo largo del tratamiento.

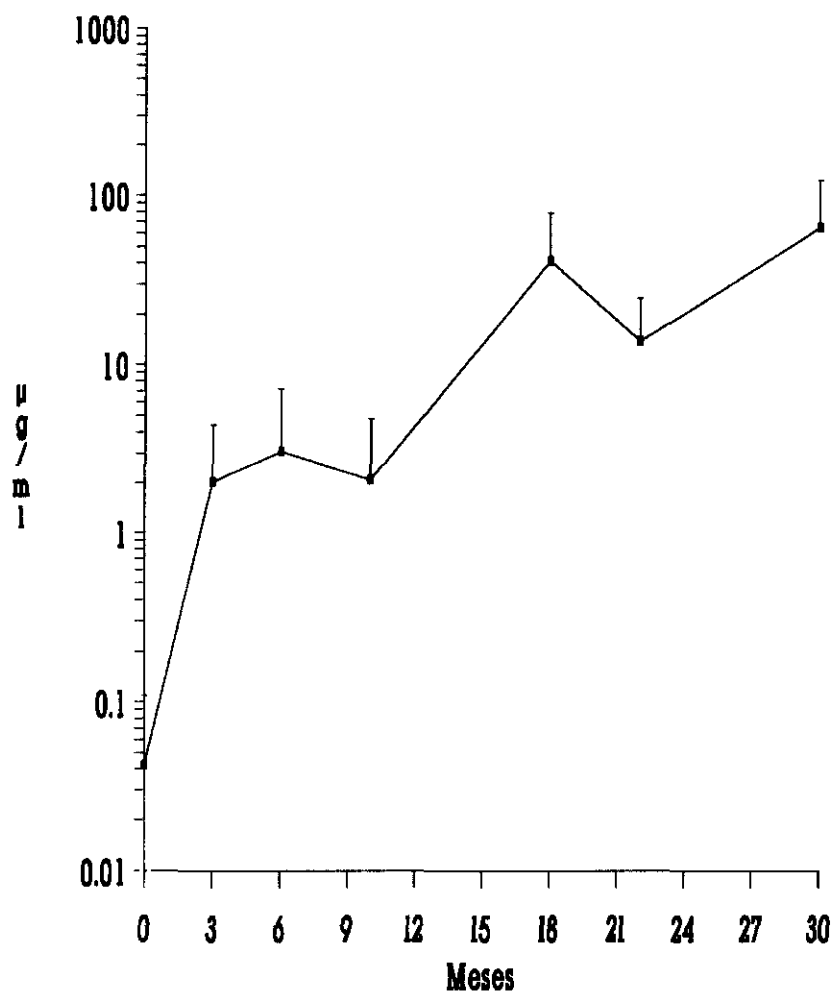


Tabla 4.9. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE IgG₄ ESPECÍFICA DURANTE LA IT. En el gráfico se representa la $X \pm DS$ de IgG₄ específica a *Phleum pratense* en µg/ml en escala logarítmica en diferentes intervalos de tiempo del tratamiento.

Al comienzo de la terapia, se produjo una respuesta inmediata de IgG₄ específica, manifestándose en un aumento muy acusado en sus niveles coincidiendo con el momento en que se alcanzó la dosis de mantenimiento del tratamiento. Sin embargo, hasta el primer año, la IgG₄ específica no llegó a alcanzar concentraciones elevadas. Pasado este período, se produjo un segundo incremento, detectándose anticuerpos específicos de IgG₄ en concentraciones superiores en algunos casos a 200 µg/ml, concentraciones que se mantuvieron elevadas incluso después de finalizar la IT.

Por el contrario, debido a la gran variabilidad en el comportamiento sérico de los niveles de IgG₄ total, no se pudo establecer un patrón común de respuesta durante la hiposensibilización. En la Figura 4.10 se representa la variación en los niveles de IgG₄ total y específica en 4 pacientes individuales representativos del comportamiento de ambas respuestas de IgG₄. Como ya se ha indicado, la

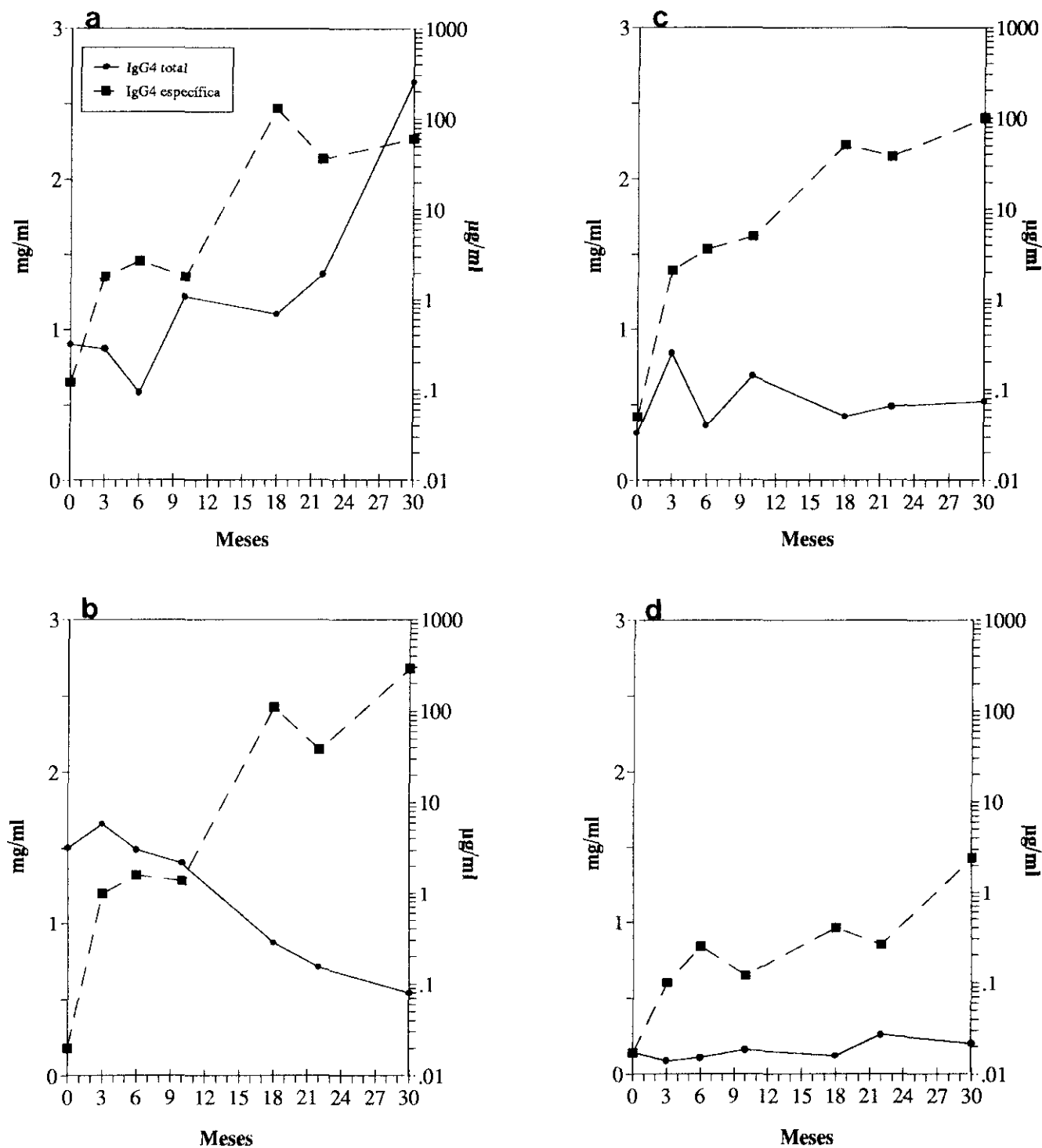


Figura 4.10. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE IgG₄ TOTAL Y ESPECIFICA DURANTE LA IT. En cada gráfico se representan las concentraciones de IgG₄ específica a *Phleum pratense* en el eje derecho en µg/ml y a escala logarítmica (■) y los de IgG₄ total en el izquierdo en mg/ml (●) de cada paciente.

respuesta de IgG₄ específica siguió un perfil común en todos los pacientes diferenciándose sólo a nivel cuantitativo. Sin embargo, los cambios producidos en la respuesta de IgG₄ total fueron muy variables: algunos pacientes experimentaron un incremento de la concentración de IgG₄ total (gráfico a), en algún caso se produjo una disminución en el contenido total de esta subclase (gráfico b) y finalmente, algunos pacientes no experimentaron variaciones significativas (gráficos c y d). Tras este análisis, no se pudo concluir que ambas respuestas fueran paralelas a lo largo del tratamiento. Sin embargo, fue posible establecer una correlación significativa (Coeficiente de correlación de Pearson, $r = 0.47415$, $p < 0.01$) entre la presencia de anticuerpos específicos de IgG₄ después del primer año o al final del tratamiento y el contenido inicial de IgG₄ total. Esto quiere decir que el grupo de pacientes que respondieron a la IT con altas concentraciones de IgG₄ específica se caracterizaron por tener, antes de iniciar el tratamiento, unos niveles de IgG₄ total elevados.

Además de valorar el comportamiento sérico de la IgG₄ específica frente al extracto alergénico completo durante los tratamientos de hiposensibilización, se analizó su papel como anticuerpo bloqueante, determinando el patrón de reconocimiento antigénico frente a los diferentes componentes de los extractos alergénicos utilizados en IT. Este aspecto es importante porque este tipo de extractos se caracterizan por ser, en la mayoría de los casos, mezclas complejas de proteínas de las que solo algunas tienen actividad alergénica y se ha sugerido (Van Der Zee y col., 1988) que los anticuerpos IgG₄ se producen, al igual que los IgG₁, frente a la mayor parte de los componentes, independientemente de que sean o no alergénicos. Si esto es así, disminuiría la capacidad de neutralización de la IgG₄, ya que para que un anticuerpo bloqueante sea eficaz debe estar dirigido contra los mismos determinantes, o al menos contra determinantes de la misma molécula, que los anticuerpos IgE. Para llevar a cabo este análisis, se eligió una IT con epitelio de gato cuyo extracto está bien caracterizado bioquímicamente (Duffort y col., 1988). El estudio se realizó en un grupo de pacientes alérgicos a gato cuyo tratamiento fue llevado a cabo por el Dr. Cuesta, Hospital Ramón y Cajal (Cuesta, 1989), determinándose antes, durante y al final de la IT, la respuesta de IgE, IgG₁ e IgG₄ frente a dos componentes del extracto, albúmina de gato y *Fel d I*. La albúmina de gato es un componente mayoritario del extracto (40%), que se caracteriza por ser una proteína de alto peso molecular y de baja alergeneicidad, ya que hasta ahora estaba descrito que muy pocos pacientes desarrollaban IgE específica frente a este componente. Por el contrario, el otro componente analizado, *Fel d I* es minoritario en el extracto (1%). Sin embargo, es el principal alérgeno ya que más del 80% de los individuos alérgicos a gato poseen IgE específica frente a este componente (Duffort y col., 1991). Los resultados de este experimento aparecen en la Tabla 4.12.

IgG₄ ESPECIFICA

PACIENTE	Albúmina de gato			<i>Fel d I</i>		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	1	1	3	1	15	14
2	0.5	0.5	3	0	1.1	2.4
3	2.8	41.5	6.7	0.8	2.1	4.4
4	0	0.3	1	0.9	6.4	14
5	0	0.4	2	1.2	22	28
6	0.1	11	8	0.2	17	35
7	0.4	16	9	0.2	12	8
8	0.5	1	1	0.5	1	1
9	0	0.5	1	0	3	5
10	0	0	0.5	0	10	16
11	0	0	0.9	0.5	5	2
12	0	0.2	0.2	0	4	5
13	0	0.5	-	0.2	11	-
14	0.2	-	1	0.2	-	2

IgE ESPECIFICA

PACIENTE	Albúmina de gato			<i>Fel d I</i>		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	0.3	0.4	0.3	1.3	1.7	0.9
2	0.2	0.2	0.2	0.9	3.9	2.1
3	>50	>50	>50	>50	>50	>50
4	0.2	0.3	0.4	7.1	8.7	5
5	0.2	0.3	0.8	20	2.8	2.1
6	>50	>50	>50	>50	>50	>50
7	9.9	1.8	2	2.4	5	2.5
8	22	5	5	14	20	14
9	0.2	0.3	0.6	5.6	20	10
10	0.2	0.3	0.2	11	6.8	4
11	0.2	0.3	0.2	0.4	0.9	0.3
12	0.2	0.3	0.3	14	8.5	8.3
13	0.2	0.2	-	5	21	-
14	1	-	0.5	>50	-	>50

PACIENTE	IgG ₁ ESPECIFICA					
	Albúmina de gato			<i>Fel d I</i>		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	3	8	10	2	20	4
2	6	11	10	2	17	7
3	15	23	16	3	15	5
4	1	2	2	2	4	3
5	2	20	15	4	25	3
6	7	28	13	4	24	4
7	11	27	24	4	9	3
8	9	21	13	7	15	14
9	2	18	29	2	23	3
10	2	5	7	1	16	5
11	3	2	4	1	7	2
12	2	5	8	1	16	3
13	1	6	-	2	13	-
14	2	-	5	2	-	5

Tabla 4.12. NIVELES DE IgG₄, IgG₁ E IgE ESPECIFICAS DURANTE LA IT (EPITELIO DE GATO). En la tabla se representan los valores de IgG₄ específica en µg/ml (Métodos 3.11.2) y de IgG₁ e IgE específicas en unidades relativas (Métodos 3.12) durante una IT con epitelio de gato. T0, T1 y T2 indican el tiempo antes de iniciar el tratamiento, durante y al final del tratamiento respectivamente. (-) indica falta de muestra. Los valores expresados en negrita indican los pacientes con IgE e IgG₄ específica de albúmina de gato muy elevada.

Aunque la comparación de los datos sólo sea cualitativa, puesto que los valores de cada inmunoglobulina están expresados en diferentes tipos de unidades (Métodos 3.11 y 3.12), se pueden extraer algunos datos de interés. Así, aunque en la mayoría de los pacientes los anticuerpos IgE específicos que poseían estaban dirigidos frente al alérgeno mayoritario, *Fel d I*, un 28% de ellos (que en la tabla se corresponden con los marcados en negrita) presentó también niveles comparables de IgE específica de albúmina. Estos datos parecen contradecir en parte los anteriormente mencionados, así como otros previamente publicados (Van Metre y col., 1988) en los que el número de pacientes alérgicos con IgE específica a albúmina de gato, no superaba el 10%. Esto indicaría que este componente parece tener más importancia como alérgeno de lo que hasta ahora se había considerado. Por otro lado, si comparamos la respuesta de IgG₁ frente a los dos componentes, se puede

observar que antes de iniciar el tratamiento, en la mayoría de los pacientes se detectaron anticuerpos IgG₁ específicos fundamentalmente frente albúmina, que se incrementaron y permanecieron elevados al final del tratamiento. Sin embargo, los niveles de IgG₁ específica frente a *Fel d I* después de experimentar un aumento, disminuyeron al final del tratamiento hasta los valores iniciales.

Por el contrario, en muy pocos pacientes se detectaron valores significativos de IgG₄ específica frente ambos componentes del extracto antes de la IT y el desarrollo de la respuesta específica de IgG₄ frente a albúmina prácticamente fue indetectable, a excepción del grupo de pacientes caracterizado precisamente, por su alto contenido en IgE específica de este componente. La evolución de los niveles de IgG₄ específicos de *Fel d I* sin embargo, se caracterizó por un aumento significativo durante el tratamiento. Estos resultados indican que la respuesta de IgG₄ es selectiva y está dirigida frente a los mismos componentes alergénicos del extracto que la IgE, existiendo por tanto, una clara diferencia en el comportamiento de ambas subclases de IgG durante los tratamientos de hiposensibilización.

4.4. ESTUDIOS DE LIBERACION DE MEDIADORES INDUCIDA POR IgG₄

Para abordar el tema sobre el papel de la IgG₄ como anticuerpo anafilático, se ha investigado su capacidad para mediar el proceso de liberación de histamina (LH) de basófilos humanos tanto en individuos atópicos como en no atópicos, comparándola además con la liberación mediada por la IgE. Para estos estudios se utilizaron, como agentes desencadenantes del proceso, el AcM anti-IgE 3H5 previamente obtenido en nuestro laboratorio (Moscoso del Prado y col., 1991) y los AcM anti-IgG₄. También se determinó la posible participación de la IgG₄ en la liberación de mediadores celulares no preformados y finalmente, se investigó su presencia en la membrana celular del basófilo mediante estudios de inmunofluorescencia.

4.4.1. Inducción de liberación de histamina por los anticuerpos monoclonales anti-IgG₄

Se estudió la LH producida en un grupo de 27 donantes (12 atópicos y 15 no atópicos) como consecuencia de la estimulación con los AcM mencionados. Para ello, se llevó a cabo un experimento en el que determinamos la cantidad de histamina liberada, determinada por RIA (Métodos 3.13.1), después de incubar una muestra de sangre de cada individuo con los anticuerpos anti-IgG₄ a las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 mg/ml y con el anticuerpo anti-IgE a 10 µg/ml (concentración elegida como óptima en experimentos previos). Los resultados, que se muestran en la Tabla 4.13, representan los porcentajes liberados sobre el total de histamina de cada muestra, variando la liberación espontánea entre un 0.1 y un 2.5% del total. Como porcentajes de LH significativos, se consideran aquellos con valores superiores al 5%, que representa el doble del valor de liberación espontánea máximo obtenido. En la tabla se muestran únicamente los resultados obtenidos con el AcM anti-IgG₄Fc G4T.9, pero se obtuvieron resultados equivalentes con los otros AcM anti-Fc, así como con el AcM comercial SK-44 también específico de Fc.

Aunque la magnitud y la respuesta óptima varían según los individuos, los resultados muestran inequívocamente que el AcM anti-Fab (G4T.2) fue capaz de provocar LH en el 59%, 93% y 85% de los donantes a las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mg/ml respectivamente. Sin embargo, no se pudo detectar liberación significativa en ninguno de los 27 individuos después de la incubación con el AcM anti-Fc (G4T.9) en las mismas condiciones (Tabla 4.13) o después de la incubación con AcM anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-IgG₃, anti-IgM o anti-IgA (resultados no mostrados). Por otro lado, el AcM anti-IgE indujo LH sólo en una parte de la población, concretamente en el 63% de los donantes.

DONANTES	ANTI-IgG ₄ (Fab)			ANTI-IgG ₄ (Fc)			ANTI-IgE
	<u>1</u>	<u>0.1</u>	<u>0.01</u>	<u>1</u>	<u>0.1</u>	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>
No atópicos							
JM	60	60	35	5	3	2	29
ML	50	38	19	1	1	1	21
FP	68	52	7	3	1	1	2
TM	48	48	6	2	1	1	6
PV	15	12	2	2	1	1	1
RG	40	18	3	3	1	1	2
LJ	53	33	5	2	1	1	2
IC	30	22	3	2	1	1	3
CC	3	3	2	2	1	1	2
LD	40	50	8	3	2	2	4
AC	45	40	8	5	3	3	6
RS	40	40	20	3	1	1	11
MV	5	10	3	1	1	1	2
MM	70	70	10	3	2	2	13
CV	60	63	25	4	2	1	15
Atópicos							
CA	5	5	2	5	2	2	7
JR	10	10	6	3	1	1	5
PC	4	12	2	2	2	1	6
RA	70	65	40	3	3	2	26
CB	37	45	10	2	1	1	7
DB	40	41	7	1	2	1	11
JL	28	30	4	2	1	1	9
JM	29	28	5	3	2	2	11
CG	38	40	8	3	1	1	9
MG	80	60	20	3	2	2	15
AJ	10	25	7	2	1	1	3
CC	60	64	4	1	1	1	28

Tabla 4.13. LIBERACION DE HISTAMINA INDUCIDA POR DIFERENTES AcM. Los valores de LH que se muestran representan el porcentaje liberado sobre el total de histamina de cada muestra. La LH espontánea varió en los diferentes individuos entre 0.1 y 2.5%. Las concentraciones de los anticuerpos se expresan en mg/ml.

4.4.2. Comparación de las respuestas de LH mediadas por IgG₄ e IgE

Los resultados de la Tabla 4.13 parecen indicar que la respuesta inducida por IgG₄ es más eficiente en términos de histamina liberada puesto que, a diferencia del AcM anti-IgE que sólo provocó liberaciones de hasta un 28%, los porcentajes de liberación de histamina inducidos por el AcM anti-Fab en algunos casos fueron cercanos al 100%. También parece más eficiente en el porcentaje de liberadores (93%

frente a 63%). En relación con este dato, los resultados también indican que la habilidad del anti-IgG₄Fab para desencadenar el proceso de LH es independiente del estado clínico de los individuos, ya que el número de liberadores en el grupo de atópicos fue similar al de no atópicos, 92% frente a 93% respectivamente. Por el contrario, hay una diferencia muy importante, aunque no estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher, p=0.11), en el comportamiento de los dos grupos frente al estímulo del anti-IgE. Así, mientras que el 83% de los atópicos liberaron histamina tras la inducción con el anti-IgE, sólo el 47% de los no atópicos lo hicieron. Sin embargo, la IgG₄ parece menos eficiente en relación con la concentración de anticuerpo necesaria para causar una LH significativa, como se observa en los datos de la Tabla 4.13, lo que estaría de acuerdo con los datos publicados sobre LH inducida por anticuerpos anti-IgG (Ishizaka y col., 1972). Para comparar la eficiencia de ambos anticuerpos, anti-IgG₄Fab y anti-IgE, se eligieron tres individuos con diferentes sensibilidades frente a ambos estímulos. La sangre de estos donantes se incubó con 6 concentraciones diferentes (desde 100 hasta 0.0001 µg/ml) de los dos AcM. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 4.14, indican que en todos los casos, fueron necesarias concentraciones mayores del anti-IgG₄Fab para inducir liberaciones significativas. Aún considerando las diferentes afinidades de ambos anticuerpos (K_{af} del anti-Fab= 2.1 x 10⁸ M⁻¹, K_{af} del anti-IgE= 2.8 x 10⁹ M⁻¹), parece claro la necesidad de emplear el anticuerpo anti-IgG₄ a una concentración entre uno y dos órdenes de magnitud superior a la del anti-IgE.

MUESTRAS	ANTI-IgG ₄ (Fab) [µg/ml]						ANTI-IgE [µg/ml]					
	100	10	1	0.1	0.01	0.001	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
JM	52	18	2	1	1	1	20	20	14	14	6	12
RG	20	2	1	1	1	1	18	22	10	2	2	7
PV	11	3	1	2	1	2	3	1	1	2	2	2

Tabla 4.14. SENSIBILIDAD A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS AcM ANTI-IgG₄ (Fab) Y ANTI-IgE. Las células de 3 individuos diferentes se estimularon con diferentes concentraciones de los AcM anti-IgG₄(Fab) y anti-IgE. Los valores indican el porcentaje de histamina liberada en cada caso.

Finalmente, se estudió si la LH mediada por IgG₄ es dependiente de iones Ca²⁺. Se sabe que la LH estimulada por anticuerpos anti-IgE es totalmente dependiente de la presencia de calcio. De igual forma, se encontró que la adición de 10 mM EDTA como agente quelante de Ca²⁺ en el tampón de liberación inhibe completamente la inducción de LH por el AcM anti-IgG₄Fab. Esto demuestra que la LH mediada por IgG₄ también es dependiente de calcio.

4.4.3. Efecto del empleo de un 2º anticuerpo anti-IgG de ratón sobre la liberación de histamina inducida por los AcM anti-IgG₄

La incapacidad del AcM anti-Fc para desencadenar el proceso de LH, a diferencia del anti-Fab, no puede explicarse en términos de diferencia en Kaf, puesto que el AcM anti-Fc posee una Kaf de un orden de magnitud superior a la del anti-Fab (Resultados 4.1.2.1), sino que más bien parece estar relacionado con las respectivas especificidades de ambos AcM. En este sentido, aunque hasta ahora no se sabe nada sobre el mecanismo mediante el cual los Ac anti-IgG₄ podrían inducir LH, se podría asumir que éste es similar al de los Ac anti-IgE. Es decir, mediante el puenteo de las moléculas unidas al receptor en el basófilo. Si esto es así, se podría pensar que la razón por la que los AcM anti-IgG₄ Fc no inducen LH es porque son incapaces de llevar a cabo este puenteo. Por otro lado y en contraposición con esta teoría, podría ocurrir que el AcM anti-Fc no se uniera a la molécula de IgG₄ fijada a la membrana del basófilo porque estuviera reconociendo un epítipo enmascarado por la unión a la célula. Para investigar estas dos posibilidades, se llevó a cabo un experimento de LH en el que después de la incubación con los AcM anti-IgG₄ se realizó otra incubación adicional con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (GAM, Métodos 3.13.1) (Tabla 4.15).

ANTICUERPOS		MUESTRAS				
		PV	CA	ML	JM	LJ
Anti-IgG ₄ (Fab) ^a	1	12	5	45	50	50
	0.1	4	5	30	50	30
Anti-IgG ₄ (Fab)+GAM ^b	1	19	5	50	50	50
	0.1	10	5	40	50	50
Anti-IgG ₄ (Fc) ^a	1	2	5	2	4	3
	0.1	1	2	1	3	3
Anti-IgG ₄ (Fc)+GAM ^b	1	2	4	2	4	3
	0.1	1	4	2	3	2
Anti-IgE ^a	0.01	ND	ND	ND	27	8
Anti-IgE+GAM ^b	0.01	ND	ND	ND	25	27

Tabla 4.15.-LIBERACION DE HISTAMINA POR LOS AcM ANTI-IgG₄ TRAS LA ADICION DE UN SEGUNDO ANTICUERPO. Los valores represntan el porcentaje de LH después de la incubación con los AcM anti-IgG₄ a las concentraciones de 1 y 0.1 mg/ml (a) y la histamina liberada adicional después de incubar con el GAM a 25 µg/ml (b). La liberación espontánea varió entre 0.5 y 2%.

De esta forma, si los AcM se unen a la IgG₄ fijada a la membrana, la adición de un segundo anticuerpo debería favorecer el proceso de puenteo de los receptores, provocando liberación de histamina. La incubación con este segundo anticuerpo provocó una nueva LH cuando las células habían sido previamente incubadas con el AcM anti-IgG₄Fab, pero por el contrario, no tuvo ningún efecto si la incubación se realizó con el AcM anti-Fc (Tabla 4.15). Estos resultados indican en primer lugar, que el epítipo reconocido por el AcM anti-Fc no está accesible en la IgG₄ de la superficie del basófilo y por otro, representan una evidencia de que el mecanismo por el que los anticuerpos anti-IgG₄ inducen liberación reside en el “cross-linking” o puenteo de las moléculas de IgG₄ unidas a la membrana celular, ya que la adición de GAM produce una mayor liberación.

4.4.4. Efecto del D₂O sobre la inducción de liberación de histamina por los anticuerpos monoclonales

Está descrito que los basófilos humanos aumentan su respuesta de liberación de histamina en presencia de óxido de deuterio (D₂O) en el tampón de liberación (Gillespie y col., 1972), de tal forma, que algunos no liberadores pasan a ser liberadores. Asimismo, como se indicó en la Introducción, la mayoría de los experimentos de inducción de LH con anticuerpos anti-IgG₄ se han llevado a cabo en presencia de D₂O, aunque sin comparar los resultados obtenidos con controles en su ausencia. Por esta razón y para investigar si el AcM anti-Fc podría inducir LH en presencia de D₂O, se analizó el efecto de este agente sobre la liberación de histamina inducida por los AcM anti-IgG₄ y anti-IgE (Tabla 4.16).

El experimento se realizó determinando la cantidad de histamina liberada en un grupo de 5 individuos con diferentes niveles de respuesta frente a los AcM anti-Fab y anti-IgE, después de la incubación con los AcM mencionados y el AcM anti-Fc en presencia del 40% de D₂O. En la Tabla 4.16 se indican los resultados obtenidos, representando los valores los porcentajes de liberación después de sustraerles la liberación espontánea, que en presencia de D₂O alcanza valores más elevados (2-10%). Estos datos indican que la presencia de D₂O produjo en la mayoría de las muestras estudiadas un incremento en el respuesta de liberación cuando se incubaron con los AcM anti-Fab y anti-IgE, pero que en el caso del AcM anti-IgG₄Fc, permanecieron sin responder a este estímulo.

MUESTRAS		ANTI-IgG ₄ (Fab)			ANTI-IgG ₄ (Fc)			ANTI-IgE
		100	10	1	100	10	1	10
LJ	-D ₂ O	28	6	1	2	1	1	8
	+D ₂ O	67	49	11	2	2	2	37
RG	-D ₂ O	18	3	2	2	2	1	3
	+D ₂ O	32	18	4	3	2	2	24
PV	-D ₂ O	9	5	1	2	1	1	1
	+D ₂ O	17	5	2	3	1	1	1
CA	-D ₂ O	2	2	1	2	2	1	5
	+D ₂ O	2	1	1	2	2	2	7

TABLA 4.16. EFECTO DEL D₂O EN LA LIBERACION DE HISTAMINA INDUCIDA POR LOS AcM ANTI-IgG₄ Y ANTI-IgE. El D₂O se incluyó en el tampón de liberación a una concentración final del 40%. A los valores representados se les ha sustraído la LH espontánea (2-10%). Las concentraciones de los anticuerpos se expresan en µg/ml.

4.4.5. Inducción de liberación de leucotrieno C₄ por IgG₄

Cuando se produce el “cross-linking” de los receptores de IgE bien por la acción de un anticuerpo anti-IgE, o bien por un alérgeno se desencadenan una serie de reacciones encaminadas a la liberación de mediadores de la respuesta alérgica. Dentro de estos mediadores, un grupo de ellos ya están preformados y almacenados en gránulos de secreción del basófilo o mastocito, como por ejemplo, la histamina o la serotonina, pero también hay otro grupo de mediadores que se generan como consecuencia de la activación. Estos mediadores no preformados se sintetizan a partir del ácido araquidónico y son las prostaglandinas y los leucotrienos. Todo este proceso, como ya se mencionó, es dependiente de calcio.

En este trabajo, se ha demostrado que el AcM anti-IgG₄ Fab es capaz de inducir liberación de histamina y que esta liberación es dependiente de Ca²⁺. Para completar el estudio, sería necesario comprobar si la LH que se produce va acompañada también de la liberación de mediadores no preformados. Para ello, se escogió como marcador de este tipo de mediadores al leucotrieno C₄ (LTC₄). El experimento se realizó determinando la liberación de LTC₄ producida en 3 muestras de donantes diferentes tras la incubación con el AcM anti-Fab como se indica en Métodos 3.13.2 (Tabla 4.17).

<u>MUESTRAS</u>	<u>MEDIADORES LIBERADOS</u>	
	<u>Histamina^(a)</u>	<u>Leucotrieno C₄^(b)</u>
JM	60	105
LJ	40	56
CA	5	28

Tabla 4.17. LIBERACION DE HISTAMINA Y LEUCOTRIENO C₄ INDUCIDA POR EL AcM ANTI-IgG₄(Fab). La concentración del anti-IgG₄(Fab) utilizada fue 1 mg/ml. (a) LH expresada en porcentaje y (b) los valores indican los picogramos de LTC₄ liberado por cada 10⁶ células (Métodos 3.13.2).

Los datos de la Tabla 4.17 que representan por una lado, los porcentajes de histamina liberada y por otro, los picogramos de LTC₄ liberados, indican que también la IgG₄, al igual que la IgE, está implicada en la liberación de este tipo de mediadores no preformados en el basófilo.

4.4.6. Presencia de la IgG₄ en la membrana del basófilo

Los resultados hasta ahora presentados sugieren que la IgG₄ participa en la liberación de mediadores de los basófilos ya que el AcM anti-IgG₄Fab es capaz de inducir este proceso. Sin embargo, hemos visto que los AcM anti-IgG₄Fc son incapaces de desencadenar la liberación. Para confirmar estos resultados, y obtener además evidencia directa de la presencia de IgG₄ en la membrana del basófilo, se realizó un estudio de inmunofluorescencia con leucocitos de algunos donantes tratados con los dos AcM anti-IgG₄ y con un segundo Ac anti-IgG de ratón (GAM) marcado con fluoresceína.

Después de purificar los leucocitos como se indica en Métodos 3.14.1, se fijaron y tiñeron con una tinción específica de basófilos y se incubaron, primero con el AcM anti-IgG₄ y después con el GAM previamente marcado con fluoresceína. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 4.11 .

En la foto (a) vemos un grupo celular en el que la flecha señala un basófilo teñido. En la foto (b) se observa el mismo grupo celular, pero esta vez bajo la luz ultravioleta apropiada, señalando la flecha en este caso, la fluorescencia específica del basófilo obtenida después de la incubación con el anti-IgG₄Fab. Por el contrario, no se detectó fluorescencia cuando las células fueron incubadas con el AcM anti-IgG₄Fc.

Estos resultados suponen la primera evidencia clara que demuestra que la IgG₄ se une a la membrana del basófilo y por tanto, que existe un receptor específico para esta inmunoglobulina. Además, suponen una evidencia adicional de que el epítipo reconocido por los AcM anti-IgG₄ Fc permanece inaccesible en las moléculas de IgG₄ presentes en el basófilo.

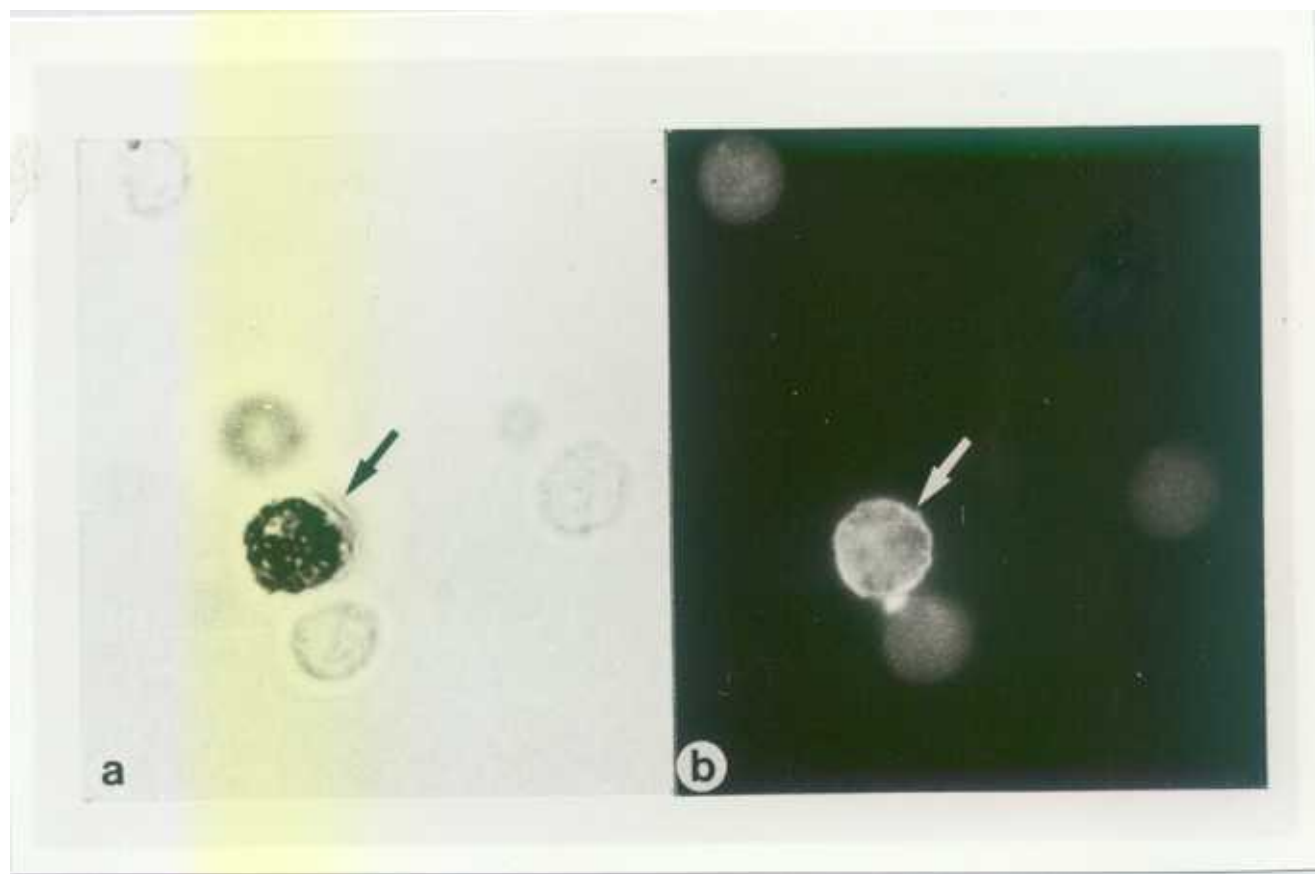


Figura 4.10. INMUNODETECCION DE IgG₄ EN BASOFILOS POR FLUORESCENCIA. En (a) se presenta la fotografía de los leucocitos humanos teñidos con azul de toluidina y la flecha señala a un basófilo teñido. En (b) se representa la misma fotografía pero bajo las condiciones apropiadas de luz UV, indicando la flecha la fluorescencia específica del basófilo.

5. DISCUSSION

5.1. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para estudiar el comportamiento biológico de la IgG₄, es necesario disponer de reactivos específicos y bien definidos que permitan determinar su actividad funcional.

En los primeros estudios descritos en la literatura, se utilizaron anticuerpos policlonales como reactivos para el estudio de las diferentes clases de inmunoglobulinas, aunque su preparación resultaba difícil y su especificidad dudosa. Con la introducción de la tecnología de obtención de AcM se pudieron obviar estos problemas y producir reactivos de alta especificidad. Sin embargo, aunque la enorme versatilidad del sistema inmune hace teóricamente posible obtener anticuerpos específicos frente a cualquier estructura, en la práctica, es corriente que durante la respuesta inmune se produzcan anticuerpos frente a un número limitado de epítopos, siendo difícil la obtención de aquellos dirigidos frente a determinantes débilmente antígenicos o minoritarios. Precisamente, la obtención de AcM específicos frente a las diferentes subclases de IgG humana, plantea esta dificultad debido a su alto grado de homología (95%), que implica unas diferencias antigénicas muy poco pronunciadas. Este problema es posible obviarlo mediante el empleo de diferentes tipos de estrategias de inmunización que vayan encaminadas a favorecer una determinada especificidad y a suprimir la respuesta frente a los epítopos dominantes comunes a todas ellas.

Para obtener AcM específicos de IgG₄, inicialmente se siguió un protocolo de inmunización convencional con paraproteínas humanas de isotipo G₄. Como resultado, sólo el 30% de los AcM obtenidos tenían una especificidad restringida a la IgG₄, siendo la mayoría de los anticuerpos específicos de epítopos compartidos por las 4 subclases de IgG. Este resultado sugiere que los determinantes antigénicos específicos de la IgG₄ son débilmente inmunogénicos. Con objeto de aumentar la frecuencia de AcM de especificidad restringida a IgG₄ y descubrir determinantes poco inmunogénicos, se decidió intentar suprimir, o al menos reducir, de forma selectiva la respuesta dominante del ratón frente a epítopos comunes de clase mediante una estrategia de tolerización.

Se sabe que en diferentes especies animales es posible inducir tolerancia frente a toda clase de antígenos, tanto durante el período neonatal como adulto (Stocker y Nossal, 1976). Aunque los mecanismos exactos por los que este fenómeno se produce no se conocen con precisión, el resultado en la práctica es la reducción y en algunos casos, la supresión de la reactividad del sistema inmune frente al Ag utilizado en la inducción de la tolerancia. Utilizando esta estrategia, se ha descrito la obtención de AcM frente a diferentes tipos de Ag minoritarios (Golumbeski y Dimond, 1986) así como de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a las subclases de IgG (Michalsen y Haug, 1985; Lowe y col., 1982) aunque con

diferentes resultados. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo se intentó un 2º experimento de fusión utilizando ratones que habían sido sometidos a un tratamiento de tolerización neonatal mediante inyecciones de una mezcla de paraproteínas de isotipo G_1 , G_2 y G_3 (Tabla 4.2). En este caso y contrastando significativamente con los resultados iniciales, el 85 % de los hibridomas obtenidos fueron específicos de IgG_4 , demostrando la validez y efectividad de esta técnica.

Asimismo, la importancia de la influencia ejercida por este cambio en el esquema de inmunización sobre los resultados se ve confirmada tras la caracterización de los AcM. A diferencia de la fusión I, donde los anticuerpos producidos fueron específicos de un único epítipo localizado en la región Fc de la molécula, en la fusión II, se obtuvo además un AcM específico de la región Fab (Figura 4.2). Este hecho supone un gran avance en la tecnología de los AcM anti- IgG_4 , así como en el estudio de esta Ig, debido a que se trata de un AcM que reconoce un epítipo menor en la molécula de IgG_4 , que hasta ahora no había sido descrito. Aunque existen algunos AcM anti- IgG_4 específicos de Fab, estos reconocen a otras subclases de IgG (como más adelante se detallará). Por esta razón, se considera que el AcM G4T.2 obtenido en este trabajo es el primero descrito en la bibliografía como anti-Fab. Estos resultados sugieren que la tolerización no sólo ha sido efectiva para favorecer el desarrollo de una respuesta inmune frente a los determinantes antigénicos exclusivos de IgG_4 , sino que dentro de estos, ha permitido el desarrollo de anticuerpos frente a epítopos menos inmunogénicos. Por otra parte, este tratamiento no ha ido en detrimento de la afinidad de los anticuerpos como se puede observar en la Tabla 4.3.

A la hora de caracterizar un panel de AcM frente a un determinado Ag hay que tener en cuenta dos aspectos fundamentales. Por un lado, hay que asegurarse de la falta absoluta de reactividad frente a otros Ag de estructura parecida (en nuestro caso frente a otras inmunoglobulinas). Por otro, hay que comprobar también si los AcM exhiben algún tipo de restricción frente a los diferentes ensayos en los que se van a utilizar. Existe un estudio multicéntrico organizado por la Unión de Sociedades Inmunológicas y la OMS que ha llevado a cabo la evaluación detallada de los AcM anti subclase de IgG descritos en la literatura (Jefferis y col., 1985). Si se comparan estos AcM con los 5 descritos en este trabajo, se encuentran algunas diferencias fundamentales que resaltan la importancia de los obtenidos en nuestro laboratorio.

De los 23 AcM específicos de IgG_4 publicados, sólo 3 están dirigidos frente a la región Fab y se caracterizan porque presentan reactividad cruzada con algunas paraproteínas de IgG_3 y porque exhiben una gran restricción de ensayo, de tal forma que estos AcM parecen ser especialmente vulnerables durante los procesos de adsorción o acoplamiento a diferentes tipos de superficies. En un principio,

se sugirió que este epítipo debía ser el producido por el residuo Lys 196 que es el único específico en el dominio C_H1 de la molécula de IgG₄, aunque como los tres monoclonales presentan diferente actividad, se pensó que podrían existir otros determinantes en esta región. De hecho, el AcM anti-Fab obtenido en este trabajo, G4T.2, que se diferencia acusadamente de los tres descritos anteriormente. Se trata de un AcM totalmente específico de IgG₄ (Tabla 4.2) y además, es capaz de reconocerla tanto inmobilizado en una fase sólida como en solución. Estas características podrían estar sugiriendo que este AcM G4T.2 estaría definiendo un epítipo de características diferentes apoyando la idea de que en la región Fab de la molécula de IgG₄ se expresa más de un epítipo específico.

Finalmente y en cuanto a los AcM anti-Fc publicados, algunos no son activos en los ensayos donde tienen que funcionar como anticuerpos de captura unidos a la fase sólida y/o no son capaces de reconocer a la IgG₄ inmobilizada. Los 4 AcM anti-Fc obtenidos en nuestro laboratorio, G4.1, G4T.9, G4T.11 y G4T.12, son capaces sin embargo, de unirse a diferentes paraproteínas de IgG₄ inmobilizadas con gran afinidad y además su reactividad no se ve alterada cuando se utilizan como anticuerpos de captura en ensayos del tipo ELISA y RIA.

5.2. ENSAYOS DE CUANTIFICACION DE IgG₄

La determinación de los niveles de IgG₄, tanto totales como específicos, nos ofrece una información importante en el estudio del comportamiento de esta subclase humana en diferentes patologías. En el presente trabajo se han puesto a punto 2 ELISAS cuantitativos para valorar IgG₄ total y específica aprovechando algunas de las propiedades de los AcM obtenidos como:

- El reconocimiento de 2 epítopos diferentes en la molécula de IgG₄.
- La persistencia de su actividad funcional cuando se les adsorbe a una fase sólida.
- La alta afinidad, especialmente del AcM G4T.9.

5.2.1. Cuantificación de IgG₄ total

Históricamente, los ensayos de valoración de las subclases de IgG estuvieron diseñados en torno a la utilización de anticuerpos policlonales. Actualmente, sin embargo, se han ido sustituyendo estos anticuerpos gracias al desarrollo de la tecnología de los AcM, atendiendo así a la necesidad de disponer de reactivos fáciles de obtener y de ensayos específicos y reproducibles. De todos los métodos descritos, el más utilizado para cuantificar subclases de IgG es el inmunoensayo en fase sólida en sus 2 vertientes de inhibición competitiva y métodos de “captura”.

La mayoría de los investigadores y laboratorios comerciales han decidido utilizar como ensayos para cuantificar IgG_4 precisamente los sistemas inmunoradiométricos no competitivos. Estos ensayos siguen el esquema general que consiste en el empleo de un AcM específico inmovilizado en la fase sólida, bien por adsorción directa al polivinilo o poliestireno, o bien por unión covalente a discos de celulosa previamente activados con BrCN, que “captura” a los Ac IgG_4 presentes en la muestra y que son detectados posteriormente con un anticuerpo específico marcado radiactiva o enzimáticamente. Este tipo de técnica presenta sin embargo hasta ahora, problemas relacionados con la inmovilización del AcM de captura. Ya se comentó en el apartado anterior, que la mayoría de los AcM anti- IgG_4 descritos perdían su actividad funcional en numerosos ensayos y de hecho, sólo 7 de estos AcM pueden utilizarse como anticuerpos de detección y de ellos, sólo 2 para “capturar” al Ag (HP6023 y HP6025) (Reimer y col., 1984), si además tenemos en cuenta que la mayoría reconocen el mismo epítipo en la región Fc de la molécula de IgG_4 , el problema es aún mayor. El abordaje de este problema se ha llevado a cabo hasta estos momentos, empleando estos 2 anticuerpos a los que he hecho referencia (HP6023 y HP6025) inmovilizados en la superficie del plástico (Hussain y col., 1986; Hamilton, 1987) y utilizando como proteínas de detección anticuerpos policlonales anti-IgG humana. Los resultados obtenidos indican que se trata de ensayos de gran precisión (CV del 5%) pero con un rango de trabajo muy limitado (7-50 y 4-75 ng/ml respectivamente). Como intento de solucionar el problema de la inmovilización, Ferrante y col.(1986) puso a punto un método en el que el AcM se inmoviliza mediante la captura de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón previamente unida al plástico, consiguiendo de nuevo un rango de trabajo muy parecido (10-100 ng/ml).

Como alternativa, se han descrito 2 ensayos basados en la inhibición competitiva para valorar IgG_4 . En uno de ellos (Aucouturier y col.,1984), compiten una paraproteína estándar de IgG_4 de concentración conocida con la IgG_4 presente en la muestra por la unión al AcM específico en solución. En el otro (Wilson y col.,1986), la competición es entre una paraproteína de G_4 biotinizada y la IgG_4 del suero en su unión al AcM unido a la fase sólida. Aunque este tipo de métodos exhiben resultados comparables en precisión y sensibilidad a los anteriormente descritos, requieren como desventaja, la disponibilidad de proteínas de IgG_4 totalmente puras y de fácil marcaje. Y además no tienen en cuenta que la unión del AcM a la paraproteína puede ser diferente a la que se produce con otras proteínas de IgG_4 .

Más recientemente, se ha publicado un método (Bui y col., 1988) que supone un avance en el sistema inmunoradiométrico puesto que emplea 2 AcM específicos de IgG_4 que reconocen epítipos diferentes. El límite de detección sin embargo, es bajo, de 100 ng/ml y como desventaja hay que comentar que utiliza

como método de inmovilización la unión covalente a discos de celulosa activados con BrCN.

El ensayo puesto a punto en este trabajo supone un avance en la tecnología de la cuantificación de IgG₄ total. Por un lado, los 2 AcM utilizados, G4T.2 y G4T.9, mantienen su actividad funcional tanto en fase sólida como en solución. Esto ha permitido elegir un método de fácil desarrollo, ya que el AcM cuya función es “capturar” a la IgG₄, se inmoviliza mediante simple adsorción al plástico (poliestireno). De esta forma, se ha conseguido superar el problema de inmovilización que hasta ahora estaba planteado con los ensayos de valoración de IgG₄ total. Por otra parte, permite la cuantificación y estandarización de las determinaciones al disponer de un suero de referencia calibrado en su contenido de IgG₄ frente a la referencia internacional de la OMS, 67/69. Asimismo, el estudio detallado de sus características técnicas, indica que se trata de un ensayo totalmente específico, sin ninguna interferencia con otras subclases de IgG y con una precisión comparable e incluso superior a la de otros descritos con anterioridad (CV intra en interensayo de 4.15% y 6.08% respectivamente). Finalmente, permite el empleo de un amplio rango de trabajo (4-200 ng/ml superior al de los ensayos publicados anteriormente) y posee una gran sensibilidad, de tal forma que cuando se utiliza el AcM G4T.9 biotinizado, el límite de detección está por debajo de 1 ng/ml. Este ensayo por tanto, resulta de gran interés para valorar IgG₄ total, no sólo en aquellas situaciones clínicas que presentan un amplio espectro de concentraciones de esta Ig, como puede ocurrir en las diversas patologías alérgicas. Sino que también, puede ser de gran utilidad en el estudio de enfermedades con niveles de IgG₄ total muy bajos, como en los síndromes de inmunodeficiencias (Introducción 1.4) debido a su gran sensibilidad.

5.2.2. Cuantificación de IgG₄ específica

Como se ha visto, el papel de la IgG₄ en la Alergia es aún controvertido y en este sentido, el estudio del comportamiento de los niveles de los anticuerpos específicos de IgG₄ puede ayudar a clarificarlo. Sin embargo, uno de los problemas que nos encontramos, es la dificultad en comparar los datos obtenidos por los diferentes investigadores debido a la variabilidad en los reactivos y métodos empleados. Básicamente existen 2 tipos de ensayos:

-Ensayos en los que el Ag, en este caso el alérgeno, se utiliza marcado y la reacción Ag-Ac se produce en solución, que fundamentalmente han sido aplicados por el grupo de Aalberse (1983b). Este tipo de métodos asumen arriesgadamente que el Ag marcado mantiene su estabilidad funcional. Además, su principal limitación reside en que su aplicación sólo es adecuada si se dispone del alérgeno purificado y en sistemas de un sólo alérgeno. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se

dispone de mezclas antigénicas complejas y aunque en alguna situación se pueda aislar y purificar un alérgeno, puede tener mayor relevancia clínica determinar la respuesta inmune frente a todos los componentes, tanto en los casos de IT, como en los de exposición natural. Así desde el punto de vista del diagnóstico parece más adecuado el empleo de extractos alérgicos.

-Inmunoensayos en fase sólida de inhibición competitiva o inmunoradiométricos tipo RIA o ELISA (RAST, FAST, Scott, 1988) en los que el Ag o alérgeno se adsorbe directa o indirectamente a una fase sólida.

El ensayo descrito en este trabajo pertenece a este último grupo en el que el alérgeno o los extractos alérgicos utilizados van adsorbidos al plástico. La alta afinidad (4.93×10^9) y especificidad del AcM, G4T.9, junto con el empleo de una preparación calibrada en su contenido en IgG₄ específica, ha servido para poner a punto un ELISA que cumple todos los requisitos de este tipo de ensayos: especificidad, gran sensibilidad y reproductibilidad y fundamentalmente la posibilidad de cuantificar en unidades absolutas (en µg/ml).

Uno de los requerimientos más importantes para valorar IgG₄ específica es la reproductibilidad, sobre todo en los casos de seguimiento de los tratamientos de IT. En este tipo de determinaciones, las muestras que se analizan proceden de diferentes intervalos de tiempo durante el tratamiento, que puede durar varios años, de tal forma que la norma general ha sido siempre recoger las muestras, almacenarlas y ensayarlas al final, todas juntas para poder detectar y comparar las variaciones producidas en los niveles de IgG₄. El método que se ha descrito en este trabajo, permite realizar la valoración de cada muestra independientemente, debido a su excelente precisión interensayo (CV aprox. 10%). Hay que tener en cuenta que este CV está por debajo de las variaciones que ocurren, incluso en periodos cortos de IT (Resultados 4.3.3). Por otro lado, el ensayo tiene una gran sensibilidad (5 ng/ml) y posee un rango efectivo de trabajo de más de 2 órdenes de magnitud, lo que en conjunto, permite cuantificar muestras con un contenido muy variable en IgG₄. Esta propiedad también es importante porque los valores de IgG₄ que podemos encontrar en alergias a alimentos y en IT, como se ha visto en Resultados 4.3 y coincidiendo con otros autores (Aalberse y col., 1983; Layton y Stanworth, 1984), presentan variaciones considerables, siendo necesario disponer de un rango amplio de medida. Según los datos publicados y los resultados obtenidos, la dilución 1:25 de las muestras puede ser utilizada para la cuantificación de la gran mayoría de los sueros y sólo en las muestras procedentes de IT muy prolongadas (50-100 µg/ml) sería necesario ensayarlas más diluídas. Por otra parte, aquellas muestras con valores de IgG₄ específica muy bajos, en algunos casos del orden de ng, pueden ensayarse con precisión diluídas 1:10. Este sería el caso de la mayoría de los pacientes alérgicos no tratados, como hemos demostrado en este trabajo (Resultados 4.3.2).

Otra característica que hay que considerar es que la valoración de IgG_4 específica en este ensayo no se ve afectada por los niveles de la IgG_4 total. Esta falta de interferencia es de gran importancia porque, como hemos podido comprobar la contribución de los anticuerpos IgG_4 específicos de un determinado alérgeno al contenido total de esta inmunoglobulina es muy bajo (Resultados 4.3).

Hasta muy recientemente, la mayoría de los métodos para valorar IgG_4 específica sólo eran semicuantitativos y no permitían la cuantificación absoluta. Precisamente el desarrollo de curvas de referencia calibradas lo que ha constituido el principal avance en la valoración de IgG_4 específica. La obtención de preparaciones estándar calibradas en su contenido de IgG_4 específica se ha conseguido básicamente mediante 3 vías de aproximación, que como era de esperar están sujetas a ciertos errores:

-Las técnicas de análisis de unión del Ag, como el análisis de saturación descrito por Kemeny y col. (1987), que necesitan utilizar el alérgeno marcado y por tanto, pueden resultar de poca utilidad cuando se trata de mezclas antigénicas complejas. Además, este tipo de técnicas realizan dos asunciones arriesgadas:

1.- Una de ellas, es la suposición de que el Ag marcado mantiene su integridad funcional.

2.- La otra, es que considera que el Ac con el que se trabaja es bivalente y en este sentido, hay que tener en consideración que existen evidencias que sugieren la monovalencia de la IgG_4 (Introducción 1.2).

-La Purificación por cromatografía de afinidad de la IgG_4 específica (FAST, Scott, 1988). En este caso, aunque se evitan los problemas anteriores, tiene varias desventajas:

1.- Se trata de un proceso muy laborioso.

2.- Puede llevar a pérdidas de actividad de la Ig impredecibles.

3.- Este tipo de cromatografía conduce a la purificación de anticuerpos de afinidad intermedia lo que probablemente pueda inducir a determinaciones sesgadas, sobre todo en aquellas muestras de suero con anticuerpos de alta afinidad como los que se producen después de largos períodos de IT (Devey y col., 1989).

-Los métodos que utilizan una paraproteína de IgG_4 de concentración conocida como estándar que se acopla a la fase sólida, que asumen que el anticuerpo anti- IgG_4 se une con la misma afinidad a una IgG_4 inmovilizada en una fase sólida que a otra presentada por el antígeno. Y que la cantidad de proteína unida es directamente proporcional a la concentración que hay en solución.

En este trabajo, se ha preparado una curva de referencia mediante un método diferente a los anteriormente descritos (Resultados 4.2.2.1). El contenido de IgG_4 específica de un suero elegido como referencia, se calculó como la diferencia en la concentración de IgG_4 total antes y después de eliminar los anticuerpos IgG_4 específicos mediante un proceso de absorción específica a un extracto de *Phleum pratense*. Este método tiene la ventaja de su simplicidad y de no requerir ni la

purificación de IgG₄, ni la purificación ni el marcaje del Ag. Aunque este método permite utilizar una curva de referencia para cuantificar el contenido de IgG₄ específica en diferentes tipos de sueros y frente a diversos tipos de antígenos, hay que tener en cuenta sin embargo, unas consideraciones. Cuando se mide la concentración de anticuerpos en una muestra de suero, los resultados que se obtienen dependen principalmente de la cantidad de anticuerpos presentes, pero la medida puede verse afectada por las diferencias en afinidad de los anticuerpos y por la naturaleza del antígeno empleado. Esto significa que idealmente, habría que preparar una curva estándar para cada Ag utilizado. Sin embargo, debido a la gran cantidad y a la muy diferente naturaleza de los antígenos que están implicados en Alergia y otro tipo de patologías (parasitosis, etc.), hacen esta afirmación prácticamente inviable, siendo la práctica habitual en el campo de la Alergología el empleo de un único alérgeno como referencia. Para ser exactos y puesto que los resultados obtenidos con diferentes alérgenos pudieran no ser comparables, se propone que los niveles de IgG₄ específica se expresen en unidades, considerando que cada unidad se corresponde con la actividad de 1 µg de IgG₄ específica para *Phleum pratense*. En cualquier caso este sistema descrito permite la cuantificación objetiva y precisa de IgG₄ específica y además, la comparación de datos obtenidos en diferentes estudios y en diferentes laboratorios.

5.3. COMPORTAMIENTO SERICO DE LA IgG₄ EN ALERGIA

Dentro de este apartado, habría que distinguir dos aspectos que son un reflejo de la aparente dualidad de la función de la IgG₄.

1.- Por un lado, la asociación que pueda existir entre la aparición de niveles elevados de IgG₄ total y la presencia de anticuerpos IgG₄ específicos frente a alérgenos, con la sintomatología alérgica. Lo que conduciría a considerar a la IgG₄ como un anticuerpo anafiláctico.

2.- Por otro, el comportamiento de la IgG₄ en los tratamientos de inmunoterapia (IT), con el fin de establecer si ejerce una función protectora como anticuerpo bloqueante.

1.- Una de las primeras evidencias que podrían implicar a la IgG₄ en la Alergia como anticuerpo anafiláctico, proviene de la valoración de sus niveles en diferentes patologías relacionadas con la hipersensibilidad inmediata. En este sentido, algunos autores (Gwyn y col., 1979; Shakib y col., 1977) encontraron que se produce un incremento selectivo de la IgG₄ total circulante en pacientes con asma o eczema atópico. Sin embargo, no siempre se han podido establecer claramente diferencias significativas entre individuos normales y atópicos, haciendo difícil poder llegar a determinar la correlación que pueda existir entre la IgG₄ y la sintomatología alérgica. Probablemente, esto es así en parte, por la baja reproductibilidad de las técnicas

empleadas para su valoración, pero fundamentalmente también, debido a la amplitud de rangos de concentración encontrados tanto en individuos atópicos como no atópicos. En contrapartida, aunque no esté bien establecida la relevancia que pueda tener la presencia de anticuerpos IgG₄ específicos de alérgeno ni en el diagnóstico ni en el tratamiento de enfermedades alérgicas, si parecen existir dos situaciones donde la valoración de IgG₄ específica podría resultar de gran ayuda. Una de ellas, como vamos a ver, es en la alergia alimentaria, sobre todo en los casos donde no se detecta la presencia de anticuerpos IgE aunque existan síntomas alérgicos. El otro es en los tratamientos de hiposensibilización, en los que parece que se produce un aumento significativo en los niveles de IgG₄ específica y se ha sugerido que su valoración puede utilizarse como seguimiento del progreso de la terapia.

En el estudio que se ha realizado en este trabajo, la media de IgG₄ total en los individuos no atópicos obtenida fue de 0.461 mg/ml que es similar a otras previamente publicadas (Wilson y col., 1986). Por otro lado, la media obtenida entre los pacientes atópicos fue ligeramente superior, pero sin que esta diferencia llegara a ser significativa, en contra de los datos publicados por otros autores (Magnusson y col., 1986) existiendo además, un claro solapamiento en los valores de concentración de ambos grupos. Sin embargo, en los pacientes sometidos a IT, aunque los cambios en los niveles de IgG₄ total fueron variables, la media del conjunto experimentó un incremento significativo. Estos resultados parecen indicar que aunque en la mayoría de los paciente atópicos la concentración de IgG₄ sea elevada, debido a la gran variabilidad que exhiben los niveles de esta subclase, resulte difícil establecer la importancia que como diagnóstico pueda tener la determinación de la concentración de IgG₄ total, así como su relevancia clínica como responsable de la sintomatología alérgica.

Parece claro por tanto, que la presencia de niveles elevados de IgG₄ total no es un indicativo del estado atópico del individuo. Sin embargo, el estudio de los niveles de IgG₄ específica frente a los alérgenos analizados en este trabajo (la gramínea *Phleum pratense* y epitelio de gato) si resulta más concluyente y permite establecer las diferencias significativas entre los individuos atópicos y los no atópicos. Así, sólo en 2-3 individuos del grupo control (6-10% frente al 50-67% de los individuos alérgicos) se detectó la presencia de anticuerpos IgG₄ específicos. El significado que estos anticuerpos puedan tener en los pacientes atópicos no está claro. Algunos autores (Halpern y Scott, 1987) han sugerido que estos anticuerpos que se encuentran en niveles muy bajos, en la mayoría de los casos menores de 1 µg/ml, en los individuos atópicos podrían actuar como anticuerpos anafilácticos. Y se diferenciarían de los producidos durante los tratamientos de hiposensibilización cuyos niveles son muy elevados y su efecto podría estar relacionado con un papel protector, como anticuerpos bloqueantes. Esta sugerencia sin embargo, no deja de

ser una mera hipótesis ya que hasta ahora, no se ha demostrado que estos anticuerpos sean responsables de las reacciones de hipersensibilidad que experimentan los pacientes. Por otro lado y a diferencia de lo que ocurre con los alérgenos inhalantes, los valores de IgG₄ específica de alimentos son siempre más elevados, probablemente debido a la exposición diaria a este tipo de antígenos. Los resultados obtenidos con la leche como ejemplo de alérgeno alimentario, indican que es muy frecuente que los individuos sanos posean anticuerpos IgG₄ específicos, sin embargo, esto no resta importancia al papel que estos anticuerpos de IgG₄ puedan tener en los pacientes alérgicos. De hecho, aunque existe mucha controversia al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo coincidiendo con los de Morgan y col. (1990), indican que en los individuos atópicos los niveles de IgG₄ específica son significativamente más elevados, con valores incluso de hasta 40 µg/ml que están muy por encima de los encontrados en el grupo control. La detección de la presencia de IgG₄ específica a leche en concentraciones elevadas, si podría tener por tanto importancia como diagnóstico en la alergia alimentaria, sobre todo si se tiene en cuenta que en el 50% de los casos estudiados en este trabajo no se detectaron anticuerpos IgE específicos. Esto parece sugerir que serían los anticuerpos IgG₄ los relacionados con las reacciones de hipersensibilidad y por tanto, serían de gran relevancia clínica.

2.- Como ya se mencionó en la Introducción, se ha sugerido que la función de la IgG₄ podría ser protectora. Si esto es así, habría que demostrar si se produce un incremento selectivo de esta subclase durante la IT, si este incremento es cuantitativamente significativo y finalmente, si es responsable del grado de mejoría que experimentan los pacientes. Asimismo, habría que demostrar si estos anticuerpos son capaces de neutralizar al alérgeno evitando su unión a la IgE y cuál es su mecanismo de acción. Sin embargo, hasta ahora no existe un acuerdo generalizado con respecto a la función de estos anticuerpos en los tratamientos hiposensibilizantes, de tal forma que sólo se ha definido su papel como anticuerpo predominante. Dejando aparte la correlación que pueda existir entre el grado de mejoría y la presencia de anticuerpos IgG₄ específicos, cuyo estudio no se ha tratado en este trabajo, hay otros aspectos de los que si se ha intentado obtener más información.

Además de demostrar que se produce un aumento selectivo de los niveles de IgG₄ específica frente al alérgeno con el que se trata a los pacientes, se comprobó que este aumento cuantitativamente es muy importante ya que en algunos casos se alcanzaron concentraciones de hasta 200 µg/ml. Otro de los aspectos que se ha investigado es la relación que existe entre los cambios que experimentan los niveles de IgG₄ específica con los de IgG₄ total durante el tratamiento. Para aclarar este punto, se hizo un estudio en un grupo de pacientes alérgicos a gramíneas tratados con un extracto de *Phleum pratense*, en el que se cuantificaron ambos niveles a lo largo de 2 años y medio de terapia. Como resultado, se observó que durante la

hiposensibilización se desarrolla una respuesta de IgG₄ específica que va aumentando con el tiempo y que sigue un patrón común en todos los pacientes (Figura 4.10). Por otro lado, aunque los niveles de IgG₄ total se incrementan significativamente, como lo demuestra el hecho de que en el 68% de los pacientes aumente la concentración de IgG₄ total, los cambios que se producen durante la terapia no se correlacionan con los que experimentan los niveles de IgG₄ específica (Figura 4.11). A pesar de estos datos, no hay que descartar la importancia que tiene valorar IgG₄ total, puesto que aunque aparentemente existe una falta de relación entre la IgG₄ total y específica en la IT, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran también que la respuesta de IgG₄ específica producida parece depender de los niveles de IgG₄ total que cada paciente posee al iniciar el tratamiento. Esto podría indicar que podría existir una regulación genética sobre el desarrollo de la respuesta de IgG₄ específica. De tal forma, que aquellos individuos con IgG₄ total elevada estarían predispuestos genéticamente a producir mayor cantidad de anticuerpos IgG₄ específicos.

Por otro lado, la mayoría de los datos experimentales publicados hasta ahora indican que la respuesta específica de IgG al alérgeno durante la IT está compuesta principalmente por anticuerpos IgG₁ e IgG₄ (Nakagawa, 1991), de tal forma que se produce un cambio de clase de IgG₁ a IgG₄ según avanza el tratamiento. En algunos estudios sin embargo, se ha insistido en dar mayor importancia a los anticuerpos IgG₁ como bloqueantes del alérgeno (Van der Zee y Aalberse, 1988). Puesto que para que un anticuerpo se comporte eficazmente como bloqueante ha de estar dirigido contra las mismas moléculas que la IgE, en este trabajo se comparó el patrón de reconocimiento antigénico exhibido por los anticuerpos IgG₁, IgG₄ e IgE a lo largo de una IT frente a diferentes componentes de un extracto alérgico de epitelio de gato. Como ya se indicó en los resultados (Resultados 4.3.3), este estudio se realizó frente a dos componentes, la albúmina de gato que es una proteína mayoritaria (representa aproximadamente el 40% del extracto) pero de baja alergenicidad y *Fel d I*, que es un componente muy minoritario cuantitativamente ya que representa un 1% del total, pero que es el alérgeno más importante del extracto. Los resultados obtenidos indican claramente que el comportamiento de IgG₁ y de la IgG₄ en la IT, al menos en los casos estudiados, son acusadamente diferentes. Los anticuerpos IgG₁ van disminuyendo a lo largo del tratamiento y parecen estar dirigidos contra los dos componentes del extracto, sean alérgicos o no. Por el contrario, la respuesta de IgG₄ va aumentando con el tiempo y además es selectiva, se desarrolla más específicamente frente a las mismas moléculas que la de IgE, que en este caso es frente a *Fel d I*. Estos resultados se han visto recientemente confirmados por Lin y col. (1991), estudiando la respuesta inmune producida frente a un extracto de polvo de casa compuesto, por al menos, 50 proteínas durante la IT. Estos autores han encontrado, igual que en nuestro caso, que la respuesta de IgE e IgG₄ estaba dirigida contra los mismos antígenos.

Todos estos resultados sugieren que la IgG_4 juega un papel cuantitativamente importante en la IT y que probablemente, actúe como bloqueante del alérgeno en su unión a la IgE y por tanto, evitando la sintomatología alérgica. Queda aún por determinar cuál es su relación con la mejoría clínica que se produce como consecuencia de estos tratamientos. A este respecto, hay que considerar que probablemente, esta mejoría sea el resultado de un conjunto de cambios inmunológicos entre los que la acción de la IgG_4 no es el único (supresión de la síntesis de IgE , inducción de autoanticuerpos anti-idiotípicos, etc.). Por otro lado, hay que mencionar que su papel como anticuerpo protector podría estar también a otro nivel, inhibiendo la formación de inmunocomplejos (IgG_1 -alérgeno). Como la IgG_4 no fija complemento y es incapaz de formar inmunocomplejos de gran tamaño debido a su monovalencia funcional, durante una exposición alérgica prolongada como en la IT, parece proporcionar una protección adecuada contra las lesiones inducidas por el complemento o por los inmunocomplejos precipitantes que aparecerían por la producción persistente de IgG_1 .

5.4. COMPORTAMIENTO DE LA IgG_4 EN LA LIBERACION DE MEDIADORES ANAFILACTICOS

Aunque la IgE es el principal responsable de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, se ha sugerido la existencia de otros anticuerpos anafilácticos, que en el caso del hombre, podría ser la IgG_4 . Esta sugerencia se basó inicialmente, en los estudios serológicos en individuos atópicos y fundamentalmente en dos evidencias obtenidas *in vitro* como se ha indicado en la Introducción (1.5.1):

-Una es la observación de que la IgG_4 podía inhibir las reacciones de anafilaxia cutánea pasiva mediadas por IgE en monos (Stanworth y Smith, 1973).

-La otra, que la IgG_4 podía mediar liberación de histamina (LH) en basófilos. Estos resultados han sido cuestionados, sin embargo, por algunos autores que no han sido capaces de reproducirlos, dejando así el posible papel anafiláctico de esta Ig como un tema sin resolver y controvertido.

Si se observa detalladamente el esquema de la Tabla 1.3, donde se presentan todos los experimentos más importantes que se han realizado sobre LH mediada por IgG_4 , podemos observar que una característica común es el hecho de haberse empleado diferentes tipos de anticuerpos anti- IgG_4 , policlonales o monoclonales, con especificidades no siempre bien definidas. Teniendo en cuenta que la capacidad de los anticuerpos anti- IgE para desencadenar LH depende de la región de la molécula que reconocen (Moscoso del Prado y col., 1991), del mismo modo, una explicación similar podría ser la causa de la discrepancia observada para los anticuerpos anti- IgG_4 . Otro elemento que seguramente también ha contribuido a la

falta de acuerdo en los resultados es el haber llevado a cabo la mayoría de los experimentos bajo condiciones no fisiológicas, en presencia de D_2O . El D_2O es un potenciador de la LH que puede inducir liberaciones espontáneas muy elevadas. Esto hace necesario realizar los experimentos también sin este agente como control. Sin embargo, en los experimentos con IgG_4 , los resultados obtenidos en presencia de D_2O no se han comparado con controles en su ausencia y cuando se han comparado, los resultados han sido muy contradictorios ya que no se ha podido inducir LH sin este agente (Beavais y col., 1990). Finalmente, otro punto importante que hay que considerar en los experimentos de LH mediados por IgG_4 realizados hasta ahora, es que tampoco se han realizado estudios ni en grupos con un número significativo de individuos, ni comparando entre atópicos y no atópicos.

Teniendo en cuenta estos datos y aprovechando la disponibilidad de AcM con 2 especificidades diferentes, se realizó un estudio de LH en un grupo amplio de individuos (27) atópicos y no atópicos, bajo condiciones fisiológicas, en ausencia de cualquier potenciador artificial de la liberación. Los resultados son bastante inequívocos, ya que en el 93% de los casos se produjo liberación de histamina, independientemente del estado clínico del donante, aunque sólo después de la estimulación con el AcM anti-Fab.

Si se considera brevemente los hechos que ocurren cuando se produce la activación de basófilos o mastocitos por el puenteo o "cross-linking" de los receptores de IgE , encontramos que la activación de los receptores está asociada con la metilación de los fosfolípidos de la membrana celular a través de la acción de metil transferasas, así como de la activación de la adenilato ciclasa, llevando a la formación de canales para el calcio y a la consecuente liberación de mediadores. La entrada de calcio en la célula es necesaria para la liberación de mediadores ya preformados, como la histamina, pero también lo es para activar a la fosfolipasa A_2 de modo que se inicie la cascada del ácido araquidónico y por tanto, la síntesis posterior de otros mediadores, como los leucotrienos y prostaglandinas. De la misma forma, en este trabajo se ha demostrado que la LH mediada por IgG_4 tras la estimulación con el AcM anti-Fab está acompañada de la liberación de LTC_4 y además, es dependiente de la entrada de calcio en la célula puesto que se ve inhibida en presencia de EDTA en el tampón de liberación.

Por el contrario, los AcM específicos de Fc no fueron capaces de provocar LH en ninguno de los donantes estudiados, ni en presencia de D_2O . Ya se mencionó, que una posible explicación para este comportamiento podría ser que los AcM anti- IgG_4 Fc no fueran capaces de llevar a cabo el puenteo de las moléculas de IgG_4 presentes en la membrana del basófilo. Sin embargo, tampoco se detectó liberación de histamina con los AcM anti-Fc después de añadir un anticuerpo policlonal anti- IgG de ratón que podría favorecer el puenteo. Esto sugiere, que estos AcM anti- IgG_4 Fc no se unen a la IgG_4 presente en el basófilo porque probablemente, reconocen un epítipo que está implicado de alguna manera en esta unión. Estos

resultados se confirmaron también por los experimentos de inmunofluorescencia que por otra parte, constituyen la primera evidencia directa de la existencia de IgG_4 unida a la membrana del basófilo (Figura 4.10). La especificidad del anticuerpo utilizado es por lo tanto, muy importante para determinar su capacidad de estimular la LH. Aunque en este trabajo, sólo se haya obtenido LH con el anti-Fab, no significa que otros anticuerpos con especificidades dentro de la región de Fc diferentes a las de los AcM que se ha probado, no puedan inducir LH. Estos resultados obtenidos que sugieren que la habilidad de los anticuerpos anti- IgG_4 para inducir liberación de histamina parece depender de su especificidad, suponen una posible explicación a la controversia existente en los datos previamente publicados. De tal forma que, según el anticuerpo utilizado, se podría explicar por qué algunos autores han conseguido inducir liberación de histamina y por qué otros no.

En cuanto a la comparación de respuestas mediadas por IgE e IgG_4 , uno de los aspectos más importantes del que hasta ahora no se han ocupado los investigadores, es determinar si ambas Ig poseen el mismo o diferentes receptores en la membrana del basófilo. Aunque en el presente trabajo, no se ha realizado ningún experimento encaminado a esclarecer de forma directa este hecho, algunos datos obtenidos pueden ayudar a sacar alguna conclusión. Una de las características más importantes de la mediación de liberación de histamina por parte de los anticuerpos anti- IgE es que es selectiva, de tal forma que existe una fracción importante de la población que permanece sin responder al estímulo de los AcM anti- IgE (Conroy y col., 1978; Nguyen y col., 1990). En la misma línea, los resultados que aquí se presentan confirman este hecho puesto que el 35% de los donantes fueron no liberadores después de incubar su sangre con el AcM anti- IgE , estableciéndose además una marcada aunque no significativa diferencia entre atópicos y no atópicos (17% y 53% de no liberadores respectivamente). Por el contrario, sólo el 7% de los donantes fueron no liberadores después de la estimulación con el AcM anti-Fab, sin que se observasen diferencias entre atópicos y no atópicos. Recientemente, se ha sugerido que los individuos no liberadores con anti- IgE tienen algún tipo de defecto en algún paso inicial entre el receptor de IgE y la maquinaria implicada en la transducción de la señal (Nguyen y col., 1990). Si esto es así, el hecho de que 9 de los no liberadores con anti- IgE liberen histamina con la estimulación con el AcM anti- IgG_4 sugiere la existencia de receptores independientes para ambas Ig , o, aunque menos probable, que haya un único receptor pero tenga señales de transducción diferentes. En cualquier caso y aunque la identidad del receptor de IgG_4 permanezca sin aclarar, estos datos juntos con los obtenidos por los experimentos de inmunofluorescencia (Resultados 4.4.6), si parecen sugerir la existencia de un receptor específico para IgG_4 en basófilos.

Siguiendo con la comparación de ambas respuestas, llama la atención que aunque aparentemente la IgG_4 sea más eficiente en términos de porcentaje de liberadores, requiera concentraciones de anticuerpo mucho más elevadas que la IgE ,

aún corrigiendo por las diferencias de afinidades entre ambos anticuerpos. Podrían existir varias razones que explicaran esta característica. En primer lugar, que como consecuencia de la unión de la IgG₄ al receptor sufra cambios conformacionales que afecten a su afinidad por los anticuerpos. En segundo lugar, como han sugerido algunos autores (Nakagawa y de Weck, 1983), que el número de receptores para IgG₄ sea mucho menor que para IgE. En este sentido, aunque no se ha realizado un estudio sistemático y cuantitativo, los experimentos de inmunofluorescencia no apoyan esta idea, ya que no se observó una correlación entre la intensidad de fluorescencia de los basófilos y la susceptibilidad a inducir LH. También y como ha sugerido Stanworth (1986), podría ser debido a que la IgG₄ carece del decapeptido que posee la IgE. Según este autor, esta estructura está implicada directamente en la activación de los basófilos debido a su capacidad para insertarse en la bicapa lipídica, lo que conduciría en el caso de la IgG₄ a un mecanismo de transducción de señal probablemente menos eficiente que en caso de la IgE. Finalmente, una última explicación más probable según los datos obtenidos, podría ser que el receptor para la IgG₄ tenga una afinidad más baja que el de la IgE por su ligando, pudiéndose especular que las concentraciones más elevadas en suero de IgG₄ podrían compensar *in vivo* esta diferencia.

El papel fisiológico que pueda jugar la IgG₄ unida al basófilo es aún desconocido, aunque resulta tentador especular con el hecho de que sea el segundo anticuerpo anafiláctico en el hombre, después de la IgE. Aunque hay algunos datos que estarían de acuerdo con esta hipótesis, como es el incremento selectivo que se produce de estas 2 inmunoglobulinas en las enfermedades alérgicas o la co-regulación de ambas por IL-4 e IFN- γ (Lundgren y col., 1989; Spiegelberg, 1990), queda aún mucho por esclarecer para confirmar este punto. Así, a la hora de considerar el papel de la IgG₄, hay que tener en cuenta que aunque un anticuerpo anti-IgG₄ pueda unirse al basófilo y provocar LH en experimentos *in vitro*, esto no implica que una estimulación con alérgeno (antígeno específico de anticuerpos IgG₄) desencadene también LH. De hecho, aún no se ha conseguido inducir liberación siguiendo este esquema *in vitro* por ninguno de los investigadores que lo han intentado, aunque no está claro que no sea un problema de la metodología o de las proteínas de IgG₄ empleadas para sensibilizar.

La controversia acerca del papel de la IgG₄ surge al considerar los resultados de liberación de histamina junto con los datos que sugieren un comportamiento como anticuerpo bloqueante. Sin embargo, aunque aparentemente resulten paradójicos, son compatibles y las bases de esta dualidad hay que buscarlas en su monovalencia funcional. La IgG₄ compite con la IgE por la unión del Ag y debido a su comportamiento monovalente no es capaz de formar complejos precipitantes, inhibiendo la formación de aquellos formados por la IgE e IgG₁ con el Ag y por tanto ejerciendo un papel protector. Pero además, la neutralización del alérgeno puede

realizarla interfiriendo con la unión de la IgE a su receptor en el basófilo (Stanworth, 1986). Al estar unida a la membrana de los basófilos, puede impedir la LH mediada por IgE, porque una saturación de los posibles receptores de IgG₄ debido a la alta concentración de IgG₄ sérica específica formada impida estéricamente el puenteo de los receptores de IgE, si consideramos la hipótesis de que ambos receptores están estrechamente relacionados. En cuanto a su papel como sensibilizante tras la estimulación con el alérgeno, los datos obtenidos en experimentos *in vitro* no son nada concluyentes. Si existiera una relación como se ha mencionado, entre los receptores de IgE e IgG₄ podría explicarse el por qué, aunque *in vitro* el alérgeno no induzca LH de forma directa debido a la monovalencia de la IgG₄, se den situaciones *in vivo* en los que la sintomatología clínica aumenta por un sinergismo entre ambas Igs en la activación de los basófilos. Sin embargo, basándose en los resultados presentados en este trabajo que sugieren que ambas inmunoglobulinas poseen receptores diferentes y teniendo en cuenta que no se ha definido en que consiste la relación entre ambos receptores, parece difícil que esta sea la causa que explique el comportamiento anafiláctico de la IgG₄ en algunas situaciones, sobre todo en aquellas condiciones en que la IgG₄ aparece como única responsable de la sintomatología alérgica. La sugerencia que se ha dado hasta ahora de forma más insistente, está basada en la heterogeneidad de la IgG₄ humana. De tal forma, que existiría una población de moléculas de IgG₄ con efecto protector y otra capaz de comportarse como sensibilizante, a pesar de su monovalencia funcional (Stanworth, 1988). Aunque inicialmente, se pensó que estos dos subtipos se corresponderían con los dos isoalotipos 4a y 4b, también se ha sugerido que la característica estructural que podría ser responsable de esta diferencia en el comportamiento de la IgG₄ sería la secuencia de oligosacáridos unidos al Fc.

En resumen, aunque se ha dado un paso importante con este trabajo al obtener la primera evidencia directa de la presencia de IgG₄ en la membrana del basófilo y al determinar su capacidad para mediar LH tras la estimulación con anticuerpos anti-IgG₄, es necesario seguir investigando para poder establecer si la IgG₄ provoca LH cuando se estimula con el alérgeno específico; así como las características de su receptor y su mecanismo de activación. La importancia fisiológica que pueda tener la presencia de IgG₄ en los basófilos es aún desconocida, aunque con los resultados que se han expuesto resulta muy tentador especular sobre su posible comportamiento como anticuerpo anafiláctico. También apoyarían esta sugerencia los datos obtenidos en la valoración de los niveles de IgG₄ específica frente a alimentos, que parecen indicar que esta subclase podría ser la responsable de la sintomatología clínica. Por otro lado, en este trabajo también se ha demostrado la importancia de la IgG₄ como anticuerpo protector. Se ha visto que se produce un incremento selectivo de esta subclase durante los tratamientos de inmunoterapia y que parece competir por las mismas moléculas antigénicas que la IgE. Todos estos

resultados tomados en conjunto, sugieren la necesidad de establecer las bases estructurales y fisiológicas que determinen cuándo la IgG₄ se comporta como anticuerpo anafiláctico y cuándo, como bloqueante.

6. CONCLUSIONES

El objetivo de esta tesis ha sido obtener más información sobre la función que cumple la IgG₄ en la Alergia, tanto como anticuerpo protector como anafiláctico. Las principales conclusiones que se desprenden de los estudios realizados son:

- Se han obtenido 5 AcM específicos de IgG₄ (G4.1, G4T.2, G4T.9, G4T.11 y G4T.12) que reconocen 2 epítomos diferentes localizados, respectivamente, en las regiones Fab y Fc de la molécula de IgG₄. La obtención de un AcM anti-IgG₄ específico de Fab supone un gran avance en el estudio de esta subclase ya que se trata de un anticuerpo que reconoce un epítomo nuevo en la molécula de IgG₄, que hasta ahora no había sido descrito.

- El análisis detallado de los resultados de ambas fusiones, así como la caracterización de los AcM permite destacar la influencia significativa ejercida por el tratamiento de tolerización neonatal frente a las otras 3 subclases de IgG. Por un lado, favoreciendo la producción de AcM frente a determinantes exclusivos de IgG₄ (85% de AcM específicos de IgG₄) y por otro, permitiendo el desarrollo de anticuerpos frente a epítomos poco inmunogénicos (anticuerpo anti-IgG₄ Fab).

- La existencia de algunas propiedades de los anticuerpos monoclonales producidos en este trabajo, como el reconocimiento de 2 epítomos diferentes y la persistencia de su actividad funcional cuando se les adsorbe a una fase sólida, ha permitido el desarrollo de un ELISA específico para valorar IgG₄ total, cuyas características más importantes son:

Gran sensibilidad

Excelente precisión interensayo (CV=6%)

Amplio rango de trabajo (4-200 ng/ml)

Permite la cuantificación y estandarización de las determinaciones al disponer de un suero de referencia calibrado en su contenido de IgG₄ frente a la referencia internacional 67/69.

- La alta afinidad (K_{af} : 4.93×10^9) y especificidad del anticuerpo monoclonal G4T.9 ha servido para poner a punto un ELISA cuyas propiedades técnicas más importantes son:

Gran sensibilidad (5 ng/ml)

Gran precisión interensayo (CV=10%)

Rango efecto de trabajo mayor de 2 órdenes de magnitud.

Falta de interferencia con los niveles de IgG₄ total.

El principal avance que supone este método es además, permitir la cuantificación de forma objetiva, mediante el empleo de una preparación calibrada. En este trabajo, se ha desarrollado un método para preparar la curva de referencia basado en la absorción específica de un suero a un extracto de *Phleumpratense*. El contenido de IgG₄ específica se ha calculado como la diferencia en la concentración de IgG₄ total antes y después de eliminar los anticuerpos específicos en el proceso de absorción.

- El estudio comparativo de los niveles de IgG₄ en individuos atópicos y no atópicos permite destacar como importantes los siguientes puntos:

Los niveles de IgG₄ total exhiben una gran variabilidad tanto entre individuos atópicos, como no atópicos, y no existen diferencias significativas entre ambos grupos.

La presencia de anticuerpos IgG₄ específicos si parece estar correlacionada con el estado clínico del paciente, sobre todo en la alergia alimentaria donde la detección de estos anticuerpos va asociada, en numerosos casos, con la falta de anticuerpos de IgE. Esto indicaría su importancia como responsables de la sintomatología clínica.

- El estudio del comportamiento de la IgG₄ en los tratamientos de hiposensibilización realizado en este trabajo, permite concluir la importancia del papel que juega la IgG₄ en la IT, no sólo a nivel cuantitativo, sino probablemente, bloqueando al alérgeno en su unión a la IgE. Las evidencias más importantes obtenidas en este trabajo a este respecto son:

Como consecuencia de la IT, los niveles de IgG₄ específica sufren un incremento selectivo significativo, cuantitativamente muy importante (concentraciones de hasta 200 µg/ml) que se desarrolla según un patrón común para todos los pacientes.

Los niveles de IgG₄ total experimentan un incremento significativo como consecuencia de la IT, pero su comportamiento es errático, no sigue un patrón común.

Aunque no existe correlación entre los cambios producidos en ambos niveles, la respuesta que se produce de IgG₄ específica parece depender de la concentración inicial de IgG₄ total de cada paciente.

Los anticuerpos IgG₄ específicos a diferencia de los de IgG₁, están dirigidos de forma selectiva frente a los componentes alérgicos de los extractos. Se producen frente a las mismas moléculas que los anticuerpos IgE, lo que favorecería su papel como anticuerpos bloqueantes.

- Los estudios realizados con basófilos humanos y mediadores anafilácticos permiten obtener 2 conclusiones importantes: la presencia de IgG₄ en el basófilo y su

mediación en los procesos de liberación de histamina y LTC₄. Los principales datos que se pueden resaltar a este respecto son:

La inducción de liberación de histamina es dependiente del anticuerpo anti-IgG₄ utilizado, ya que sólo el anti-IgG₄ Fab es efectivo como agente liberador, estimulando liberaciones significativas en el 90% de los casos. Los AcM anti-IgG₄ Fc sin embargo, no inducen liberación en ningún caso porque son incapaces de unirse a la IgG₄ fijada al basófilo, lo que parece indicar que reconocen un epítipo relacionado con el sitio unión al basófilo.

La inducción de liberación de histamina mediada por IgG₄ es dependiente de Ca²⁺, y su mecanismo está basado en el "cross-linking" de los receptores unidos al basófilo.

La liberación de histamina inducida por anticuerpos anti-IgG₄ es independiente del estado clínico de los individuos y se produce en toda la población. Esta característica la diferencia de la LH mediada por anticuerpos anti-IgE, que es selectiva. El resultado obtenido en este trabajo según el cual, individuos que no responden al estímulo de AcM anti-IgE si son liberadores con AcM anti-IgG₄, parece sugerir la existencia de receptores diferentes para ambas Ig.

Todos estos resultados, además de explicar en parte, la discrepancia observada en los datos anteriormente publicados sobre el papel de la IgG₄ en los procesos de liberación de histamina, parecen sugerir consistentemente que la IgG₄ está implicada en los procesos anafilácticos.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aalberse R.C., Van der Gaag R. y Van der Leeuwen J. (1983a) *J. Immunol.* **130**, 722 - 726.
- Aalberse R.C., Dieges P.H., Knul-Bretlova V., Vooren P., Aalberse M. y Leeuwen J. (1983b) *Clin. Rev. Allergy* **1**, 289 - 302.
- Adkinson N.F. (1988) *Allergy proceedings* **3**, 119-127.
- Anderson C.L. y Looney R.J. (1986) *Immunol. Today* **7**, 264 - 266.
- Anselmino L.M. Perussia B. y Thomas L.L. (1989) *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**, 907 - 914.
- Aucouturier P., Danon F., Daveau M., Guillou B., Sabbah A., Besson J. y Preud'home J.L. (1984) *J. Immunol. Methods* **74**, 156 -162.
- Aucouturier P., Mounier S. y Preud'home J.L. (1985) *Diag. Immunol.* **3**, 191 - 196.
- Beatty J.D., Beatty B.G. y Vlahos W.G. (1987) *J. Immunol. Methods* **100**, 173 - 179.
- Beauvais F., Hieblot C., Burtin C. y Benveniste J. (1990) *J. Immunol.* **144**, 3881 - 3890.
- Bird P. y Lacman P.J. (1988) *Eur. J. Immunol.* **18**, 1217 - 1222.
- Bird P., Calvert J.E. y Amlot P.L. (1990) *Immunology* **69**, 335 - 360.
- Bui R.H.D., Molinaro G.A., Eby W.C., Jauhar R. y Mace J.W. (1988) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **86**, 314 - 318.
- Burton D.R. (1985) *Mol. Immunol.* **22**, 161 - 206.
- Burton D.R., Gregory L. y Jefferis R. (1986) *Monographs in Allergy* **19**, 7 - 35.
- Campell A.M. (1984) En *Monoclonal antibody technology*. Ed. Burdon R.H. y Van Knipenbergh P.H. Elsevier, Amsterdam; vol. **13**, pp 151-165.
- Capron A., Dessaint J.P., Haque A. y Capron M. (1982) *Prog. Allergy* **31**, 234 - 267.
- Conroy M.C., Adkinson N.F.J., Sobotka A.K. y Lichtenstein L.M. (1978) *Fed. Proc.* **37**, 1216
- Cuesta J. (1989) Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Univ. Valladolid.
- Devey M.E., Wilson D.V. y Wheeler A.W. (1976) *Clin. Allergy* **6**, 227 - 236.
- Devey M.E., Bleasdale K., French M.A.H. y Harrison G. (1985) *Immunology* **55**, 565 - 570.
- Devey M.E., Bleasdale K., Lee S. y Rath S. (1988) *J. Immunol. Methods* **106**, 119-125.
- Devey M.E., Lee S. R., Richards S.D. y Kemeny D.M. (1989) *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**, 326 - 330.
- Duffort O., Carreira J. y Lombardero M. (1988) *Immunol. Letters* **17**, 71-77.
- Duffort O., Carreira J., Nitti G., Polo F. y Lombardero M. (1991) *Mol. Immunol.* **28**, 301-309.

- Djurup R., Malling H.J., Sondergaard I. y Wecke B. (1985) *J. Allergy Clin. Immunol.* **76** , 46 - 55.
- Djurup R. y Malling H.J. (1987) *Clin. Allergy* **17** , 459 - 468.
- Ey P.L., Prowse S.J. y Jenkin C.R. (1978) *Immunochemistry* **15** , 429 - 436.
- Fagan D.L., Slaughter C.A., Capra D.C. y Sullivan T.J. (1982) *J. Allergy Clin. Immunol.* **70** , 399 - 404.
- Ferrante A., Rowan Kelly B., Bears I.J. y Maxwell G.M. (1986) *J. Immunol. Methods* **93** , 207 - 212.
- French M.H.H. y Harrison G. (1984) *J.Clin. Lab. Immunol.* **18**, 21-25.
- Galfré G. y Milstein C. (1981) En *Methods in Enzymology* . Ed.Langone J.J. y Van Vunakis H. Academic Press, New York; Vol **73**, pp 1-46.
- Grant J.A., Dupree E. y Thueson D.O. (1977) *J. Allergy Clin. Immunol.* **60**, 306-311.
- Gillespie E. y Lichtenstein L.M. (1972) *J. Clin. Invest.* **51** , 2941 - 2947.
- Golumbeski G.S. y y Dimond R.L. (1986) *Anal. Biochem.* **154** , 373 -381.
- Gwynn C.M., Morrison Smith J., Leon Leon G. y Stanworth D.R. (1979) *Clin. Allergy* **9** , 119 - 123.
- Gwynn C.M., Alsosauwi T. y Stanworth D.R. (1982) *Clin. Allergy* **12** , 459 - 464.
- Halpern G.M. (1983) *Clin. Rev. Allergy* **1** , 303 - 308.
- Halpern G.M. y Scott J.R. (1987) *Ann. Allergy* **58**, 14-27.
- Hamilton R.G. (1987) *Clin. Chem.* **10** , 1707 - 1725.
- Heiner D.C., De Weck A.L., Skvaril F., Muller V. y Underdown B. (1980) *J. Allergy Clin. Immunol.* **65**, 201.
- Heiner D.C., Myers A.S. y Beckc S. (1983) *Clin. Rev. Allergy* **1** , 259 - 266.
- Homburger H.A., Mauer K., Sachs M.I., O'Connell E.J., Jacob G.L. y Caron J. (1988) *J. Allergy Clin. Immunol.* **77**, 427 - 434.
- Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962) *Nature* **194** , 495 - 498.
- Hussain R., Poindexter R.W., Wistar R. y Reimer C.B. (1986) *J. Immunol. Methods* **93** , 89 - 96.
- Inganäs M. , Johansson S.G.O. y Bennich H. (1981) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **65**, 51-61.
- Isenman D.E., Dorrington K.J. y Painter R.H. (1975) *J. Immunol.* **99**, 82-87.
- Ishizaka T., Ishizaka K., Sabron S. y Fudenberg H. (1967) *J. Immunol.* **99** , 82 - 91.
- Ishizaka T., De Bernardo R., Tomioka H., Lichtenstein L.M. e Ishizaka K. (1972) *J. Immunol.* **108** , 1000 - 1008.

- Ishizaka T., Sterk A.R. e Ishizaka K. (1979) *J. Immunol.* **123** , 578 - 583.
- Jefferis R., Reimer C.B., Skvaril F., De Lange G., Ling N.R. Lowe J. , Walker M. y col. (1985) *Immunol. Letters* **10**, 223-252.
- Jefferis R. (1986) *Monographs in Allergy* **19**, 71-85.
- Kemeny D.M. y Lessof M.H. (1987) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **83** , 113 - 120.
- Klein M., Haeffrer-Cavaillon N., Isenman D.E., Rivat C., Navia M.A., Davies D.R. y Dorrington K.J. (1981) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78** , 524 - 528.
- Köhlher G. y Milstein C. (1975) *Nature* **256** , 495 - 497.
- Kunkel H.G., Joslin F.G., Penn G.M. y Natvig J.B. (1970) *J. Exp. Med.* **132** , 508 - 520.
- Laemmli U.K. (1970) *Nature* **277** , 680 - 685.
- Layton T. y Stanworth D.R. (1984) *J. Immunol. Methods* **73**,347 - 356.
- Lee S.I., Heiner D.C. y Wara D. (1986) *Monographs in Allergy* **19** , 108 - 121.
- Lessof M.H., Sobotka A.K. y Lichtenstein L.M. (1977) *Monographs in Allergy* **12** , 253 - 256.
- Lin K-L., Wang S-Y y Hsieh K-H. (1991) *Ann. Allergy* **67** , 63 - 69.
- Lowe J., Bird P., Hardie D., Jefferis R. y Ling R. (1982) *Immunology* **47** , 329 - 336.
- Lundgren M., Persson V., Larsson P., Magnusson C., Edvard Smith C.I., Hammarström L. y Severinson E. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19** , 1311 - 1315.
- Magnusson C.G.M., Cesbron J.I., Djurup R., Capron A. y Johansson S.G.O. (1986) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **81** , 238 - 244.
- Malley A., Beacher L., Porter G. y Gerding R. (1974) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **47**, 194 - 201.
- Malling H. y Djurup R. (1988) *Allergy* **43** , 60 - 70.
- Merret J., Burr M.L. y Merret T.G. (1983) *Clin. Allergy* **13**, 397 - 470.
- Metzger H. *Clin. Exp. Allergy* **21**, 269 - 279.
- Michalsen T.E. y Haug E. (1985) *J. Immunol. Methods* **84**, 203 - 220.
- Morago G., Carreira J., Corbí A.L. y Sánchez- Madrid F. (1985) *Inmunología* **4**, 111 - 118.
- Morgan J.E., Daul C.B. y Lehrer S.B. (1990) *J. Allergy Clin. Immunol.* **86**, 387 - 392.
- Morell A. y Skvaril F. (1971) En *Prot. Biol. Fluids* Ed. Peeters, Pergamon Press, Oxford **Vol 19**, pp 533-540.
- Moscoso del Prado J., Jimeno L., Obispo T. y Carreira J. (1991) *Mol. Immunol.* **28**, 834 - 844.

- Mosman T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. y Coffman R.L. (1986) *J. Immunol.* **136**, 2348-2357.
- Moss R.B. (1988) *Allergy Proceedings* **3**, 153 - 157.
- Nakagawa T., Stadler B.M., Heiner D.C., Skvaril F. y De Weck A.L. (1981) *Clin. Allergy* **11**, 21 - 30.
- Nakagawa T. y De Wweck A.L. (1983) *Clin. Rev. Allergy* **1**, 197 - 206.
- Nakagawa T. (1991) *Clin. Exp. Allergy* **21**, 289 - 296.
- Nguyen K.L., Gillis S. y MacGlashan D.W. (1990) *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 1020 - 1029.
- Nüsslein H.G., Winter M., TrT. y Kalden J.R. (1991) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **95**, 257-260.
- Oi V.T., Vuong T.M., Hardy R., Reidler J., Bangl L.A., Herzenberg L.A. y Stryer L. (1984) *Nature* **307**, 136 - 140.
- Ouchterlony O. (1948) *Acta Path. Microbiol. Scand.* **25**, 185-195.
- Oxelius V.A. (1979) *Clin. Exp. Immunol.* **36**, 112 - 116.
- Oxelius V.A. (1990) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**, 58 - 61.
- Parish W.E. (1979) *Lancet* **2**, 591 - 592.
- Poulsen L.K., Stahlskov P., Mosbech H. y Weeke B. (1988) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **86**, 383 - 390.
- Reik L.M., Marnes S.L., Ryan D.E., Levin W., Bandeira S. y Thomas P.E. (1987) *J. Immunol. Methods* **100**, 123 - 130.
- Reimer C.B., Phillips D.J., Aloisio C.H. (1986) *J. Immunol. Methods* **93**, 89 - 96.
- Sánchez-Madrid F., Morago G., Corbí A. y Carreira J. (1984) *J. Immunol. Methods* **73**, 367-378.
- Scott J.R. (1988) *Allergy Proceedings* **II**, 60 - 63.
- Shakib F., Stanworth D.R., Drew R. y Catty D. (1975) *J. Immunol. Methods* **8**, 17-28.
- Shakib F., Maclaughlan P., Stanworth D.R., Smith E. y Farburn E. (1977) *British J. Dermatology* **97**, 59 - 63.
- Shakib F., Brown H.M. y Stanworth D.R. (1984) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol* **75**, 107 - 112.
- Shakib F. (1988) *Allergy Proceedings* **II**, 158 - 163.
- Spiegelberg H.L. (1990) *Springer Semmin. Immunopathol.* **12**, 365 - 383.
- Spiegelberg H.L., O'Connor R.D., Falkoff R.J.M. y Beck L. (1991) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **94**, 181 - 183.

-
- Springer T.A., Bhattacharya A., Cardoza J.T. y Sánchez-Madrid F. (1982) *Hybridoma* **1**, 257-273.
- Stallman J.C. y Aalberse R.C. (1977) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **54**, 9 - 18.
- Stanworth D.R. y Smith A.K. (1973) *Clin. Allergy* **3**, 37 - 41.
- Stanworth D.R. (1983b) *Clin. Rev. Allergy* **2**, 161 - 195.
- Stanworth D.R. (1986) *Monographs Allergy* **19**, 227 - 240.
- Stocker J.W. y Nossal G.J. (1976) En *Contemporary Topics in Immunobiology*. Ed. Weigle W.O. Plenum Press, New York; vol. **5**, pp 191-210.
- Tao M-H, Canfields M. y Morrison S.L. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 1025 - 1028.
- Tijssen P. y Kurstak E. (1984) *Anal. Biochem.* **136**, 451 - 457.
- Towbin H., Staehelin T y Gordon J. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 4350 - 4354.
- Urbanek R., Kemmeny D.M. y Richards D. (1986) *Clin. Allergy* **16**, 317 - 322.
- Van der Giessen M., Roussow E., Algra-van Veen T., Loghem E., Zegers B.J.M. y Sander P.C. (1975) *Clin. Exp. Immunol.* **25**, 501-509.
- Van der Giessen M., Homan W.L., Van Kernebeek G. y Aalberse R.C. (1976) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **50**, 625 - 640.
- Van der Zee J.S., Van Swieten P. y Aalberse R.C. (1986a) *J. Immunol.* **137**, 3566 - 3571.
- Van der Zee J.S., Van Swieten P. y Aalberse R.C. (1986b) *Clin. Exp. Immunol.* **64**, 415 - 422.
- Van der Zee J.S. y Aalberse R.C. (1988) *Allergy Proceedings* **II**, 64 - 66.
- Van Metre T.E., Marsh D.G., Atkinson L.F., Sobotka A.K., Khattighavong A., Norman P.S. y Rosenberg G.L. (1988) *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**, 1055-1058.
- Van Toorenberger A.W. y Aalberse R.C. (1981) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **65**, 432 - 440.
- Van Toorenberger A.W. y Aalberse R.C. (1982) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **67**, 117 - 122.
- Vijay H.M. y Perelmutter L. (1977) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **47**, 194 - 201.
- Walter M.R., Bird P., Ulaeto D.O., Vartdal F., Goodall D.M. y Jefferis R. (1986) *Immunology* **57**, 25 - 28.
- Wilson P.B., Wood K.J., Dore P., Swainson J.A., Brenchley P.F.C. y Pumphrey R.S.H. (1986) *J. Immunol. Meth.* **87**, 59-67.