

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO URTICANTE DE LA ORUGA *Morpheis ehrenbergii* SOBRE LA RESPUESTA ANAFILÁCTICA LOCAL Y SISTÉMICA

PRESENTA

IBQ María Fernanda Galicia Curiel

PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA

TUTORES:

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Dra. Eva María Salinas Miralles

ASESOR:

Dr. Javier Ventura Juárez

Aguascalientes, Ags, Noviembre del 2012

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Centro de Ciencias Básicas


**IBQ. MARÍA FERNANDA GALICIA CUIEL,
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Galicia:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Estudio del efecto del extracto urticante de la oruga *Morpheis ehrenbergii* sobre la respuesta anafiláctica local y sistémica"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 12 de noviembre de 2012
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags. Lunes 12 de Noviembre de 2012

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio de este conducto le notificamos que la alumna de la Maestría en Ciencias área en Toxicología, **MARIA FERNANDA GALICIA CUIEL** está en posibilidad de presentar el examen de grado ya que ha cubierto los objetivos y metas del proyecto de tesis de Maestría "Estudio del efecto del extracto urticante de la oruga *Morpheis ehrenbergii* sobre la respuesta anafiláctica local y sistémica". Además hemos revisado el escrito de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido del mismo ya que atendió a las sugerencias hechas por el comité tutorial.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo y quedamos a sus órdenes para cualquier duda y/o aclaración

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Co-tutor

Dra. Eva María Salinas Miralles
Co-tutora

Dr. Javier Ventura Juárez
Asesor

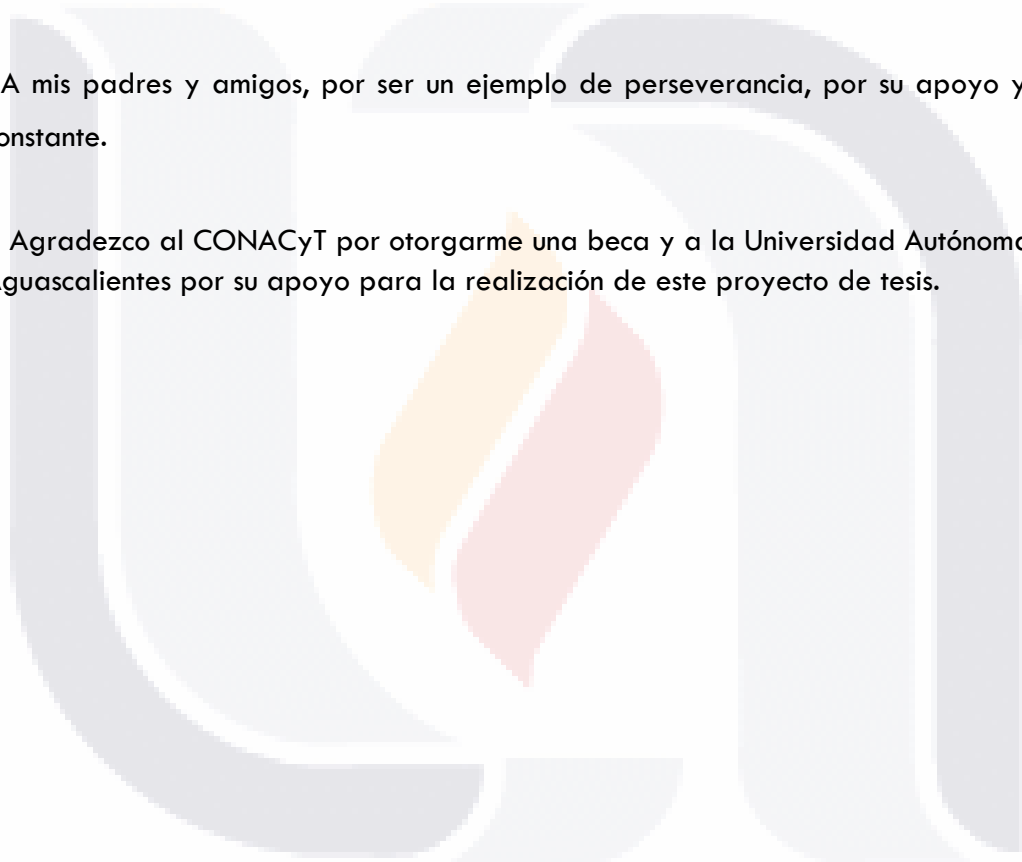
AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Quintanar, por brindarme su apoyo, sus enseñanzas y ser un guía en esta tesis; a la Dra. Eva Salinas, por ser maestra, ejemplo, constancia y siempre estar dispuesta a transmitir conocimiento; al Dr. Ventura, por sus oportunas observaciones para mejorar mi trabajo de tesis.

A Mariela, Yola y Renata, quienes me asesoraron y atendieron mis dudas a lo largo de la realización de esta tesis.

A mis padres y amigos, por ser un ejemplo de perseverancia, por su apoyo y cariño constante.

Agradezco al CONACyT por otorgarme una beca y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo para la realización de este proyecto de tesis.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Tema	Página
Resumen	7
Abstract	8
I. Introducción	9
1.1 Respuesta inmune innata	9
1.2 Inflamación	10
1.2.1 Reacción vascular	10
1.2.2. Reacción celular: reclutamiento de células inflamatorias	11
1.2.3. Reacción tisular	12
1.3 Mastocitos	12
1.3.1 Compuestos granulares de los mastocitos	15
1.3.1.1 Aminas biogénicas	15
1.3.1.2 Enzimas lisosomales	16
1.3.1.3 Proteoglicanos	17
1.3.1.4 Proteasas	17
1.3.1.5 Citocinas	17
1.3.1.6 Otros componentes de los gránulos	18
1.3.2 Compuestos lipídicos de nueva síntesis	19
1.3.2.1 Leucotrienos	19
1.3.2.2 Prostaglandinas	19
1.4 Anafilaxia sistémica	19
1.5 Anafilaxia cutánea	21
1.6 Antecedentes	23
1.6.1 Efecto del extracto urticante de diversos Lepidópteros	23
II. Justificación	26
III. Hipótesis	27
IV. Objetivo	28
4.1 Objetivo General	28
4.2 Objetivos Particulares	28
V. Metodología	29
5.1 Obtención del extracto acuoso	29

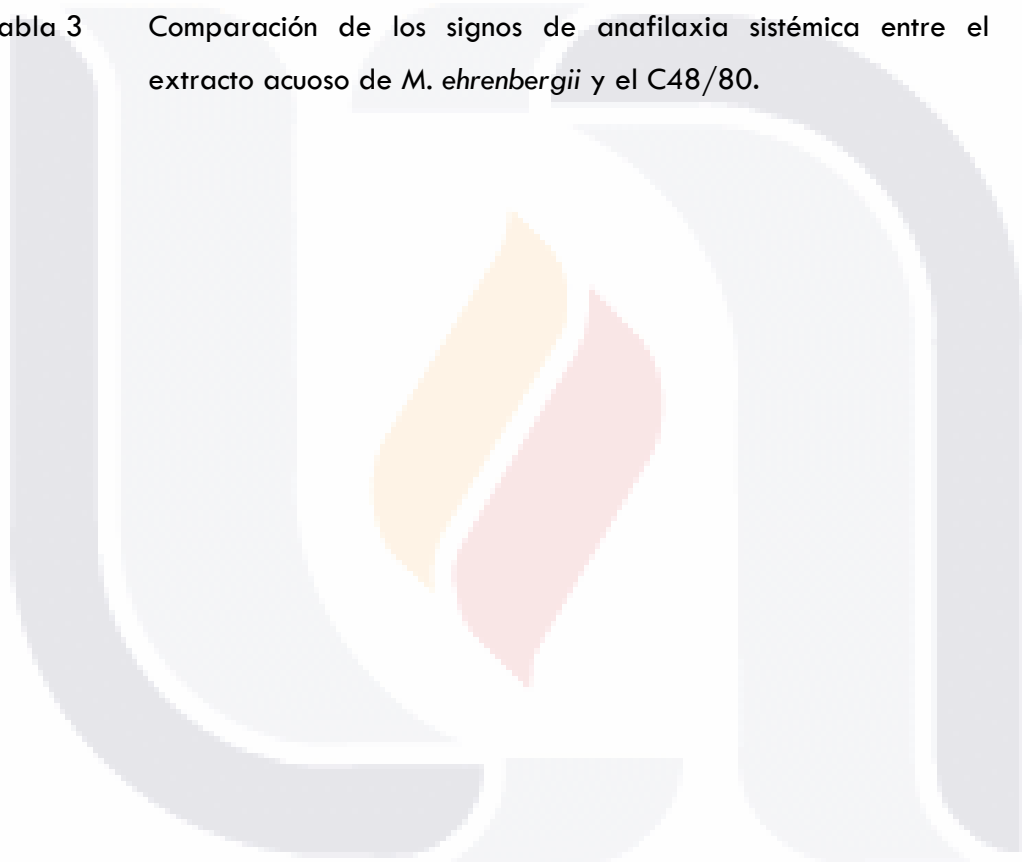
Tema	Página
5.2 Separación de proteína	29
a) Cuantificación de proteínas por medio del método de Bradford	29
b) Electroforesis en gel de acrilamida al 7.5%	29
c) Tinción de gel por azul Coomassie	30
5.3 Propiedades fisicoquímicas del extracto	30
5.4 Aislamiento de mastocitos peritoneales de rata	30
5.5 Ensayo de citotoxicidad con mastocitos de rata (azul tripán)	31
5.6 Microscopía óptica con Rojo Rutenio	31
5.7 Secreción de histamina	32
5.8 Reacción anafiláctica cutánea	33
5.9 Reacción anafiláctica sistémica	34
5.9.1 Determinación de temperatura	35
5.9.2 Evaluación de signos de choque anafiláctico	35
5.9.3 Mortalidad	35
5.9.4 Determinación de la presión arterial	35
VI. Resultados	
6.1 Propiedades fisicoquímicas	37
6.2 Citotoxicidad en mastocitos incubados con el extracto acuoso	37
6.3 Análisis del extracto acuoso por electroforesis desnaturizante	38
6.4 Activación de mastocitos por el extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i>	38
6.5 Cuantificación de histamina secretada por mastocitos en respuesta al extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i> .	40
6.6 Efecto del extracto acuoso en la reacción anafiláctica local	41
6.7 Evaluación de signos característicos de anafilaxia sistémica sistémica inducidos por el extracto acuoso de pelos de <i>M. ehrenbergii</i>	46
VII. Discusión	
7.1 Propiedades fisicoquímicas y actividad citotóxica del extracto de pelos de <i>M. ehrenbergii</i>	50
7.2 Principales bandas presentes en el extracto acuoso de pelos de <i>M. ehrenbergii</i> y su actividad urticante	51
7.3 Activación de mastocitos por el extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i>	51
7.4 Efecto urticante del extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i>	53

Tema	Página
7.5 Efecto de la administración sistémica del extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i>	54
VIII. Conclusiones	57
IX. Glosario	58
X. Referencias	59



ÍNDICE DE TABLAS

Título	Página
Tabla 1 Viabilidad de mastocitos expuestos 30 minutos al extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i> .	37
Tabla 2 Equivalencia de los valores promedios del azul de Evans extravasados por el extracto en la relación a la inducida por histamina y C48/80 en la anafilaxia cutánea.	44
Tabla 3 Comparación de los signos de anafilaxia sistémica entre el extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i> y el C48/80.	46



ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página	
Figura 1	Representación esquemática de la migración transendotelial o diapédesis.	11
Figura 2	Mastocito peritoneal intacto de rata mostrado por microscopía electrónica de transmisión y electrónica de barrido.	12
Figura 3	Mastocito peritoneal desgranulado de rata mostrado por micrografía electrónica de transmisión y micrografía electrónica de barrido.	14
Figura 4	Ejemplos de funciones biológicas de mediadores secretados y preformados en mastocitos.	18
Figura 5	Reacción anafiláctica: mecanismos y detonantes, células, mediadores, y sistema de órganos.	21
Figura 6	Oruga y mariposa de <i>Morpheis ehrenbergii</i> .	25
Figura 7	Inyección intradérmica del extracto acuoso de los pelos de la oruga <i>M. ehrenbergii</i> .	33
Figura 8	Medición del diámetro interno de la extravasación por la reacción al extracto acuoso; y curva patrón del colorante azul de Evans (AE).	34
Figura 9	Determinación de la presión arterial de la rata por medio de Biopac MP Systems Inc.	36
Figura 10	Electroforesis en gel de acrilamida (7.5%) para el extracto urticante de los pelos de <i>M. ehrenbergii</i> .	38
Figura 11	Microscopía óptica que muestra mastocitos en sus tres estados de activación; y comparación entre cada estímulo. Tinción con rojo rutenio.	39
Figura 12	Porcentaje de mastocitos en los tres estados de activación tras estimulación en ausencia o presencia del extracto acuoso de los pelos de <i>M. ehrenbergii</i> .	39
Figura 13	Histamina liberada por mastocitos activados en ausencia o presencia del extracto acuoso de los pelos de <i>M. ehrenbergii</i> .	40

Título	Página
Figura 14 Azul de Evans extravasado en la piel de rata. Comparación entre 0.22 y 0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del extracto acuoso de los pelos.	42
Figura 15 Diámetro que representa la intensidad del proceso inflamatorio en la piel de las ratas.	42
Figura 16 Efecto del extracto acuoso proveniente de la oruga <i>M. ehrenbergii</i> en la anafilaxia cutánea (AC).	43
Figura 17 Curvas dosis-respuesta de histamina y C48/80 sobre la anafilaxia cutánea.	44
Figura 18 AE extravasado en la reacción cutánea inducida por el extracto acuoso de <i>M. ehrenbergii</i> hervido y sin hervir.	45
Figura 19 Comparación entre ratas que han sido expuestas a inyección intravenosa del extracto acuoso y C48/80.	46
Figura 20 Medición de temperatura en ratas con inyección intravenosa del extracto acuoso o el C48/80.	47
Figura 21 Caída de temperatura corporal al inyectar vía intravenosa el extracto acuoso o el C48/80.	48
Figura 22 Registro de la presión arterial en las ratas una vez inyectado vía intravenosa el control negativo (SS), extracto acuoso y C48/80.	49
Figura 23 Caída de presión arterial representada en porcentaje.	49

RESUMEN

Morpheis ehrenbergii es una especie de lepidóptero netamente mexicana, de la cual se tiene la experiencia en México de que tras el contacto con la oruga aparecen reacciones de prurito y urticaria. Otras especies de lepidópteros, se caracterizan por que en su estado larval cuentan con pelos que poseen actividad urticante. El objetivo de este trabajo fue estudiar propiedades fisicoquímicas del extracto acuoso obtenido de pelos de la oruga *M. ehrenbergii* y su efecto como inductor de respuesta anafiláctica local y sistémica. Se colectaron orugas adultas y sus pelos se trituraron en solución salina, obteniendo un extracto acuoso del que se determinó concentración de proteína, pH y osmolaridad y se evaluó su actividad citotóxica sobre mastocitos mediante el ensayo del azul tripán. La activación *in vitro* de mastocitos por el extracto se analizó mediante la cuantificación de histamina secretada por espectrofluorometría y por medio del análisis microscópico de las células teñidas con rojo rutenio. La reacción cutánea se evaluó por la extravasación generada tras la inyección intradérmica del extracto y la reacción sistémica por medio de la inyección intravenosa del mismo, registrando temperatura, signos de anafilaxia sistémica y presión arterial. En cada ensayo se utilizaron extractos acuosos con 0.22 y 0.45 µg de proteína/µl. El extracto presentó un pH de 5.5 y una osmolaridad equivalente a la del plasma sanguíneo, no generando citotoxicidad. El ensayo *in vitro* con rojo rutenio mostró un aumento de 2.86 y 3.04 veces el porcentaje de células activadas cuando los mastocitos fueron estimulados con el extracto en comparación con los mastocitos sin estímulo. Así mismo, ambas concentraciones del extracto acuoso indujeron un aumento significativo en la secreción de histamina por las células, de 1.92 y 4.35 veces respecto a la secreción espontánea. En la anafilaxia cutánea, el extracto nativo mostró un aumento de 1.4 veces la concentración de azul de Evans extravasado con respecto al extracto desnaturalizado. La inyección intravenosa del extracto no provocó signos característicos de choque anafiláctico, aunque si hubo una caída transitoria en la presión arterial (37%) y presencia de hemorragia en mucosa anal. Todos estos resultados demuestran que moléculas proteicas presentes en los pelos de *M. ehrenbergii* causan las reacciones urticantes generadas tras el contacto con la oruga, ocasionadas por activación de mastocitos cutáneos y liberación local de histamina. Además, una posible distribución sistémica de los componentes de los pelos por piquetes masivos podría ocasionar una caída transitoria en la presión arterial y hemorragias en mucosa anal.

ABSTRACT

Morpheis ehrenbergii is a clearly mexican Lepidoptera specie, of which we have the experience in Mexico that after contact with the caterpillar appears pruritus and urticaria reactions. Other species of Lepidoptera, are characterized because in their larval stage it has hairs that have capacity for induce urticaria. The aim of this work was to study physicochemical properties of aqueous extract obtained from the hairs of caterpillar *M. ehrenbergii* and its capacity inducing local and systemic anaphylactic response. Adult caterpillars were collected and their hairs were triturated in saline solution, obtaining an aqueous extract that was determined protein concentration, pH and osmolarity and it was evaluated for cytotoxic activity on mast cells by trypan blue assay. *In vitro* activation of mast cells by the extract was analyzed by quantification of histamine secreted by spectrofluorometry and through microscopic analysis of cells stained with ruthenium red. Cutaneous reaction was evaluated by the plasma extravasation induced after intradermal injection of the aqueous extract and systemic reaction by recording temperature, signs of systemic anaphylaxis and blood pressure after intravenous injection of the extract. In each assay aqueous extract were used at 0.22 and 0.45 μg of protein/ μl . The extract exhibited a pH of 5.5 and an osmolarity equivalent to that of blood plasma, generating no cytotoxicity. *In vitro* assay with ruthenium red shows 2.86 and 3.04-fold more activated mast cells stimulated with the extract, than mast cells without stimulation. Likewise, both concentrations of aqueous extract induced 1.92 and 4.35-fold increase in histamine secretion compared to the spontaneous one. In cutaneous anaphylaxis, native extract showed an increase of 1.4 times in concentration of Evans blue extravasated compared to denatured extract. Intravenous injection of the extract does not cause characteristic signs of anaphylactic shock in animals, although there was a slight fall in blood pressure (37%) and presence of mucosa bleeding. These results demonstrate that protein molecules present in the hair of *M. ehrenbergii* are able to cause urticaria reaction after contact with the caterpillar, caused by activation of skin mast cells and local release of histamine. Moreover, a systemic distribution of the components of hairs by mass pickets may result a transitory fall in blood pressure and mucosal bleeding.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Respuesta Inmune innata

El sistema inmune incluye dos subsistemas principales, de resistencia innata y el adaptativo. Tanto el sistema innato como el adaptativo interactúan continuamente entre sí para proporcionar una respuesta inmune eficaz (Clem, 2011).

El sistema inmune innato proporciona una primera línea de defensa contra agentes patógenos. Sin embargo, estas respuestas no son específicas para un agente patógeno particular y carecen de memoria inmunológica. Las células inmunitarias innatas responden específicamente a patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs que son estructuras moleculares conservadas y compartidas por los microorganismos pertenecientes a un mismo grupo (bacterias, virus, hongos, parásitos helmintos, protozoarios). Esto previene al sistema inmune innato de reconocer inadvertidamente células huésped y atacarlas (Clem, 2011). Estos PAMPs son reconocidos a través de receptores de reconocimiento de patrones o PRRs. Algunos PRRs están asociados a las membranas de las células y otros son solubles. Ejemplos de PRRs incluyen, proteína surfactante pulmonar, proteína C reactiva, receptores tipo toll (TLR), lectinas tipo C y receptores tipo dominio de unión a nucleótidos (NOD). El reconocimiento de los PAMPs por los PRR conduce a la activación del complemento, a la opsonización y a la activación de las células y liberación de citocinas u otros mediadores inflamatorios (Clem, 2011).

Las barreras naturales como la piel y las mucosas (Castrillón *et al*, 2008) constituyen una de las principales líneas de defensa de la inmunidad innata. Estas barreras físicas se refuerzan con la acidez cutánea y gástrica, las lisozimas y las colectinas, entre otros (Epstein *et al*, 1997).

Las células de la epidermis (queratinocitos, de Langerhans, melanocitos), linfocitos T gamma-delta (linfocitos T intraepiteliales), linfocitos natural killer (NK), fagocitos mononucleares, mastocitos y células granulocíticas también son importantes elementos de la respuesta inmune innata y ayudan a unir la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa. En general todas las células de la inmunidad innata son necesarias para desarrollar una respuesta inmune eficaz a través de la interacción directa célula-célula o mediante la secreción de mediadores solubles. (Clem, 2011).

OTROS ELEMENTOS ANTIMICROBIANOS INNATOS IMPORTANTES SON LAS VÍAS ALTERNAS Y DE LECTINAS DEL COMPLEMENTO, LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (DEFENSINAS, CATELICIDINAS E HISTATINAS), LAS CITOCINAS, LAS QUIMIOCINAS Y LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y NITRÓGENO (CASTRILLÓN ET AL, 2008). LOS ELEMENTOS DEL COMPLEMENTO FORMAN PARTE DE LA OPERSONIZACIÓN O AUMENTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ANTÍGENOS PARTICULADOS A LA FAGOCITOSIS Y EN EL desencadenamiento de una respuesta inflamatoria localizada.

La respuesta inflamatoria es otra parte esencial de la respuesta inmune innata. Es la reacción del cuerpo a la invasión de un agente infeccioso o cualquier tipo de daño físico. La respuesta inflamatoria dirige productos del sistema inmune al área de infección o daño y es caracterizada por los signos cardinales de enrojecimiento, calor, dolor, tumefacción y pérdida de la función (Clem, 2011).

1.2 Inflamación

La inflamación es una serie de reacciones homeostáticas que involucra a los mecanismos inmunológicos humorales y celulares para proteger al organismo. Si esta reacción resulta exagerada o crónica, no cumple su función y ocurren cambios patológicos.

Se caracteriza por una reacción vascular inicial a un estímulo localizado (reconocimiento antigénico o lesión tisular) con liberación de mediadores vasoactivos, una reacción celular de reclutamiento de células inflamatorias (leucocitos inmunocompetentes) que depende de la adhesión leucocitaria, y una reacción tisular en la que los leucocitos liberan mediadores inflamatorios, provocando los efectos deseados (eliminación del antígeno) o no (destrucción tisular) (Von Andrian y Mackay, 2000).

1.2.1 Reacción vascular

Cuando algún agente externo actúa sobre los mastocitos, provoca la liberación de histamina. Esto induce la activación del endotelio y vasodilatación, con incremento del flujo sanguíneo local, con optimización de la llegada de los leucocitos al sitio de inflamación e incremento del tiempo de permanencia o residencia de los leucocitos en la superficie vascular (Macías, 2006).

1.2.2. Reacción celular: reclutamiento de células inflamatorias

El fenómeno inflamatorio se desencadena por diferentes estímulos que inducen la liberación de mediadores proinflamatorios endógenos, que a su vez inducen la activación endotelial. El endotelio activado incrementa la expresión de diferentes moléculas de adhesión, que incluyen la E y P-selectinas, proteína vascular de adhesión celular-1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Además, las células endoteliales activadas liberan factores quimiotácticos con efectos sobre la síntesis de factores procoagulantes y una mayor susceptibilidad a la apoptosis. Los factores endógenos que inducen activación endotelial son sintetizados principalmente por los macrófagos, como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la interleucina (IL) -1 y el interferón (IFN) γ . El TNF es el principal estímulo que induce la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio activado. Una vez que el endotelio es activado, la extravasación de los leucocitos transita por los 4 pasos conocidos: rodamiento, activación, adhesión y migración transendotelial (Von Andrian y Mackay, 2000).

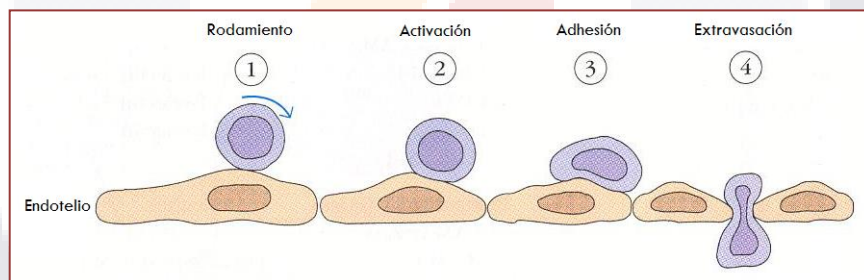


Fig. 1. Representación esquemática de la migración transendotelial o diapédesis. (Kuby, 2007).

Es importante mencionar que otro elemento clave en el fenómeno inflamatorio es el estímulo quimiotáctico, responsable de la atracción de los leucocitos al foco inflamatorio. Diferentes factores solubles son capaces de inducir quimiotaxis, incluyendo el factor de activación plaquetario (FAP), algunos leucotrienos, las prostaglandinas y el fragmento del complemento C5a. Sin embargo, el principal estímulo de extravasación leucocitaria son las quimocinas, polipéptidos de bajo peso molecular sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares, como las células endoteliales, las plaquetas y los leucocitos. Los principales efectos de las quimocinas sobre los leucocitos además de la quimioatracción son la inducción de activación celular y la regulación de la actividad de las integrinas leucocitarias (Macías, 2006).

1.2.3. Reacción tisular

Cuando ocurre una reacción o cambio en el tejido celular vivo se da una reacción tisular caracterizada por una respuesta inflamatoria donde leucocitos liberarán mediadores inflamatorios, obteniendo como desenlace la eliminación del antígeno que ha causado el proceso de inflamación o de destrucción del tejido (Macías, 2006), junto con el inicio de la cicatrización o reparación de los tejidos afectados

1.3 Mastocitos

Los mastocitos derivan de células madre hematopoyéticas. Normalmente circulan como progenitores inmaduros que ingresan a sitios periféricos para después madurar a nivel local. En vertebrados, los mastocitos son ampliamente distribuidos en todo tejido vascularizado, en particular cerca de superficies expuestas al ambiente externo, incluyendo la piel, vías respiratorias y tracto gastrointestinal. Los mastocitos están bien posicionados para ser una de las primeras células del sistema inmune para interactuar con antígenos ambientales, toxinas derivadas del medio ambiente o patógenos (Kitamura, 1989; Galli *et al*, 2005a).

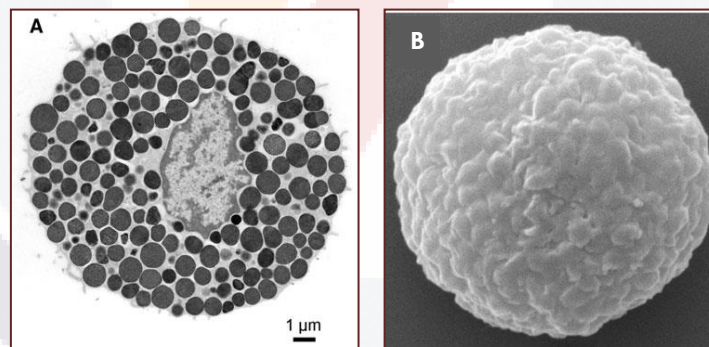


Fig. 2. Mastocito peritoneal intacto de rata mostrado por micrografía electrónica de transmisión (A) y micrografía electrónica de barrido (B) (Lundesquist y Pejler, 2010).

Los mastocitos son células de larga vida que pueden volver a entrar al ciclo celular y proliferar después de una estimulación adecuada. Dependiendo de sus características, la expansión local de poblaciones de mastocitos puede ocurrir por diversos procesos además de su proliferación, incluyendo la supervivencia y/o la maduración local de los progenitores. El incremento en el número de mastocitos, y cambios en su distribución a tejidos y/o características fenotípicas puede ocurrir durante las respuestas Th2 y otros factores asociados con la inflamación persistente. Las respuestas Th2 también están

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

asociadas con un mayor número de basófilos circulantes y células hematopoyéticas que pueden secretar mediadores, como histamina, que es también producida por los mastocitos (Galli y Tsai, 2010). Se ha demostrado que los mastocitos poseen una serie de funciones beneficiosas, sobre todo en el contexto de la inmunidad innata a las bacterias y los parásitos (Lundequist y Pejler, 2010).

Los factores ambientales y genéticos pueden controlar muchas características clave de poblaciones de mastocitos. Estas características incluyen proliferación celular, supervivencia, y fenotipo, así como la susceptibilidad de los mastocitos a la activación por varios estímulos generados durante la respuesta inmune innata o adquirida (Galli y Tsai, 2010).

Además de jugar un papel importante en la promoción protectora de la respuesta inmune innata y adaptativa y ser importantes para la tolerancia inmune (Moon *et al*, 2010), los mastocitos dirigen varios procesos biológicos en la piel, tales como la cicatrización y la remodelación tisular. Su participación en estos procesos puede ser efectuada directamente por la inducción de la proliferación de células epiteliales, fibroblastos y angiogénesis o indirectamente por la interacción con el sistema nervioso de una manera bidireccional. Esta interacción mastocito-neurona está involucrada además en la supresión inmune inducida por radiación UV y en la inflamación de la piel estimulada por la activación local del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) (Rao y Brown, 2008).

Por otra parte, se han descrito dos subtipos principales de mastocitos en roedores: mastocitos de la mucosa (MMC) y mastocitos del tejido conectivo (CTMC). Éstos difieren en localización, tinción histoquímica, contenido de proteasa y proteoglicanos y factores de crecimiento que requieren para su diferenciación (Rao y Brown, 2008).

Los MMC son encontrados principalmente en la mucosa del intestino y pulmones, sus gránulos contienen sulfato de condroitina como principal proteoglicano, preferencialmente dos tipos de quimasas (proteasas de mastocitos de ratón [mMCP]-1, -2) y relativamente menor cantidad de histamina (Ruitenbergh y Elgersma, 1976). Las CTMC se encuentran principalmente en la piel y cavidad peritoneal, sus gránulos contienen heparina, grandes cantidades de histamina y dos tipos de quimasas (mMCP-4,

-5), dos tipos de triptasas (mMCP-6, -7) y carboxipeptidasa A. Su desarrollo no depende de células T (Kitamura, 1989).

Una de las rutas principales por las cuales los mastocitos pueden afectar una condición dada es a través de efectos mediados por los diversos compuestos preformados (mediadores) que se almacenan en sus gránulos secretores y se liberan cuando ocurre la desgranulación de los mismos. La desgranulación de mastocitos se puede lograr por diferentes mecanismos, del cual la unión de antígenos multivalentes a moléculas IgE unidas al receptor IgE de alta afinidad, FcεRI, es la vía mejor caracterizada (Blank, 2004; Rivera *et al*, 2008). Además, la desgranulación de mastocitos puede ser desencadenada por diversos mecanismos, incluyendo la exposición a anafilotoxinas, factor de células madre, endotelina-1 y diversos neuropéptidos (Galli *et al*, 2005a).

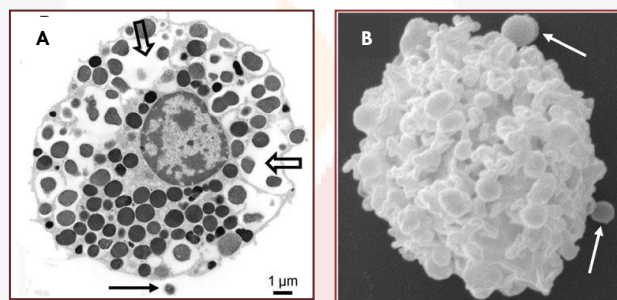


Fig. 3. Mastocito peritoneal desgranulado de rata mostrado por micrografía electrónica de transmisión (A) y micrografía electrónica de barrido (B). Las flechas en bloque indican regiones donde múltiples gránulos se han fusionado; las flechas representan un remanente de gránulo excitado (Lundesquist y Pejler, 2010).

Sin embargo, la activación del mastocito no solamente induce la desgranulación, sino también la síntesis *de novo* y secreción de otros mediadores no almacenados. Como consecuencia, tras la activación celular se induce la liberación de tres tipos de sustancias: 1) mediadores preformados en los gránulos y secretados a través de la desgranulación, que es un sello distintivo de la respuesta de los mastocitos (Rao, 2008); 2) mediadores lipídicos, sintetizados *de novo*, tras la activación de los mastocitos, de los cuales los de mayor importancia son los derivados del metabolismo del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Rodríguez, 2007); y 3) otros mediadores de nueva síntesis que se producen tras la expresión génica, entre los que destacan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Rao, 2008). La desgranulación y la síntesis *de novo* pueden ocurrir juntas o por separado. La liberación de mediadores preformados

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiene lugar por un proceso conocido como desgranulación, como ya se ha mencionado, y puede ocurrir por desgranulación anafiláctica o por desgranulación fragmentada. En el primer caso, el contenido de la mayoría de los gránulos es liberado rápidamente por exocitosis compuesta (Pickett y Edwardson, 2006). Esta desgranulación masiva es responsable de la hipersensibilidad inmediata tipo I y de la respuesta inmediata de los mastocitos a los patógenos (Crivellato *et al*, 2002).

Los mediadores asociados a los gránulos incluyen histamina, serotonina, proteoglicanos, proteasas y algunas citocinas tal como TNF- α y son almacenados como estructuras insolubles dentro de los gránulos a través de interacciones de carga. Cuando ocurre la desgranulación, algunos mediadores se convierten inmediatamente en solubles (como la histamina) mientras que la mayoría de las estructuras permanecen insolubles, lo cual permite la retención de otros mediadores (tal como TNF- α) que son liberados lentamente en un periodo de tiempo mayor (Metcalf *et al*, 1997).

El papel específico de los mediadores asociados a mastocitos puede ser investigado *in vivo* mediante ensayos experimentales en animales en los cuales ese mediador en particular ha sido eliminado (principalmente por delección o bloqueo de la expresión del gen que lo codifica), sin influir significativamente sobre la expresión de otros productos de los mastocitos. Estos ensayos han ayudado a describir el papel de estos mediadores *in vivo* (Galli y Tsai, 2010).

1.3.1. Compuestos granulares de los mastocitos

1.3.1.1. Aminas biogénicas

La histamina es uno de los mediadores más conocido de los mastocitos. La histamina preformada es un componente importante de los gránulos de los mastocitos, y su liberación acompaña la desgranulación de los mismos (Riley, 1953). La histamina se sintetiza en un solo paso, por la descarboxilación de la histidina, en una reacción catalizada por la histidina descarboxilasa (HDC). En consecuencia, la HDC es expresada por los mastocitos (Rothschild, 1959; Ringvall, 2008) y aumentan los niveles de la expresión de HDC durante el proceso de maduración de los mastocitos (Ringvall, 2008). La histamina posee una gran variedad de actividades biológicas, incluida la inducción

de la vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y contracción del músculo liso bronquial (Lundequist, 2010).

El papel de la histamina se ha establecido en numerosas condiciones patológicas, incluyendo inflamación en las vías respiratorias por alergia, anafilaxis sistémica, aterosclerosis y encefalitis autoinmune experimental (Ohtsu, 2008). Otra amina presente en los gránulos es la serotonina, de la cual Kushnir, *et al* (2007) demostraron que los mastocitos derivados de sangre periférica contienen serotonina y que los niveles de este componente en plasma estuvieron elevados en algunos pacientes con mastocitosis.

Evidencia limitada sugiere que la dopamina también puede ser sintetizada y almacenada en los mastocitos, y que la activación de los mastocitos resulta en la eliminación de la dopamina asociada a la célula, sugiriendo que la dopamina está presente dentro de los gránulos del mastocito (Freeman, 2001).

1.3.1.2. Enzimas lisosomales

Los gránulos de los mastocitos contienen un número importante de componentes que también están presentes en los lisosomas. De las enzimas lisosomales que se sabe están presentes en los gránulos de los mastocitos, la β -hexosaminidasa es la más conocida, ya que está presente en todos los gránulos de todos los subtipos y tipos de mastocitos. Su liberación es frecuentemente usada como un medio para cuantificar el grado de desgranulación (Lundequist, 2010). La desgranulación de mastocitos también lleva a la liberación de enzimas degradadoras de sacáridos, incluyendo la β -glucuronidasa, β -D-galactosidasa y aril sulfatasa A (Schwartz *et al*, 1981). También se sabe que los gránulos de los mastocitos contienen varias proteasas lisosomales, por ejemplo, catepsinas y proteasas de ácido aspártico (Wolters *et al*, 2000; Dragonetti *et al*, 2000).

Todas las enzimas lisosomales tienen un pH bajo óptimo, sin embargo, varias catepsinas lisosomales poseen considerable actividad enzimática después de la liberación celular. Por lo tanto, no puede ser excluido que las enzimas lisosomales secretadas como consecuencia de la desgranulación de mastocitos puedan ejercer funciones extracelulares (Lundequist y Pejler, 2010).

1.3.1.3. Proteoglicanos

Desde hace un largo tiempo se reconoce que el proteoglicano serglicina es un principal constituyente de los gránulos de los mastocitos. La serglicina, como todos los proteoglicanos, contiene un núcleo de proteína al cual están unidas cadenas de glicosaminoglicano fuertemente sulfatadas. La naturaleza de las cadenas de glicosaminoglicanos unidas al núcleo de proteína de la serglicina varía ampliamente, dependiendo del tipo de célula en el cual la serglicina es expresada (Lundequist, 2010).

1.3.1.4. Proteasas

Las proteasas construyen más del 25% del total de proteínas en los gránulos de los mastocitos (Schwartz, *et al.* 1987). El término proteasa de mastocito usualmente se refiere a un número de enzimas que son específicamente expresadas por mastocitos, incluyendo proteasas del tipo triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A (Lundequist, 2010).

Diferentes tipos de mastocitos expresan proteasas no específicas de mastocitos, como la catepsina G (Schechter *et al.*, 1990), una serinproteasa también expresada por neutrófilos. También se ha demostrado que los mastocitos derivados de sangre periférica en humanos contienen metaloproteasa 9, y que los mastocitos cardiacos de humano contienen renina (Silver *et al.*, 2004).

Recientemente se ha descubierto que los mastocitos expresan y almacenan grandes cantidades de granzima B, una serinproteasa principalmente implicada tanto en la apoptosis como en el remodelado de la matriz extracelular (Pardo *et al.*, 2007).

1.3.1.5. Citocinas

Un número de diferentes citocinas y factores de crecimiento pueden ser almacenadas en los gránulos, incluyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la IL-4, IL-15, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor transformador del crecimiento β (TGF- β) y el factor de células madre (SCF). La desgranulación mediada por IgE en

varios tipos de mastocitos incluyen la rápida liberación de TNF- α , TGF- β , NGF, SCF y IL-4 (Lundequist, 2010).

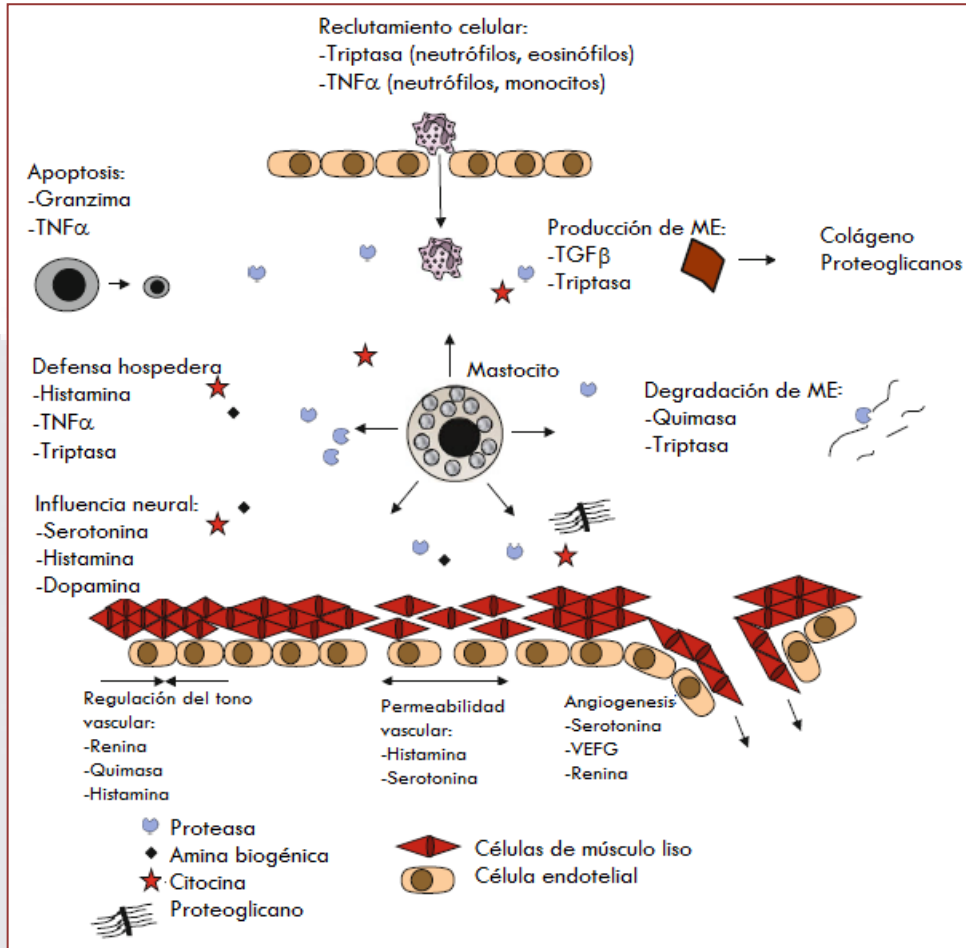


Fig. 4. Ejemplos de funciones biológicas de mediadores secretados, preformados en mastocitos (Lundesquist y Pejler, 2010).

1.3.1.6. Otros componentes de los gránulos

La proteína básica principal (MBP) de eosinófilo ha sido identificada en mastocitos a partir de especímenes cutáneos y nasales, a pesar de que los mastocitos normales de piel no tiñen para MBP (Butterfield *et al*, 1990). También la peroxidasa puede estar presente en los gránulos de mastocitos así como heparanasa, una enzima involucrada en la degradación de la heparina. También los gránulos de mastocitos contienen LL-37 preformado, un péptido antimicrobiano que pertenece a la familia de las catelicidinas, lo cual sugiere que la desgranulación de los mastocitos pudiera liberar actividad antibacteriana directa (Lundequist, 2010).

1.3.2. Compuestos lipídicos de nueva síntesis

1.3.2.1. Leucotrienos

Los mediadores derivados del ácido araquidónico, inducidos por la vía de la lipooxigenasa en mastocitos y basófilos son los leucotrienos y especialmente el LTC₄ y sus productos de degradación LTD₄ y LTE₄. Este tipo de leucotrienos presentan receptores específicos en las células de la musculatura lisa, induciendo una broncoconstricción prolongada (McFadden y Gilbert, 1992). LTC₄, al igual que la histamina, contribuye a la patogénesis de las respuestas alérgicas, a la broncoconstricción y vasodilatación (Rao, 2008).

1.3.2.2. Prostaglandinas

La prostaglandina D₂ (PGD₂) es uno de los mediadores lipídicos derivado del ácido araquidónico por la acción de la ciclooxigenasa (COX) de los mastocitos; y una vez secretada actúa mediante su unión a receptores específicos presentes en las células musculares lisas, ejerciendo una acción broncoconstrictora y vasodilatadora, así como quimiotractante para los neutrófilos, que se acumulan en el foco de la inflamación (Rodríguez, 2007).

1.4. Anafilaxia sistémica

La anafilaxia es una reacción severa y multisistémica que ocurre repentinamente después del contacto con determinadas sustancias, principalmente alérgenos. La presentación clásica incluye urticaria o angioedema, hipotensión y broncoespasmo. En los humanos (Simons, 2009), la anafilaxia es el resultado de la desgranulación de los mastocitos los cuales liberan mediadores inflamatorios inmunes. Estos mediadores causan el incremento en la permeabilidad vascular, vasodilatación periférica e incremento en la producción de moco (Tupper, 2010).

En los humanos, la mayoría de los detonantes llevan a la anafilaxia a través de un mecanismo que involucra el entrecruzamiento de IgE y la agregación de FcεRI en mastocitos y basófilos, mediada por alérgeno (Simons, 2009). En la anafilaxia, otros

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismos inmunológicos que no involucran IgE son menos comunes. Estos incluyen complejos antígeno-IgG, activación de complemento y sistema de coagulación, y posiblemente mecanismos tales como la citotoxicidad, activación de células, liberación de neuropéptido (Sustancia P), o autoinmunidad. Perturbaciones no inmunes de mastocitos y basófilos causados por el ejercicio o exposición al aire frío también puede conducir a la anafilaxia (Simons *et al*, 2007 y Schwartz, 2008).

Independientemente del detonante y del mecanismo de iniciación, eventos celulares en mastocitos y basófilos que implican la activación de tirosinquinasa y la entrada de calcio resultan en la rápida liberación de mediadores preformados en los gránulos tales como histamina, triptasa, carboxipeptidasa A3, quimasa y proteoglicanos.

La posterior activación de fosfolipasa A2, COXs y lipooxigenasas conduce a la producción de metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos (Ono, 2009), y la síntesis del factor activador de plaquetas. Además, citocinas y quimiocinas son sintetizadas y liberadas, incluyendo IL-6 y TNF- α , que es tanto un mediador de fase tardía como un mediador preformado (Peavy, 2008).

La anafilaxia se relaciona de manera importante con los mastocitos, ya que se produce rápidamente y de forma sistémica, afectando uno o más sistemas de órganos, por lo general en aquellos sistemas donde los mastocitos residen en mayor abundancia (Sampson *et al*, 2005 y Simons, 2008). Detrás de la fisiopatología de la anafilaxia se encuentra por lo tanto la exposición a alérgenos u otros factores que activan mastocitos o basófilos, lo que provoca la desgranulación y liberación inmediata (5-30 minutos) de mediadores preformados (histamina, triptasa, carboxipeptidasa A, y proteoglicanos), síntesis de metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), y factor activador de plaquetas (PAF), y en la fase retardada (2-6 horas) la generación de citocinas (TNF- α) y quimiocinas como resultado del incremento en la expresión génica. Estos mediadores son los responsables de los signos y síntomas que pueden estar presentes y relacionados al tracto respiratorio (edema laríngeo y broncoespasmo), sistema cardiovascular (hipotensión y arritmias), epidermis y dermis (urticaria y angioedema), y tracto gastrointestinal (náusea y vómito) (Metcalf, 2009).

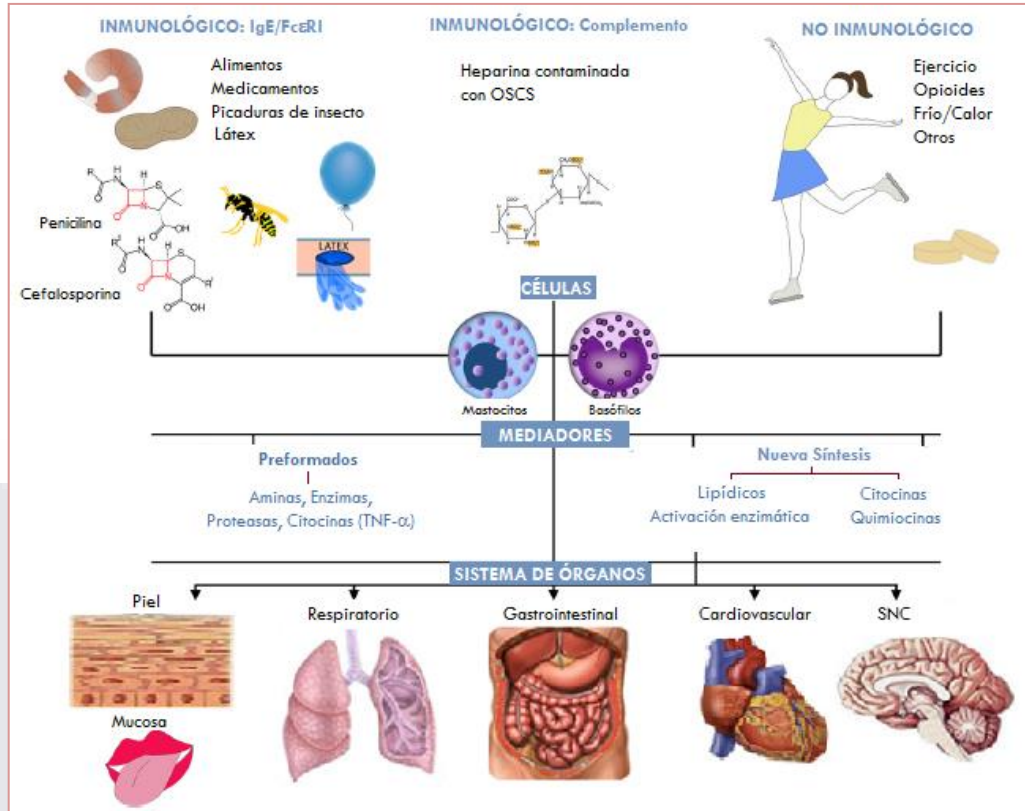


Fig. 5. Reacción anafiláctica: mecanismos y detonantes, células, mediadores, y sistema de órganos. (Simons, 2009)

Así, si un alérgeno se administra de forma sistemática o es rápidamente absorbido en el intestino, los mastocitos del tejido conectivo asociados a todos los vasos sanguíneos pueden activarse. Esta activación provoca un síndrome muy peligroso denominado anafilaxia sistémica. La activación diseminada de los mastocitos provoca un amplio aumento de permeabilidad vascular, que conduce a una catastrófica pérdida de presión sanguínea, constricción de las vías aéreas y edema de la epiglotis, que puede producir asfixia; este síndrome se denomina choque anafiláctico (Janeway, 2000).

Se han demostrado dos vías distintas de anafilaxia sistémica en ratones (Finkelman, 2005; Strait, 2002): una mediada por mastocitos, IgE, FcεRI e histamina, y una vía alternativa que involucra IgG, macrófagos y factor activador de plaquetas (PAF).

1.5. Anafilaxia cutánea

La anafilaxia cutánea es un modelo utilizado para evaluar activación de mastocitos cutáneos (Inagaki *et al*, 1986). Se utiliza como un modelo experimental para estudiar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinadas reacciones cutáneas de los humanos (alérgicas y no alérgicas) y representa las características clínicas de la urticaria humana.

La urticaria es una enfermedad común que ocurre en el 15 al 25 % de los individuos en algún momento de sus vidas. Se caracteriza por lesiones edematosas de coloración rojo a rosa, que generan prurito. Las lesiones pueden variar en tamaño de unos pocos milímetros a varios centímetros de diámetro, y son transitorias en la mayor parte de los casos, alcanzando su máximo desarrollo en 15 a 20 minutos y no durando más de 48 horas. Los mastocitos son la principal célula efectora en la urticaria, debido a que tras su activación liberan rápidamente varios mediadores inflamatorios, tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas, los cuales causan vasodilatación y extravasación de plasma por debajo de la piel formando un edema (Kanani, et al., 2011; Goldsby, 2004).

La urticaria se clasifica generalmente como aguda, crónica o física, dependiendo de la duración de los síntomas y la presencia o ausencia de los estímulos inductores. La urticaria aguda se refiere a lesiones que ocurren en menos de 6 semanas, y la urticaria crónica a lesiones que se producen durante más de 6 semanas (Kaplan, 2004). La urticaria física representa un subgrupo distinto de urticaria crónica que es inducida por estímulos físicos externos, tales como rasguños, frío, calor, luz solar y presión.

Las causas más comunes de urticaria aguda son medicamentos, alimentos, infecciones virales, infecciones parasitarias, veneno de insectos y alérgenos por contacto (látex). En general, la urticaria crónica es clasificada como urticaria crónica autoinmune o urticaria crónica idiopática (Fonacier *et al*, 2010 y Kaplan, 2004) que conduce a la estimulación crónica de mastocitos y basófilos, así como a la liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios causantes de urticaria. La urticaria física es detonada por estímulos físicos, siendo la más común el dermatografismo, en la cual las lesiones se crean en la piel una vez que ésta ha sido arañada. Las lesiones producidas por estímulos físicos están típicamente localizadas en el área estimulada y a menudo se aclaran en 2 horas (Kaplan, 2004).

1.6 ANTECEDENTES

1.6.1. Efecto del extracto urticante de diversos Lepidópteros

En Francia y en la Guyana francesa tres diferentes lepidópteros causan reacciones cutáneas en el hombre y animales. En Francia, las orugas procesionarias del pino (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.) y la oruga procesionaria del roble (*Thaumetopoea processionea* L.) son responsables de causar una dermatitis conocida como erucismo. En la Guyana Francesa, polillas del género *Hylesia* y especialmente *Hylesia urticans* causa una dermatitis conocida como *Lepidopterismo*.

El contacto con los pelos urticantes de las orugas y polillas son los responsables de la dermatitis. Estos pelos sirven para proteger a la oruga y sus huevos contra depredadores, pero también son peligrosos para el hombre y animales. Los pelos de la procesionaria del pino causan una reacción cutánea en hombres y animales a través de la descarga de una sustancia tóxica. La fracción irritante extraída de los pelos contiene proteínas solubles. Una de 28 kDa es específica del pelo y causa una reacción en la piel de cerdo idéntica a la producida por el extracto crudo de pelo. A esta proteína urticante se le ha nombrado taumatopenia (Novak *et al*, 1987).

Thaumetopoea pityocampa y *Th. Processionea* presentan similitudes en cuanto a morfología, ya que ambas poseen pelos de idéntico tamaño y forma (150-250 μm), así mismo, los pelos surgen de una estructura denominada hipodermo, la cual se caracteriza por producir la sustancia urticante presente en los pelos, los cuales además, están protegidos por estructuras tegumentarias (Novak *et al*, 1987). El extracto urticante de las orugas contiene alrededor de 17 proteínas solubles de origen glicolipoprotéico. Novak *et al* (1987) demostraron la presencia de la proteína tipo taumatopenia en los pelos de orugas procesionarias del roble.

Por otra parte, los pelos son incapaces de regenerarse después de una depilación experimental. Éstos están dentro de un hueco y poseen puntas inclinadas hacia el extremo distal. No hay agujeros o poros sobre el pelo y el factor irritante solo puede ser obtenido quebrando el pelo. Esto sugiere que cuando ocurre un punzado el pelo es quebrado en la piel y la sustancia es liberada. Experimentalmente, este factor

incrementa el contenido de histamina de varios tejidos y causa una reacción en la piel del cobayo, probablemente producida por mediadores liberados por los mastocitos. Se ha demostrado que la desgranulación de los mastocitos por esta sustancia es dependiente de la dosis y el calentamiento, por su parte, reduce significativamente el efecto, sugiriendo que esta sustancia es de naturaleza proteica (Lamy *et al*, 1985).

De acuerdo con Lamy *et al* (1985), estudios comparativos de proteínas del pelo, cutícula y hemolinfa indican que proteínas contenidas en el pelo de alto peso molecular presentan algunas similitudes con proteínas de la hemolinfa, mientras que proteínas de bajo peso molecular muestran similitud a proteínas cuticulares. Como los pelos son parte de la producción cuticular de las orugas, las proteínas cuticulares forman los constituyentes principales de los pelos urticantes.

El peso molecular de la taumatopenia es aproximadamente 28,000 Da y está formada por dos subunidades: una de 13,000 y otra de 15,000 Da. Esta proteína parece ser diferente a las proteínas tóxicas de *Thaumetopoea wilkinsoni*, con movilidad electroforética en el rango de albúmina y α , β y γ globulinas (Ziprkowsky y Rolant, 1966).

Las reacciones o síndromes específicos causados por insectos del género Lepidoptera incluyen: erucismo (reacción cutánea al contacto con orugas, polillas o capullos), lepidopterismo (reacción sistémica), oftalmia nodosa (afección ocular), dendromiliasis (síntomas en articulaciones relacionados con algunas especies de orugas), lonomismo (enfermedad hemorrágica severa relacionada con especies de *Lonomia*) y ataxia estacional (relacionada con la ingesta de *Anaphe venata*) (Hossler *et al.*, 2009).

Morpheis ehrenbergii es una especie de Lepidóptero netamente mexicana. Se extiende por todo el lado del pacífico, desde la parte norte de Sinaloa y parte limítrofe de Durango por toda la Sierra Madre Occidental pasando por Jalisco, Michoacán, Guerrero hasta Oaxaca; el centro del país, Guanajuato, Estado de México, Puebla, hasta los límites de la Sierra Madre Oriental. Sus orugas son monófagas y se encuentran en árboles del género *Buddleia L.*, específicamente en *Buddleia sessiliflora* (Kunth) (Vázquez, 1934), cuyo nombre vulgar en México hace referencia al “tepozán”. Se observan de este Lepidóptero tres generaciones en el año, la primera proviene de huevos depositados a fines de octubre. Su desarrollo depende del clima invernal,

retardándose con el frío y adelantándose con temperaturas favorables. En marzo se encuentran orugas adultas que dan las mariposas de la primera generación en el mes de abril. Los adultos de la segunda generación se encuentran desde la segunda mitad de julio hasta mediados de agosto. La tercera generación ocurre a fines de octubre. De estas tres generaciones, la más importante es la segunda, porque su mayor número de orugas causa mayores daños forestales.

El género *Morpheis* fue constituido por Huebner, posteriormente Kirby lo designó con el nombre de *Anemeca*; siendo muy cercano al género *Chlosyne*. Las orugas pequeñas miden 3 mm de longitud y son de color amarillo claro, cambiando a negro desde el tercer estado en adelante. En el primer estado están cubiertas de cerdas espinosas de color negro que nacen de bases pequeñas de color café. Conforme crece la oruga, las citadas cerdas se transforman en tubérculos oscuros y cubiertos de espinas (Vázquez, 1934).

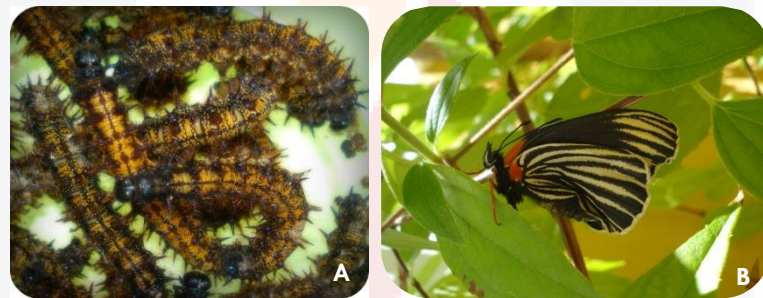


Fig. 6. Oruga (A) y Mariposa (B) de *Morpheis ehrenbergii*.

Se tiene la experiencia de que en México, la oruga *M. ehrenbergii* es una de las larvas del orden lepidóptera que ocasiona prurito y urticaria cuando se tiene contacto con los pelos de la misma (Comunicación personal), no existiendo información bibliográfica ni experimental al respecto, por lo que es importante analizar cuáles son los efectos que ocasiona a nivel inmunológico, ya que al igual que las orugas procesionarias del pino, *M. ehrenbergii* podría promover la liberación de histamina y por tanto inducir una respuesta anafiláctica.

II. JUSTIFICACIÓN

Las orugas procesionarias del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) cuentan con una secreción en sus pelos que usan como arma de defensa contra depredadores; dicha secreción causa daños considerables en el hombre, siendo la dermatitis (erucismo) y el lepidopterismo las enfermedades más conocidas.

El extracto urticante de los pelos de algunas orugas y polillas contienen principalmente proteínas de bajo y alto peso molecular, entre las cuales destaca la denominada thaumetopenia, que se cree es la principal causante del daño en el organismo humano. Cuando el extracto urticante entra en contacto con el organismo se genera un incremento de histamina, la cual es la causante de una reacción cutánea caracterizada por prurito.

El sistema inmunitario actúa como defensa cuando el organismo está expuesto a agentes patógenos. Sin embargo, pueden ocurrir reacciones desfavorables que involucran células del sistema inmune en respuesta a sustancias tóxicas o venenos. En este estudio se pretende analizar los efectos inflamatorios causados por el extracto crudo de los pelos de la oruga *Morpheis ehrenbergii*, así como la respuesta anafiláctica local y sistémica inducida por el mismo.

III. HIPÓTESIS

La exposición al extracto urticante de los pelos de la oruga *Morpheis ehrenbergii* produce una reacción inflamatoria asociada a la anafilaxia local y sistémica.



IV. OBJETIVOS

4.1 General

Estudiar el efecto del extracto urticante de la oruga *Morpheis ehrenbergii* sobre la respuesta anafiláctica local y sistémica.

4.2 Particulares

- 1) Estudiar algunas características fisicoquímicas del extracto crudo de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii*.
- 2) Analizar *in vitro* el efecto del extracto proveniente de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii* sobre los mastocitos, en relación a la secreción de histamina.
- 3) Evaluar *in vivo* la reacción cutánea generada por el extracto proveniente de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii*, en la rata.
- 4) Analizar *in vivo* la presión arterial y/o los signos de anafilaxia sistémica en respuesta a la exposición al extracto urticante, en la rata.

V. METODOLOGÍA

5.1. Obtención del extracto acuoso.

Se colectaron orugas adultas del género *Morpheis ehrenbergii* en el arroyo del campus de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), México. El procedimiento para la obtención del extracto se realizó según Vega (1999). Los pelos de 20 orugas se trituraron en 600 µl de solución salina (SS) al 0.85%. Por centrifugación (21,382 g por 15 min a 4° C) se obtuvo un extracto acuoso a partir del cual se determinaron pH, osmolaridad y concentración de proteína. El extracto se almacenó a -84 °C para pruebas posteriores.

5.2. Separación de proteína

a) Cuantificación de proteínas por medio del método de Bradford.

Se colocaron 3 ml del reactivo de Bradford (Azul Coomassie 0.12 M) en tubos de ensaye. Unos tubos se utilizaron como blanco y a otros se añadieron 4 y 8 µl del extracto acuoso. Se mezcló el contenido de cada tubo por medio de Vortex y se leyó absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro UV-Vis DU530 (Beckman, USA). Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva patrón construida con concentraciones crecientes de albúmina.

b) Electroforesis en gel de acrilamida al 7.5 %.

Para la electroforesis se utilizó una cámara Bio-Rad Mini PROTEAN-3. Se analizaron muestras del extracto con concentración creciente de proteína. Los cristales fueron limpiados con etanol al 70%. Posteriormente se armó la cámara de electroforesis y se preparó el gel separador a 7.5% de poliacrilamida: 4.5 ml de agua destilada, 2.5 ml de solución separadora (Tris base 3.2 M y SDS 0.013 M, pH 8.8) y 2.5 ml de solución de acrilamida (acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0.8%). Así mismo, se preparó el gel concentrante: 3.5 ml de agua destilada, 5 ml de solución concentrante (Tris base 0.44 M y SDS 0.013 M, pH 6.8) y 1.3 ml de solución de acrilamida (acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0.8%); agregando tanto al gel separador como concentrante 50 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% y 10 µl de tetrametil etilendiamina (TEMED).

Las muestras se llevaron a un volumen de 30 µl con la solución de carga: 2.5 ml de solución concentrante, 0.21 M SDS, 3.4 M Glicerol, 0.0058 M Azul de bromofenol y

0.00143 M β -mercaptoetanol, y una vez preparadas se llevaron a ebullición por 5 minutos. En tanto, se preparó la solución de corrida (0.11 M Trizma[®] base, 1.25 M glicina, 0.017 M SDS, pH 8.3). Transcurridos los 5 minutos de ebullición se retiró el peine, se colocaron las muestras en los pocillos correspondientes, se llenó la cámara de electroforesis con solución de corrida y se separaron las proteínas aplicando un campo eléctrico de 80 Volts.

c) Tinción de gel por azul de Coomassie.

El gel obtenido a partir de la electroforesis se colocó en solución Metano: Ac. Acético: Agua (45:10:45) por 15 minutos. Posteriormente se transfirió al colorante azul de Coomassie (0.12 M) por 20 minutos en agitación continua. Una vez teñido el gel se colocó nuevamente en la solución Metanol: Ac. Acético: Agua por 10 minutos, llevando a cabo 3 lavados de 10 minutos cada uno. Los marcadores de peso molecular fueron: miosina, 250 kDa; β -galactosidasa, 150 kDa; albúmina sérica, 100 kDa; anhidrasa carbónica, 75 kDa; inhibidor de tripsina, 50 kDa. El peso molecular de las principales bandas proteicas obtenidas en el extracto se determinó interpolando el valor experimental obtenido para cada proteína en forma de RF (coeficiente entre la movilidad de la proteína y la del frente de electroforesis) en la recta de calibración obtenida con los patrones de peso molecular. La representación del peso molecular de las proteínas patrón frente a su RF obtenido se ajustó a una recta mediante regresión lineal.

5.3. *Propiedades fisicoquímicas del extracto*

a) Determinación de pH del extracto. El pH se determinó utilizando varillas indicadoras de pH Metrix[®].

b) Determinación de osmolaridad del extracto. La osmolaridad se determinó utilizando el micro osmómetro OSMETTE (Precision Systems).

5.4 *Aislamiento de mastocitos peritoneales de rata*

Las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de éter. Las células del exudado peritoneal (CEP's) fueron obtenidas por lavados peritoneales con 20 ml de una solución buffer HEPES Tiroides (BHT) (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM, CaCl₂ 1 mM, Glucosa 5.6 mM y HEPES 12 mM a pH 7.4), suplementado con 1% de suero albúmina bovino (BSA). Las CEP's fueron lavadas en BHT-BSA enfriado en hielo, por centrifugación (180 g, 4°C, 6 minutos) y resuspendidas en 1 ml de BHT. Los mastocitos fueron

purificados usando un gradiente discontinuo Percoll de 30-80% (Salinas et al, 2004). Las células se centrifugaron a 220 g a 4°C por 20 minutos. El residuo de Percoll fue eliminado mediante dos lavados en BHT-BSA. La suspensión celular se llevó a 1 ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis) suplementado con suero de ternera fetal al 5% y antibióticos (penicilina 50 u/ml-streptomina 50 µg/ml) para proceder a determinar la pureza en mastocitos mediante análisis en microscopio óptico (Swift Instruments, Japón) y la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión del azul tripán. Se trabajó con suspensión de células con viabilidad $\geq 97\%$ y pureza $\geq 95\%$. Finalmente los mastocitos se sembraron en medio RPMI suplementado a la densidad requerida para cada ensayo.

5.5 Ensayo de citotoxicidad con mastocitos de rata, utilizando la prueba del azul tripán.

Para determinar citotoxicidad celular a suspensiones de 100,000 mastocitos se añadieron alícuotas del extracto acuoso para obtener una concentración final de 0.22 y 0.45 µg de proteína/µl en medio RPMI. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Como control negativo se incubó el mismo número de células en medio RPMI. Transcurrido el tiempo, se determinó la viabilidad celular mezclando 80 µl de azul tripán (0.9% en solución salina), 100 µl de medio RPMI y 20 µl del paquete celular. Se colocaron 10 µl de esta suspensión en cámara de Neubauer y se contaron los cuatro cuadrantes externos, tomando en cuenta células teñidas (muertas) y sin teñir (vivas) utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(No. de células contadas)(Factor de la cámara)(Factor de dilución)(ml de resuspendido celular)}{No. de cuadrantes}$$

Se utilizó un microscopio óptico (Swift instruments, Japón) y las células se observaron con el objetivo de 40x.

5.6. Microscopía óptica con rojo rutenio

Para el ensayo de activación se preparó una solución madre de rojo rutenio al 0.05% en solución amortiguadora fosfato salina (PBS): NaCl 0.084 M, KCl 0.0026 M, CaCl • 2H₂O 0.00068 M, Na₂HPO₄ 0.0040 M y KH₂PO₄ 0.0026 M Las células (3×10^5) se incubaron simultáneamente con el extracto acuoso a una concentración final de 0.22 o de 0.45 µg de proteína y una solución de rojo rutenio al 0.005% (v/v) en PBS estéril

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

durante 15 ó 30 minutos a 37°C. Como control positivo de estimulación las células se incubaron con Compuesto 48/80 (C48/80) (5µg/µl) en solución de rojo rutenio y como control negativo solamente en solución de rojo rutenio. Pasado el tiempo, la reacción se detuvo poniendo los tubos en hielo y una alícuota de 20 µl de cada una de las condiciones de ensayo fue analizada en cámara de Neubauer para el conteo de células. Los gránulos activados de los mastocitos se tornaron de color rojo y los mastocitos se clasificaron en tres estados: no estimulados, células con gránulos sin teñir y su membrana celular perfectamente definida; activados, con una mezcla de gránulos intracelulares teñidos y no teñidos de rojo y su membrana celular todavía bien delimitada; desgranulados, células con todos sus gránulos teñidos de rojo, la mayoría fuera de la célula y con pérdida del límite celular. Se utilizó un microscopio óptico Motic® (Canadá) y las células se observaron con el objetivo de 40x, reportando los resultados como porcentaje de mastocitos en cada estado en las diferentes condiciones de ensayo. Las fotografías se tomaron utilizando un microscopio óptico Motic® (Canadá) acoplado a cámara fotográfica, con un aumento de 40x y 100x.

5.7. Secreción de histamina

Se utilizaron tubos con 300,000 mastocitos cada uno. Las células fueron transferidas a tubos de 15 ml y centrifugadas a 180 g por 3 minutos a 4°C. Posteriormente se resuspendió el pellet en 3 ml de RPMI suplementado frío y se dividió en tres tubos con 100,000 células por tubo. Se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. A continuación las células fueron estimuladas con el extracto acuoso a una concentración final de 0.22 o de 0.45 µg de proteína en medio RPMI suplementado 30 minutos a 37°C. Como control positivo de secreción estimulada las células se incubaron con C48/80 (5µg/µl) y como control de secreción espontánea en RPMI. Una vez transcurridos los 30 minutos se paró la reacción colocando los tubos en hielo. Se centrifugaron las muestras a 180 g por 3 minutos a 4°C. Se tomaron 150 µl del sobrenadante y se transfirieron a tubos Eppendorf con 550 µl de BHT-BSA. El resto del sobrenadante se desechó y al pellet se le agregaron 500 µl de BHT-BSA frío, se agitó, se tomaron 150 µl del resuspendido y se pasaron a tubos Eppendorf con 550 µl de BHT-BSA. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 5 minutos para inactivar histaminasas. Posteriormente se agregaron 700 µl de ácido tricloroacético al 5%, se agitó y se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 16,435 g por 15 minutos en micro centrifuga. La histamina se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinó fluorométricamente utilizando el espectrofotómetro de luminiscencia LS50B (Perkin-Elmer Ltd, England) a partir de la reacción con el orto-ftaldialdehído (OPT), según el método de Shore *et al.*, 1959. Para ello, se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregaron 200 µl de NaOH 1 N. Posteriormente se agregaron 50 µl de OPT al 0.1% y se dejó reaccionar durante 4 minutos. Inmediatamente después se detuvo la reacción con 100 µl de HCl 3N. Las muestras se leyeron en el espectrofluorómetro a una longitud de emisión de 443 y una longitud de excitación de 355 nm. El porcentaje de histamina liberada se expresa calculando:

$$\left(\frac{\text{Histamina en sobrenadante}}{\text{Histamina en sobrenadante} + \text{Histamina en pellet}} \right) \times 100$$

5.8. Reacción anafiláctica cutánea

Se utilizaron 10 ratas Wistar macho de un peso de entre 160 y 200 g; 5 de ellas se inyectaron con 0.22 µg/µl del extracto y las 5 restantes con 0.45 µg/µl. Esta prueba se realizó en tres días. El primer día se durmió a la rata con éter y se rasuró el dorso de la misma con precaución. En el segundo día se anestesió a la rata con éter y se rasuró la cara interior del cuello. Inmediatamente después se inyectó en el dorso de forma intradérmica y por triplicado un volumen de 50 µl del extracto a concentración final de 0.22 o 0.45 µg/µl, así como 50 µl de un control negativo de solución salina (SS) y de dos controles positivos: histamina (0.004 µg/µl) y C48/80 (0.02 µg/ml); se señaló cada inyección con un marcador verde indeleble.



Fig. 7. Inyección intradérmica del extracto acuoso de los pelos de *M. ehrenbergii*.

Posteriormente se llevó a cabo la cirugía en la cual se dejó expuesta la vena yugular, e inmediatamente se inyectó el azul de Evans (34 mg de azul de Evans/kg del animal al 3% en solución salina). La reacción concluyó con el sacrificio del animal una vez transcurridos 30 minutos. Dicho sacrificio se llevó a cabo por sobredosis de éter. Posteriormente, se extrajo la piel del dorso, se midió el diámetro interno de cada una de las reacciones producidas por el extracto y los diferentes controles utilizando para ello un Vernier digital. Por último, el tejido de la reacción fue extraído con un sacabocados, dicho tejido fue digerido con 1 ml de hidróxido de potasio 1N; a manera de control se extrajo tejido sin reacción. Los tubos fueron almacenados a 37 °C durante 24 hrs para completar la digestión.

Transcurridas las 24 horas se añadieron 9 ml de la mezcla H₃PO₄ 0.6N: Acetona (5:13), se agitó por medio de Vortex y se trasladó la solución a tubos de plástico de 15 ml. Se realizó una posterior centrifugación a 1610 g por 15 minutos, se tomó de cada muestra 1 ml del sobrenadante y se cuantificó la cantidad de colorante extravasado en cada reacción por medio del espectrofotómetro UV-Vis DU530 (Beckman, USA) a 620 nm interpolando los datos obtenidos en una curva patrón de azul de Evans (AE) anteriormente realizada.

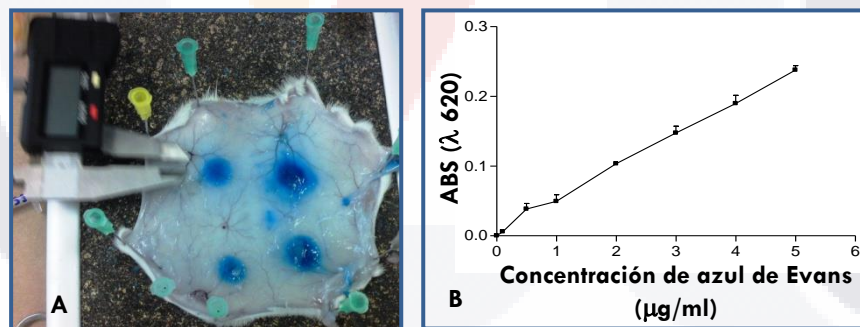


Fig. 8. Medición del diámetro interno de la extravasación de plasma por la reacción al extracto acuoso (A); y curva patrón del colorante azul de Evans (AE) (B).

5.9. Reacción anafiláctica sistémica

Los parámetros que se evaluaron y que permitieron identificar un choque anafiláctico sistémico fueron: caída en la temperatura corporal, evaluación de los signos de choque en una escala numérica (Li *et al*, 2009), registro de mortalidad y disminución de la presión arterial.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para analizar los tres primeros parámetros se utilizaron 3 ratas Wistar macho de 190 g aproximadamente. Se anestesió al animal con éter y se rasuró la cara interior del cuello donde se realizó una incisión para colocar un catéter en la yugular. Después de 30 minutos de recuperación, se inyectaron 50 μl del extracto acuoso (0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína) a través del catéter e inmediatamente se evaluaron los signos presentes en el animal en el transcurso de una hora.

5.9.1. La temperatura se determinó por medio de termómetro digital (Citizen, Japón), introduciendo éste cada 10 minutos por vía anal en el transcurso de 1 hora.

5.9.2. La evaluación de los signos de choque anafiláctico se realizó utilizando la siguiente escala numérica: 0, ausencia de signos; 1, frotarse la nariz y la cabeza; 2, pérdida de la actividad con aumento de la frecuencia respiratoria; 3, respiración asmática, cianosis alrededor de hocico y cola; 4, actividad leve o nula después de estímulo punzante y/o convulsiones; 5, muerte (Li et al, 2009).

5.9.3. La mortalidad de los animales se registró durante la hora posterior a la inyección del extracto y se representa como porcentaje de animales muertos respecto al total de animales del ensayo.

5.9.4 Determinación de la presión arterial

Para analizar cambios en la presión arterial en respuesta a la inyección intravenosa del extracto se utilizaron 3 ratas Wistar macho de aproximadamente 350 gr de peso corporal. Una vez pesado y anestesiado el animal con uretano (0.7 ml/100 g de peso corporal) se rasuró la cara anterior del cuello y la cara interior del fémur. Para asegurar una ventilación pulmonar adecuada, se colocó una cánula traqueal a través del hocico para proporcionar respiración con un ventilador artificial en caso de necesidad. Una vez calibrado el sistema de registro para Biopac MP Systems Inc. (California, USA), se procedió a aislar la vena yugular interna, se introdujo un catéter, se fijó y se conectó al transductor de presión. Se inició el registro de la presión arterial. Para evitar la coagulación sanguínea se purgó el catéter con una solución salina heparinizada al 1%. Para la administración del extracto acuoso (0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y los controles positivo (C48/80, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y negativo (SS) se introdujo un catéter en la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vena femoral. Todos los compuestos se administraron a una dosis de 50 μ l y cada inyección se realizó una vez que la presión arterial se estabilizó.

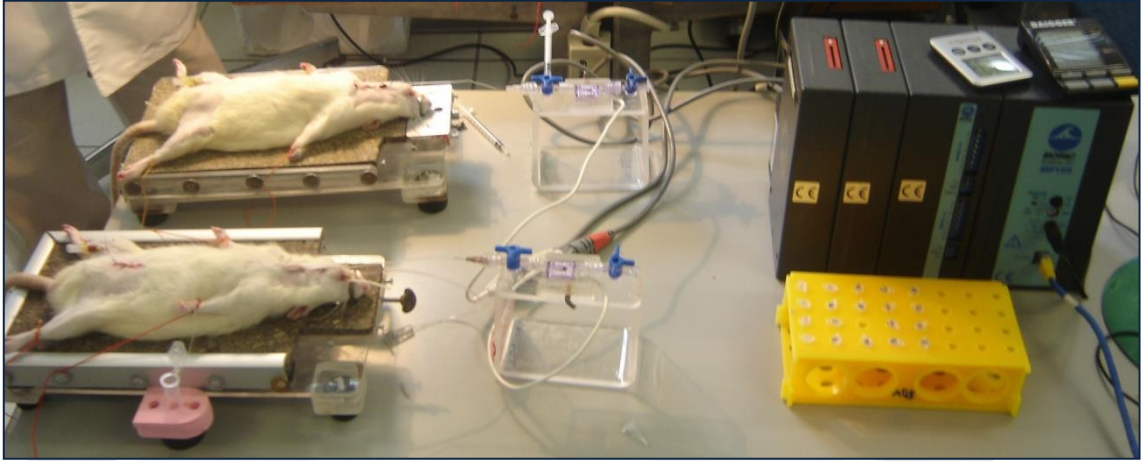


Fig. 9. Determinación de la presión arterial de la rata por medio de Biopac MP Systems Inc (California, USA).

VI. RESULTADOS

6.1 Propiedades fisicoquímicas.

Pocos han sido los estudios acerca de las propiedades fisicoquímicas de la toxina de algunos lepidópteros. Debido a esto, se realizaron pruebas que permitieron conocer algunas propiedades características del extracto acuoso proveniente de la oruga *M. ehrenbergii*. Dicho extracto presentó un pH ligeramente ácido, entre 5 y 5.5, una concentración de proteína igual a 2.245 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una osmolaridad equivalente a la del plasma de la rata y a la de la solución salina, 285-295 mOsm/L (Kim y Jung, 2012); misma que equivale a su vez a la del plasma humano (Broker *et al*, 2012).

Estos datos además de darnos información sobre las propiedades fisicoquímicas del extracto, nos permiten valorar su posible implicación en las lesiones que el extracto provoque en los tejidos.

6.2 Citotoxicidad en mastocitos incubados con el extracto acuoso.

Se evaluó si el extracto inducía muerte celular utilizando como célula al mastocito, debido a que en ensayos posteriores se analizó el efecto del extracto sobre la activación y desgranulación de dicha célula. Tal y como se muestra en la tabla 1, la incubación de mastocitos en presencia de 0.22 ó 0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del extracto acuoso de pelos de la oruga *M. ehrenbergii* generó una viabilidad celular de 95.23 ± 8.25 y 94.83 ± 4.51 %, no existiendo diferencias significativas respecto a los mastocitos sin estímulo (basal) 97.22 ± 4.81 ($p > 0.05$). Debido a que la viabilidad se mantuvo en torno al 95%, sin cambios significativos respecto a la de los mastocitos incubados el mismo tiempo en medio de cultivo, es posible afirmar que no existe citotoxicidad en presencia del extracto.

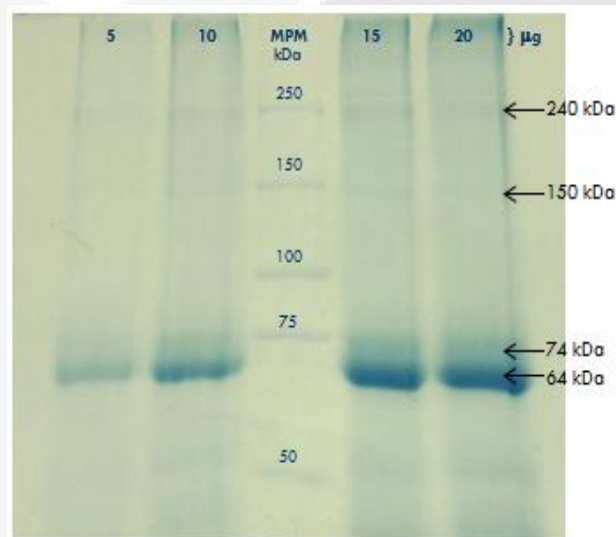
Tabla 1. Viabilidad de mastocitos expuestos 30 minutos al extracto acuoso de *M. ehrenbergii*.

	% MV	% MM
Basal	97.22 ± 4.81	2.77 ± 4.80
0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	95.23 ± 8.25	4.76 ± 8.24
0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	94.83 ± 4.51	5.15 ± 4.50

MV, Mastocitos vivos; MM, mastocitos muertos. Los valores representan la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes por duplicado (n=6).

6.3 Análisis del extracto acuoso por electroforesis desnaturalizante.

Una vez determinada la concentración proteica del extracto acuoso de la oruga (*M. ehrenbergii*) se realizó la separación de proteínas por electroforesis y posteriormente se tiñeron los geles con azul Coomassie para definir el peso molecular de las bandas proteicas más abundantes. La mayoría de las proteínas detectadas se encontraron en un rango entre 60 y 240 kDa de peso, predominando aquella correspondiente a 64 kDa. Otras proteínas abundantes mostraron tamaños de 74, 150 y 240 kDa (Fig. 10). La intensidad de las bandas proteicas aumentó de forma proporcional a la concentración de proteína del extracto analizada.



6.4 Activación de mastocitos por el extracto acuoso de *M. ehrenbergii*.

El rojo rutenio es un colorante vital que tiñe selectivamente los gránulos de la célula que son activados para la secreción de su contenido (Lagunoff, 1972 A), permitiendo clasificar los mastocitos en estado de inactivación, activación o desgranulación. La figura 11a-c representa los tres estados de activación de los mastocitos. Los tres estados de activación se pudieron detectar en las tres condiciones de incubación de las células: medio de cultivo solo, en presencia del extracto o en presencia del C48/80, aunque en diferentes proporciones (Figura 11d-e). Al analizar el porcentaje de mastocitos en cada estado de activación, se observó que existían diferencias significativas entre los mastocitos sin estímulo, los mastocitos estimulados por el extracto acuoso y los mastocitos estimulados por el C48/80 (Figura 12). Predominaron las células completamente

teñidas, es decir en estado de desgranulación, cuando fueron estimuladas por el C48/80. Por su parte, el extracto acuoso activó a las células, pero no alcanzó el umbral de desgranulación del C48/80.

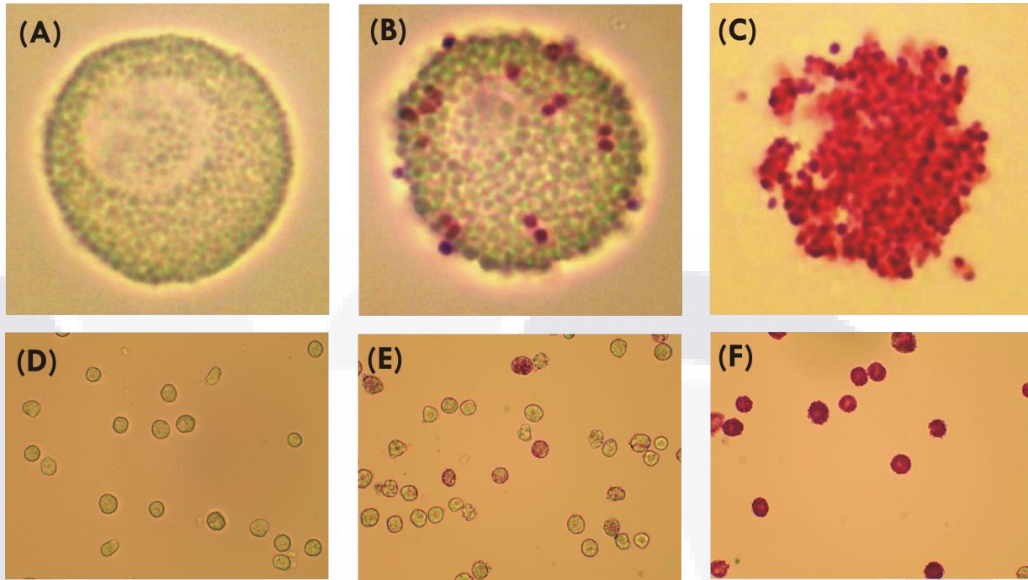


Fig. 11. Microscopía óptica que muestra mastocitos en sus tres estados de activación (A, inactivado; B, activado; C, desgranulado); y comparación entre cada estímulo (D, reacción espontánea; E, 0.22 µg/µl de proteína; F, C48/80). Tinción con rojo rutenio. (A-C, 100x; D-F, 40x).

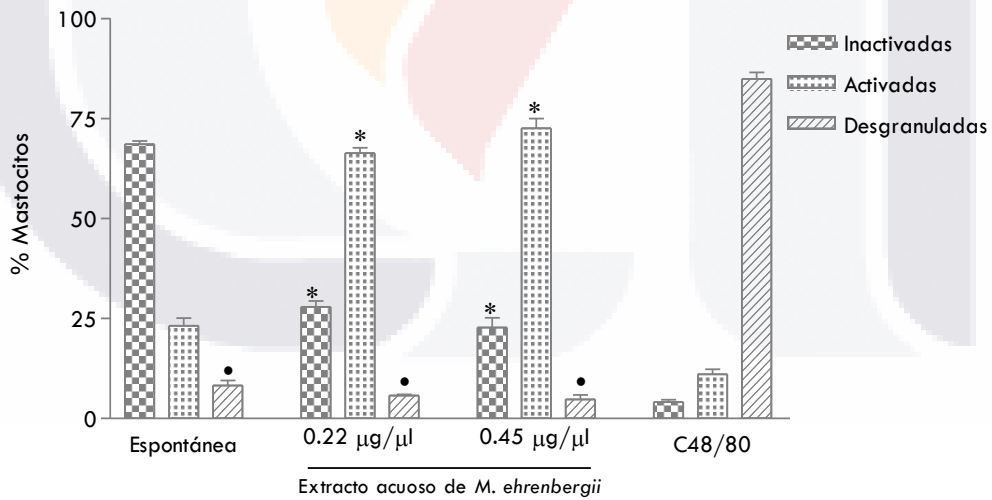


Fig. 12. Porcentaje de mastocitos en los tres estados de activación tras estimulación en ausencia (espontánea) o presencia del extracto acuoso de *M. ehrenbergii*. Las células se incubaron con C48/80 como control positivo de desgranulación. Los valores representan la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes por duplicado (n=6). * $p < 0.001$ vs mismo estado en activación espontánea, • $p < 0.001$ vs mastocitos desgranulados por C48/80.

Los mastocitos en contacto con el extracto acuoso presentaron un aumento de 2.86 y 3.04 veces el porcentaje de células activadas y por consecuencia disminuyó 2.45 y 3.02 veces el número de células inactivadas respecto a los mastocitos en ausencia de extracto (reacción espontánea). El número de mastocitos desgranulados fue semejante con o sin estímulo por el extracto ($5.70 \pm 0.29\%$ y $8.27 \pm 1.20\%$, respectivamente), siendo en ambos casos significativamente inferior al obtenido por el C48/80 (Figura 12).

6.5 Cuantificación de histamina secretada por mastocitos en respuesta al extracto acuoso de *M. ehrenbergii*.

La histamina es un mediador inflamatorio preformado almacenado en los gránulos de los mastocitos y liberado durante el proceso de exocitosis como consecuencia de la activación de la célula. Se cuantificó la histamina secretada por los mastocitos después de 30 minutos de incubación con el extracto acuoso de *M. ehrenbergii*, como otra forma de analizar la activación de la célula por dicho extracto. Tal y como se muestra en la Figura 13, 0.22 y 0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del extracto acuoso indujeron la secreción de $17.56 \pm 5.05\%$ y $18.30 \pm 3.39\%$ de la histamina total almacenada en la célula, valores que fueron significativamente mayores a la secreción espontánea ($11.23 \pm 1.95\%$; $p < 0.05$). El extracto, a las concentraciones de 0.22 y 0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, incrementó en un 36.04% y 38.63% respectivamente la secreción espontánea de la amina. El C48/80 indujo una secreción de histamina dos veces mayor a la del extracto ($33.56 \pm 4.94\%$), presentando mayor grado de significancia ($p < 0.001$) respecto a la secreción basal que el extracto.

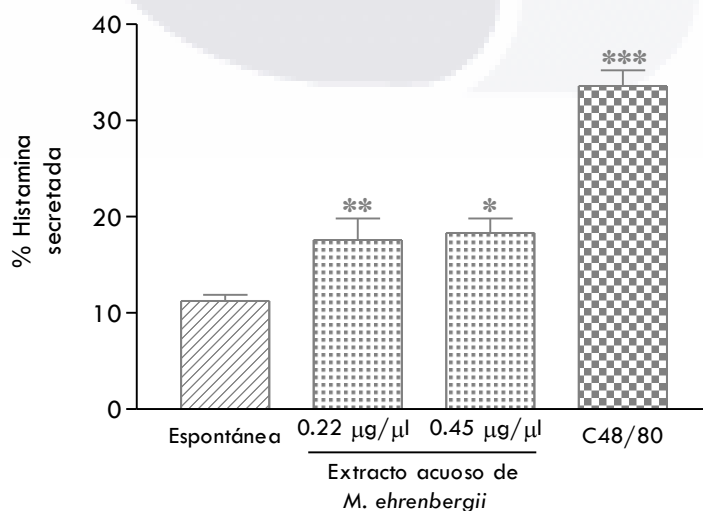


Fig. 13. Histamina liberada por mastocitos activados en ausencia (espontánea) o presencia del extracto acuoso de *M. ehrenbergii*. Las células se incubaron con C48/80 como control positivo de desgranulación. Los valores representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes por duplicado ($n=6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs espontánea.

6.6 Efecto del extracto acuoso en la reacción anafiláctica local.

La anafilaxia cutánea es una reacción que se utiliza para determinar la actividad urticante de una sustancia. Se basa en la utilización del colorante azul de Evans, que al inyectarse por vía intravenosa, se une a proteínas de gran tamaño, como la albúmina sérica, quedando retenido en el interior de los capilares sanguíneos y únicamente pasando a tejidos en caso de que los endotelios vasculares se activen y se produzca contracción de las células endoteliales. Por tanto este colorante permite analizar la intensidad del proceso inflamatorio ocasionado por algún agente externo al organismo. La reacción anafiláctica cutánea o reacción urticante se indujo inyectando intradérmicamente 0.22 y 0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del extracto acuoso. Se utilizó como control negativo SS y como controles positivos de reacción urticante, histamina y C48/80.

Uno de los primeros datos que arroja una anafilaxia cutánea son los diámetros referentes al proceso inflamatorio coloreado por el azul de Evans extravasado, como consecuencia de las inyecciones intradérmicas tanto de los controles (positivo y negativo) como de las muestras problema (extracto acuoso). Para conocer tal parámetro, basta con medir el diámetro del proceso inflamatorio por medio de vernier, dato que permite conocer el comportamiento de la sustancia a analizar sobre la respuesta inflamatoria. En la figura 14 se muestran los resultados de los procesos inflamatorios generados y en la Figura 15 se representan estos resultados en función de los diámetros de las reacciones inflamatorias. Las concentraciones del extracto ensayadas generaron procesos inflamatorios de 10.58 ± 0.4367 y 12.21 ± 0.81 mm de diámetro. En ambos casos el tamaño de la reacción inflamatoria fue significativamente mayor a la generada por la solución salina (5.73 ± 0.74 mm, $p < 0.001$). Sin embargo, aunque no hubieron diferencias entre los diámetros inflamatorios generados por las dos concentraciones del extracto y entre éstas y las producidas por la histamina o el C48/80 (Figura 15), si se apreciaron diferencias respecto a la intensidad de la coloración azulada del proceso inflamatorio generado por los diferentes estímulos (Figura 14). Esta observación nos llevó a analizar otro parámetro relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio, cuantificar concentración de azul de Evans extravasado, parámetro más exacto a la hora de evaluar el proceso inflamatorio, debido a que se considera el volumen total del edema ocasionado por la inyección intradérmica, no únicamente el diámetro de dicho edema.

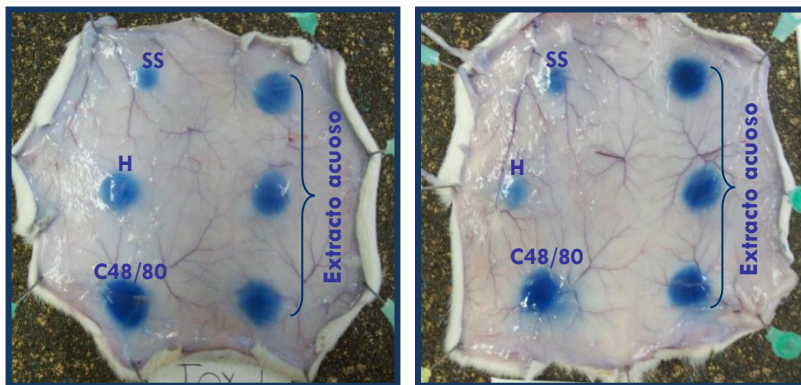


Fig. 14. Azul de Evans extravasado en la piel de rata. Comparación entre 0.22 (A) y 0.45 µg/µl (B) del extracto.

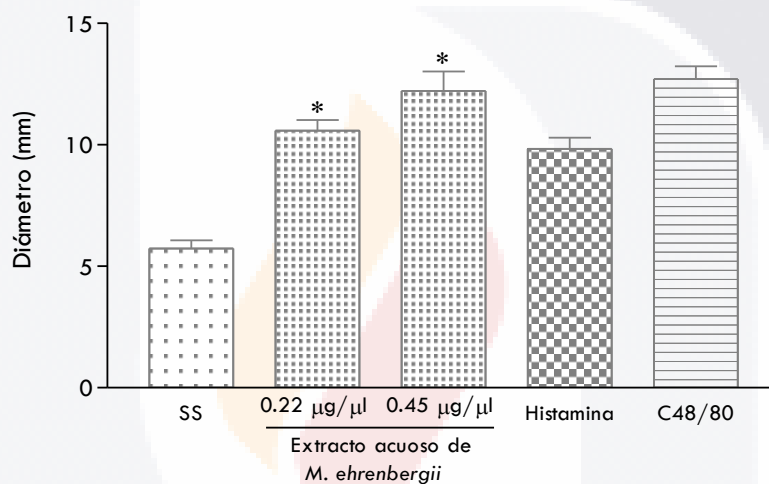


Fig. 15. Diámetro que representa la intensidad del proceso inflamatorio en la piel de las ratas. Los valores representan la media ± S.E.M. de 5 experimentos independientes hechos por triplicado (n=15). *p<0.001 vs SS.

Los extractos acuosos de pelos de la oruga *M. ehrenbergii* generaron reacciones inflamatorias con extravasación de 1.77 ± 0.37 y 4.01 ± 0.22 µg/µl de azul de Evans para 0.22 y 0.45 µg/µl respectivamente. La extravasación obtenida por parte del extracto acuoso (0.22 y 0.45 µg/µl) incrementó significativamente en 1.92 y 4.35 veces la generada por la SS (0.92 ± 0.13 µg/µl) (Figura 16). Además la concentración de colorante extravasada por los extractos acuosos estuvo en el rango de la extravasada por los controles positivos: histamina (2.24 ± 0.43) y C48/80 (4.46 ± 0.62).

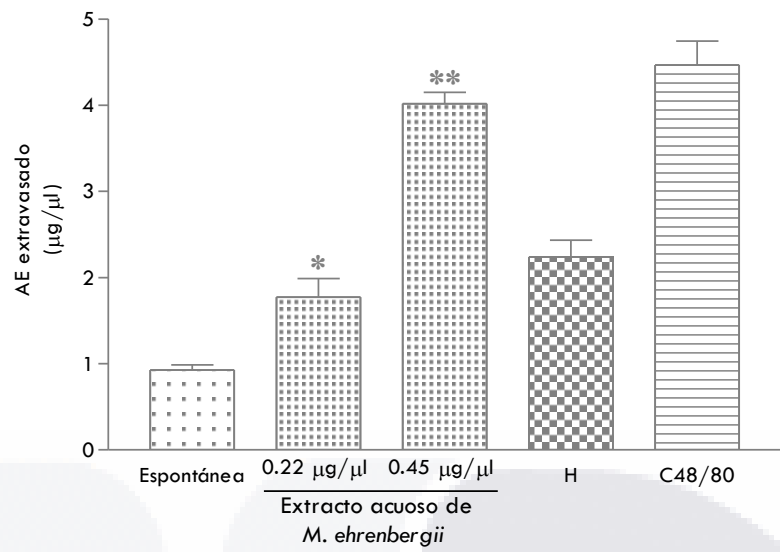


Fig. 16. Efecto del extracto acuoso proveniente de la oruga *M. ehrenbergii* en la anafilaxia cutánea (AC). Los valores representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes por triplicado (n=9). *p<0.05 y **p<0.001 vs Espontánea.

Para establecer una equivalencia en la extravasación generada por el extracto acuoso en relación a la inducida por el agente desgranulador de mastocitos C48/80 y por la histamina, se realizaron curvas dosis-respuesta de ambas sustancias en la anafilaxia local. La figura 17 muestra las curvas dosis-respuesta de la histamina y del C48/80 en la anafilaxia cutánea. La histamina mostró un comportamiento lineal a las concentraciones estudiadas (0-20 µg/µl). El C48/80 mostró el mismo comportamiento a concentraciones de 0 a 1 µg/µl, mostrándose a partir de esta concentración una saturación en la respuesta anafiláctica. Extrapolando los valores de azul de Evans extravasado por los extractos acuosos en ambas rectas, obtenemos que la inyección intradérmica de 0.22 µg/µl de proteína del extracto generó una reacción urticante con un aumento en la extravasación equivalente al inducido por 10 µg/µl de histamina o 0.329 µg/µl del C48/80 (Tabla 2). Por su parte, 0.45 µg/µl de proteína del extracto generó una extravasación equivalente a 17.42 µg/µl de histamina y 0.565 µg/µl de C48/80.

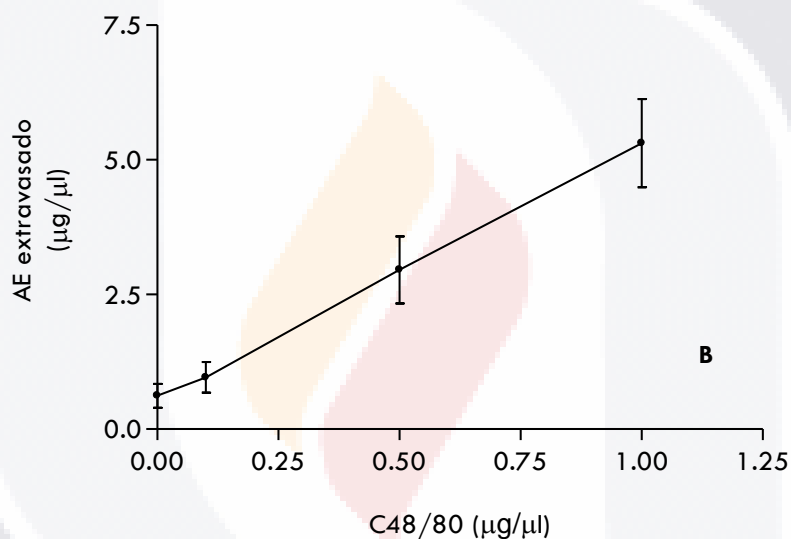
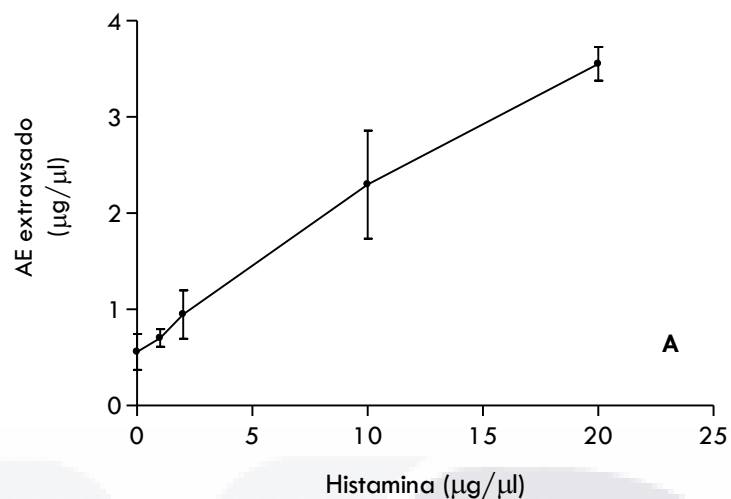


Fig. 17. Curvas dosis-respuesta de histamina (A) y C48/80 (B) sobre la anafilaxia cutánea. En ambas curvas se determinó el coeficiente de correlación (R), siendo 0.99 en ambas curvas.

Tabla 2. Equivalencia de los valores promedios del azul de Evans extravasados por el extracto en relación a la inducida por histamina y C48/80 en la anafilaxia cutánea.

Extracto	Histamina (µg/µl)	C48/80 (µg/µl)
0.22 µg/µl	10.00	0.329
0.45 µg/µl	17.42	0.565

Se ha reportado que el compuesto presente en *T. pytiocampa* responsable de causar una reacción urticante en animales como el cerdo es la denominada thaumatopenia (Lamy *et al* 1985; Novak y Lamy, 1987), proteína de 28 kDa. Para estudiar si algún componente proteico presente en el extracto acuoso de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii* era el inductor de la respuesta urticante, se evaluó *in vivo* la reacción cutánea generada por el extracto tras someterlo a condiciones de alta temperatura. Para ello se calentó el extracto acuoso (0.22 µg/µl) a 100°C en baño María durante 10 minutos y posteriormente se realizó la inyección intradérmica del extracto hervido (extracto H; proteínas desnaturalizadas), junto con inyecciones del extracto sin tratar (extracto S/H; proteínas nativas) y los respectivos controles, negativo y positivo (SS e Histamina), realizando así la anafilaxia cutánea. En la Figura 18 se muestran los resultados.

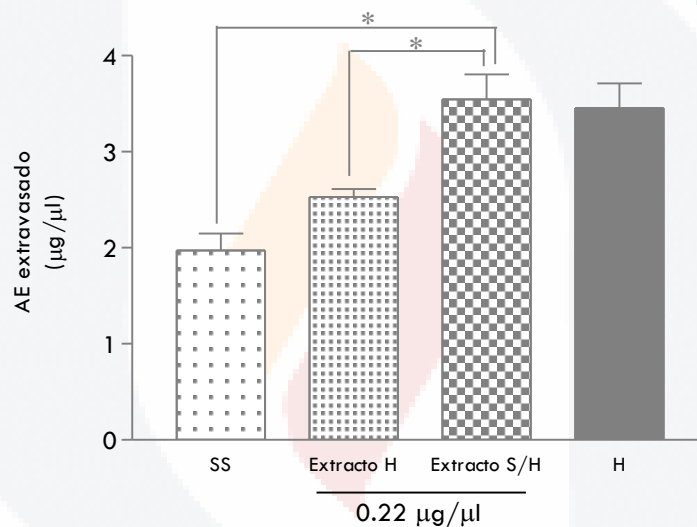


Fig. 18. AE extravasado en la reacción cutánea inducida por el extracto acuoso de *M. ehrenbergii* hervido (extracto H) y sin hervir (extracto S/H). Los valores representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes (n=3). *p<0.01, extracto H vs extracto S/H.

Se observó una disminución del 29% en la extravasación inducida por el extracto hervido con respecto al que no se hirvió. Además lo interesante de estos resultados es que la extravasación inducida por el extracto hervido no es significativamente diferente a la generada tras la inyección de la SS (2.52±0.18 versus 1.97±0.30, p>0.05), lo cual indica que efectivamente una de las proteínas presentes en el extracto es la responsable del aumento en la permeabilidad vascular.

6.7 Evaluación de signos característicos de anafilaxia sistémica inducidos por el extracto acuoso de pelos de *M. erhenbergii*.

Los signos de la reacción anafiláctica sistémica se valoraron mediante el uso de la escala numérica ya indicada en material y métodos. Como control positivo se indujeron choques anafilácticos sistémicos inyectando vía intravenosa C48/80 en ratas Wistar. Estas ratas presentaron en un lapso de 40 minutos aproximadamente, todos los signos indicados en la escala hasta llegar al 5, que fue la muerte (Tabla 3). Sin embargo las ratas que fueron inyectadas intravenosamente con el extracto acuoso de pelos de la oruga, únicamente alcanzaron el 1 en la escala numérica (pelo erizado), con una supervivencia del 100% a la hora del estudio.

Tabla 3. Comparación de los signos de anafilaxia sistémica entre el extracto acuoso de *M. ehrenbergii* y el C48/80.

Extracto acuoso	C48/80
Puntuación alcanzada: 1 (Pelo erizado)	Puntuación alcanzada: 5 (Muerte)
Muerte: 0/3 Mortalidad: 0%	Muerte: 3/3 Mortalidad: 100%
Aumento de sensibilidad	Pérdida de sensibilidad

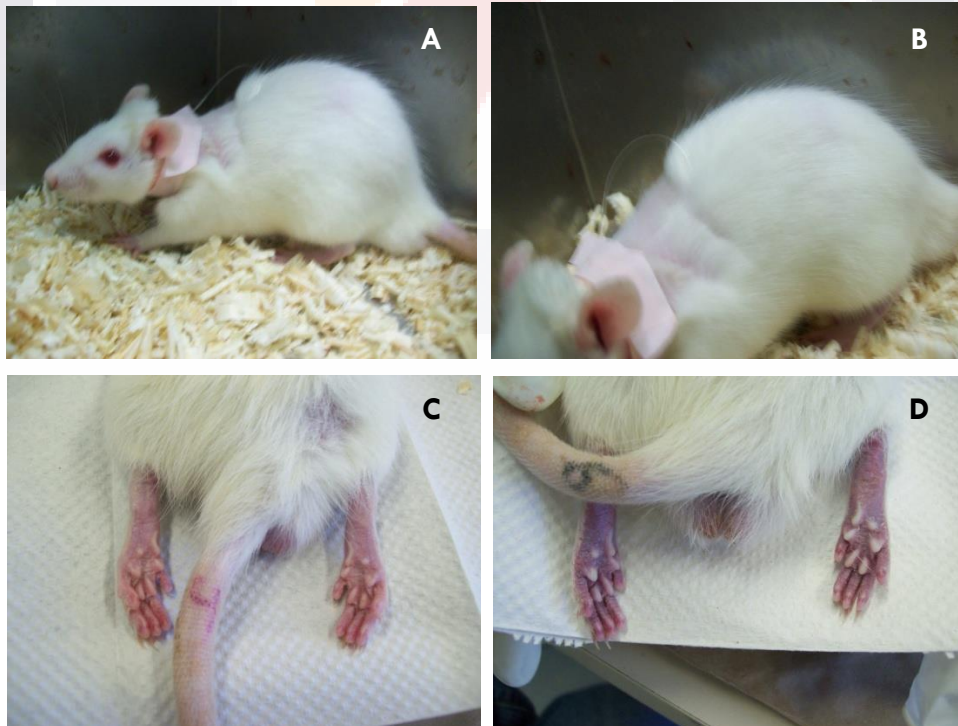


Fig. 19. Comparación entre ratas que han sido expuestas a inyección i.v. del extracto acuoso (A,C) y C48/80 (B,D). Presencia de pelo erizado (A,B). Ausencia (C) y presencia (D) de cianosis.

Interesantemente, mientras que las ratas tratadas con el C48/80 perdieron la sensibilidad a un estímulo punzante durante los 40 minutos posteriores a la inducción de la anafilaxia, las ratas inyectadas con el extracto acuoso mostraron reacciones de aumento de sensibilidad a los mismos estímulos. Además las ratas retadas con el extracto acuoso presentaron hemorragias en mucosa de nariz y ano. Pasada una hora tras la inyección del extracto, las ratas se sacrificaron para revisar sus órganos, no existiendo hemorragia visceral.

Además de los signos evaluados por Li et al (2009), existen parámetros como caída en la temperatura corporal y en la presión arterial que son utilizados en la evaluación de la anafilaxia sistémica. Un choque anafiláctico se caracteriza porque estos parámetros disminuyen considerablemente en un lapso de tiempo corto. Por ello se evaluó la temperatura rectal cada 10 minutos hasta la muerte del animal o durante la hora posterior al choque.

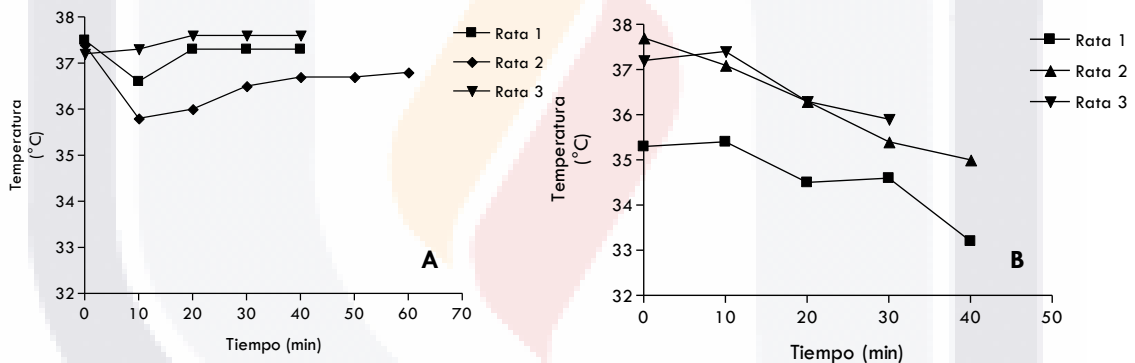


Fig. 20. Medición de temperatura en ratas con inyección intravenosa del Extracto acuoso (A) y C48/80 (B).

Las ratas inyectadas con C48/80 presentaron una caída muy importante en la temperatura rectal durante los 40 minutos posteriores a la inducción de la anafilaxia, mientras que los animales tratados con el extracto acuoso mostraron una ligera caída en la temperatura corporal durante los primeros minutos, pero posteriormente se recuperó llegando a los valores iniciales (Figura 20). Cabe mencionar que la última lectura de temperatura para las ratas tratadas con el C48/80 se realizó cuando murió el animal, mientras que las lecturas finales de las ratas inyectadas con el extracto corresponden a las ratas aún vivas; sin embargo en dos de las ratas no se pudo determinar temperatura a los 50 y 60 minutos debido a que las ratas expuestas al extracto acuoso presentaron hemorragia anal.

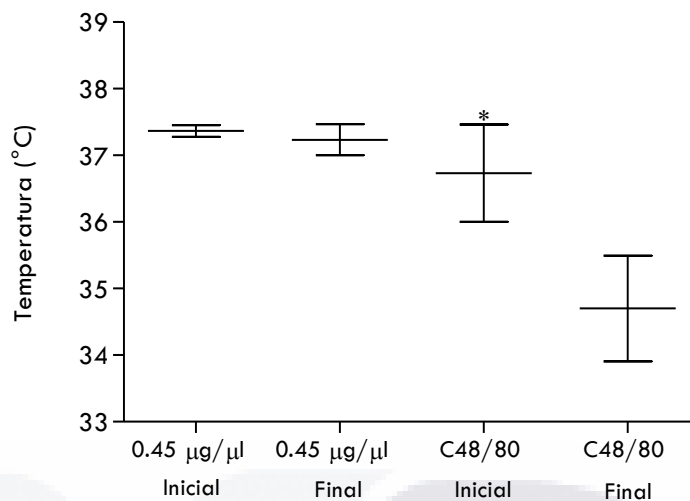
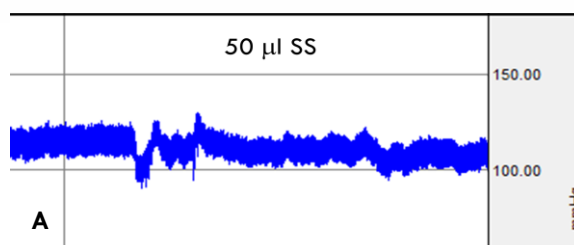


Fig. 21. Caída de temperatura corporal al inyectar vía intravenosa el extracto acuoso (0.45 µg/µl) o el C48/80. Los valores representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes (n=3). *p<0.05, C48/80 inicial vs final.

La figura 21 muestra la comparación en la caída de temperatura corporal generada por el extracto acuoso en relación a la inducida por el C48/80 al estudiarse como efecto del choque sistémico. El C48/80 indujo una caída de aproximadamente dos grados en la temperatura corporal de las ratas (36.5 ± 1.04 versus 34.7 ± 1.37), presentando los animales diferencias significativas en sus temperaturas antes y después del choque ($p < 0.05$); por su parte, el extracto acuoso generó una caída promedio de $0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ en la temperatura corporal de los animales, no siendo significativa la diferencia en la temperatura.

Por otro lado, el registro de la presión arterial en las ratas mostró los siguientes resultados:



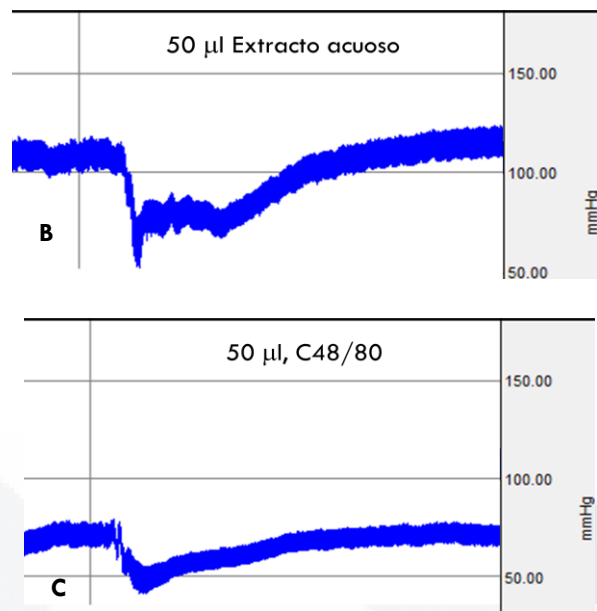


Fig. 22. Registro de la presión arterial en las ratas una vez inyectado vía intravenosa el control negativo (SS) (A), extracto acuoso (B) y C48/80 (C). Para inyectar cada compuesto, la presión debía mantenerse estable 5 minutos.

Como se observa en la Figura 22, el control negativo, que es la inyección de solución salina, no modificó el registro indicando que no hubieron cambios en la presión arterial de la rata; al inyectar el extracto acuoso, los animales presentaron una caída aproximada del $37.47 \pm 6.69\%$ en su presión arterial, caída que ocurrió en un lapso aproximado de tiempo de 1.3 minutos y tardó 3 minutos en restablecerse. Posteriormente y tras un lapso de 6 minutos en el que la presión arterial se mantuvo constante, se procedió a la inyección del C48/80. Dicho compuesto generó en las ratas una caída del $13 \pm 15.16\%$ en su presión arterial la cual se presentó en un lapso de tiempo menor con respecto al extracto acuoso (0.70 min) (Figura 23).

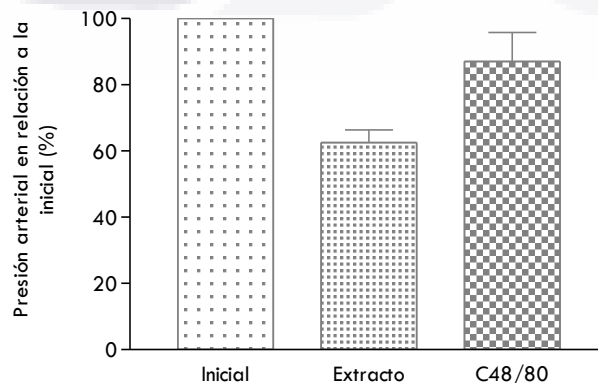


Fig. 23. Caída de presión arterial representada en porcentaje. Inicial (presión arterial base 100%), extracto (presión arterial tras inyección del extracto acuoso), C48/80 (presión arterial tras inyección del compuesto).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Propiedades físicoquímicas y actividad citotóxica del extracto de pelos de *M. erhenbergii*

Las propiedades físicoquímicas de un compuesto permiten determinar el posible efecto que éste pueda tener sobre el organismo, por lo tanto es importante conocer propiedades como pH y osmolaridad. El efecto dañino de los pelos de la oruga *M. erhenbergii* se genera tras la liberación de sustancias irritantes presentes en los pelos que se insertan en la piel de personas o animales. Las defensas de protección del sistema inmune innato comienzan con las barreras anatómicas, tales como la piel y las membranas mucosas, que impiden la entrada de microorganismos y tóxicos (Castellón *et al.*, 2008). En el caso del extracto acuoso de pelos de la oruga *M. erhenbergii* se mostró que tiene un pH entre 5 y 5.5, mismo que se encuentra dentro del rango del pH de la piel, ya que éste va de 3 a 5 (Clam 2011). Por lo tanto la acción irritante del extracto proveniente de la oruga no es debida a su pH. Ya se ha demostrado que soluciones hipo o hiperosmóticas generan un desbalance entre la osmolaridad de los líquidos intra y extracelulares, generando presión osmótica y estrés osmótico que es inductor de respuesta inflamatoria en los tejidos (Broker *et al.*, 2012). En este sentido el extracto acuoso fue isotónico con respecto al plasma sanguíneo y a la solución salina, lo cual indica que la osmolaridad del extracto no es un factor que participe en la acción urticante generada por el extracto.

Cualquier tipo celular, normal o patológico, puede ser susceptible a la actividad citotóxica de ciertos componentes presentes en extractos tóxicos o irritantes. El ensayo del azul tripán se utiliza como método para definir la actividad citotóxica de determinadas sustancias que alteran la permeabilidad de la membrana plasmática de las células (De Geyter *et al.*, 2012). Así tras la incubación de células con el extracto a estudiar en presencia de una solución de azul tripán, la coloración azulada de las células es indicativa de alteración en la permeabilidad de las membranas celulares y acción citotóxica del extracto. La incubación de mastocitos con el extracto acuoso de pelos de la oruga *M. erhenbergii* no modificó la viabilidad celular. No existen reportes sobre posibles efectos citotóxicos directos de pelos o extractos de otras especies de lepidópteros.

7.2 Principales bandas proteicas presentes en el extracto acuoso de pelos de *M. erhenbergii* y su actividad urticante

Una de las proteínas más importantes encontrada en lepidópteros, es la conocida taumatopenia, la cual surge al estudiar algunas propiedades fisicoquímicas de la procesionaria del pino. De acuerdo a Novak *et al* (1987), la taumatopenia tiene un peso molecular de 28 kDa, es específica del pelo y causa en la piel de cerdo una reacción idéntica a la producida por el extracto crudo del pelo. En el extracto acuoso obtenido de los pelos de *M. ehrenbergii* no se obtuvieron proteínas de tan bajo peso molecular, sin embargo, la proteína encontrada con mayor abundancia posee 64 kDa de peso molecular y en menor cantidad contiene proteínas de 74, 150 y 240 kDa. Los signos que se presentan en animales e incluso en el humano cuando se tiene contacto con la procesionaria del pino son generalmente urticarias, edemas, conjuntivitis y deficiencias respiratorias (Vega *et al*, 1997), signos que se atribuyen a la presencia de la taumatopenia, que tiene un efecto directo sobre los mastocitos dando lugar a la desgranulación de los mismos. En este trabajo se demuestra que la desnaturalización de las proteínas presentes en el extracto acuoso obtenido de los pelos de la oruga *M. erhenbergii* disminuye de una forma muy significativa la reacción urticante asociada a la inyección intradérmica del extracto en las ratas. A pesar de que los pelos de *M. ehrenbergii* poseen proteínas de mayor peso molecular, son estas proteínas las causantes de la activación de los mastocitos asociada a la reacción urticante y por tanto de la reacción inflamatoria que el contacto con la oruga genera en la piel.

7.3 Activación de mastocitos por el extracto acuoso de *M. ehrenbergii*

Una de las técnicas que permitió analizar la activación de los mastocitos por el extracto acuoso de pelos de la oruga *M. ehrenbergii* fue la tinción con el colorante rojo rutenio. Este colorante se une de forma selectiva a los gránulos de las células que han sido activados para la secreción de su contenido (Lagunoff, 1972a), debido a que durante la secreción el contenido de los gránulos es extruido de forma extracelular o bien dentro del dominio extracelular de la célula permitiendo el contacto del colorante con el material granular y la tinción del mismo. Utilizando esta técnica se pueden clasificar los mastocitos en tres estadios: no estimulados, células con gránulos sin teñir y su membrana celular perfectamente definida; activados, con una mezcla de gránulos intracelulares teñidos y no teñidos de rojo y su membrana celular todavía bien delimitada; desgranulados, células con todos sus gránulos teñidos de rojo, la mayoría fuera de la célula y con pérdida del límite celular. Los resultados obtenidos con esta

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

técnica mostraron un número muy significativo de mastocitos activados por efecto del extracto acuoso, disminuyendo significativamente los mastocitos no estimulados y no modificando el número de células desgranuladas en comparación con los mastocitos sin extracto. Estos resultados indican que el extracto acuoso proveniente de *M. ehrenebergii* genera un alto nivel de activación de los mastocitos, sin llevarlos al estado de desgranulación.

Datos bioquímicos indican un paralelismo razonablemente cercano entre la liberación de histamina y la unión del rojo rutenio a los gránulos de mastocitos estimulados en un sistema *in vitro* (Lagunoff, 1972b). Riley (1953) describe a la histamina como uno de los mediadores preformados más importantes almacenados en los mastocitos, y su liberación acompaña a la activación de dicha célula. La cuantificación de histamina secretada por los mastocitos permite conocer el grado de activación celular y viene a complementar los resultados obtenidos con la técnica del rojo rutenio. Nuestros resultados muestran que el extracto acuoso de *M. ehrenebergii* indujo un incremento cercano al 40% en la secreción de histamina por los mastocitos en comparación con la basal. Sin embargo la secreción de histamina inducida por el extracto acuoso fue la mitad de la estimulada por el C48/80, agente desgranulador de los mastocitos. Estos datos vienen a corroborar los resultados obtenidos con la técnica del rojo rutenio, demostrando que la estimulación de mastocitos con el extracto acuoso de la oruga llevan a los mastocitos a un estado de activación que induce una secreción significativa de histamina, mas no a un estado de desgranulación masiva.

Haciendo referencia a enfermedades como el lepidopterismo, Novak y Lamy (1987) afirman que esta afección es diferente del erucismo producido por los pelos urticantes de la oruga *T. pityocampa*. Estos pelos son comparables a bombillas que hay que romper, por ejemplo en la piel, a fin de liberar la sustancia urticante y provocar la liberación de histamina. *Lymantria dispar* es otro tipo de lepidóptero encontrado principalmente en Europa y llegado a Norteamérica a finales de 1860; en 1982 se reportaron casos de dermatitis y asma ocupacional asociados a esta oruga. De acuerdo a Díaz (2005), la patogenia del erucismo y lepidopterismo producidos por *Lymantria dispar* no está claramente definida, sin embargo, el mecanismo probablemente involucra la liberación de histamina local y pulmonar y reacciones de hipersensibilidad retardada en víctimas susceptibles.

7.4 Efecto urticante del extracto acuoso de *M. ehrenbergii*

La “heterogeneidad” de los mastocitos, que se refiere a la capacidad que tienen estas células de generar poblaciones individuales de mastocitos que presenten diferentes propiedades bioquímicas y funcionales, probablemente contribuya a la flexibilidad y diversidad de las formas en que las células se pueden activar y así, presentar diferentes respuestas fisiológicas, inmunológicas, inflamatorias u otras respuestas biológicas en las que participe esta célula (Metz *et al*, 2007). Así mismo, los mastocitos tienen la capacidad de secretar diversos productos biológicamente activos tras la exposición a una variedad de estímulos tanto inmunológicos (alimentos, medicamentos, etc.) como no inmunológicos (frío, calor, ejercicio y extractos irritantes). Los pelos y espículas de la *T. pityocampa* son los responsables de su efecto nocivo, que se produce por contacto directo o a través del aire (Inal *et al*, 2006 y Díaz, 2005). Presenta dos mecanismos de acción: uno inmediato tóxico irritativo al clavarse los pelos y espículas en la piel e inyectar un veneno provocando la liberación de histamina; y otro alérgico, mediado por IgE, que precisa exposiciones repetidas. En general, el primer mecanismo ocasiona cuadros de dermatitis y el segundo de urticarias generalizadas, disnea aguda, conjuntivitis, asma, rinitis y angioedema (Vega, 2002). En el presente trabajo se ha demostrado el efecto urticante del extracto acuoso proveniente de los pelos de *M. ehrenbergii*. La reacción urticante generada por 0.22 µg/µl de extracto es semejante en magnitud a la generada por 10 µg/µl de histamina y por 0.3 µg/µl del C48/80. El mecanismo de acción del extracto proveniente de los pelos de *M. ehrenbergii* es un mecanismo inmediato tóxico, ya que éste provoca la liberación de histamina de los mastocitos en forma directa y sin sensibilización previa, formando así pequeños edemas en la zona inyectada debido a la liberación de dicho mediador. Esto es debido a que tras la inserción de los pelos de la oruga en la piel se liberan sustancias presentes en el pelo que inducen la activación de los mastocitos y la liberación de parte de la histamina almacenada en sus gránulos. A nivel local la histamina ocasionará la activación de células del músculo liso, vasodilatación y por tanto incremento en el flujo sanguíneo; así mismo, la contracción de las células endoteliales provocando extravasación de plasma y reacción vascular que genera la formación de edema y urticaria (Lundequist y Pejler, 2010).

No podemos descartar que otras sustancias almacenadas en los gránulos de los mastocitos y liberadas tras la activación de los mismos por el extracto acuosos de la oruga, puedan estar también participando en la generación del edema o en el efecto

urticante del extracto. En este sentido es importante mencionar la proximidad de los mastocitos a las fibras nerviosas en la piel y el hecho de que estas células produzcan y respondan a varios neuropéptidos (Salinas, 2012). Esta comunicación bidireccional entre los mastocitos y las neuronas cutáneas plantea la posibilidad de que alguna sustancia presente en el extracto acuoso de la oruga *M. ehrenbergii* pueda activar fibras nerviosas aferentes sensoriales e inducir la liberación de neuropéptidos como la sustancia P o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Estos dos neuropéptidos conducen a la desgranulación neurogénica de los mastocitos y la subsiguiente respuesta vascular, caracterizada por vasodilatación y una edema-eritematoso de rápida formación debido al incremento en la permeabilidad vascular y por tanto en la extravasación del plasma (Roosterman et al, 2006).

Estudios realizados con *Aspergillus oryzae* demuestran que este hongo puede inducir la activación selectiva de mastocitos para provocar reacciones anafilactoides similares a reacciones anafilácticas mediadas por IgE y antígeno, característicos de la alergia de tipo I; en dicho estudio, Yamaki y Yoshino (2011) al trabajar con una cepa de ratones de tipo silvestre y con ratones deficientes en mastocitos encontraron que la hinchazón aguda en patas inducida por *A. oryzae* sólo se observa en ratones silvestres y no en aquellos con deficiencia de mastocitos, lo cual sugiere que dichas células juegan un papel indispensable en la formación del edema.

Lamy *et al* (1983) investigaron el mecanismo involucrado en la reacción cutánea probando el efecto de la sustancia extraída de los pelos de la oruga *T. pityocampa* en la liberación local de aminas vaso-activas y la desgranulación de mastocitos. Afirman que la desgranulación de los mastocitos es dosis-dependiente y que la inactivación por calor del extracto reduce enormemente sus efectos. El extracto proveniente de los pelos de *T. pityocampa* es inactivado por calor, lo cual sugiere que el elemento activo es de naturaleza proteica. Resultados obtenidos con *M. ehrenebergii* corroboran los estudios para la procesionaria del pino, ya que encontramos diferencias significativas entre la respuesta urticante provocada por el extracto inactivado por calor y aquel sin inactivar.

7.5 Efecto de la administración sistémica del extracto acuoso de *M. ehrenbergii*

Cuando los mastocitos tienen contacto con el extracto, éstos se activan para la liberación de histamina y posiblemente otros mediadores también almacenados en los gránulos. Si la activación o desgranulación fuese tal que ocasionara la diseminación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sistémica de la histamina y otros mediadores, entonces se producirá un choque sistémico (Kunder *et al*, 2011). El choque sistémico o anafilaxia sistémica normalmente está producido por respuestas inmunológicas frente a alérgenos, medicamentos u otras sustancias. Sin embargo cualquier sustancia o estímulo físico o químico que active sistémicamente a los mastocitos puede inducir esta reacción (Simons, 2009). Los signos que mostraron los animales tras la inyección intravenosa del extracto acuoso de la oruga *M. ehrenbergii* no fueron los característicos de una reacción de anafilaxia sistémica. Las ratas únicamente mostraron pelo erizado tras la inyección intravenosa del extracto, mientras que aquellos animales a los que se les inyectó el C48/80 mostraron todos los signos indicados en la escala (Li *et al*, 2009) hasta llegar al 5 que fue la muerte. Sin embargo, los animales expuestos sistémicamente al extracto acuoso presentaron otros signos diferentes que por su naturaleza es importante mencionar. Los tres animales evaluados se caracterizaron por presentar un alto grado de sensibilidad a estímulos punzantes, a diferencia de los animales que desarrollaron choque sistémico donde la sensibilidad a este estímulo se perdió. La intensa comunicación bidireccional entre los mastocitos y las fibras nerviosas a nivel de la piel (Salinas, 2012) podría explicar este aumento de la sensibilidad al dolor. Se ha reportado que los mastocitos almacenan en sus gránulos varios neuropéptidos, entre ellos SP (Pongor *et al*, 2011), neurotransmisor involucrado en la percepción del dolor. Una liberación sistémica de SP por los mastocitos en respuesta al extracto acuoso podría generar la hipersensibilidad de los animales frente a estímulos punzantes. Otro signo importante fue la presencia de hemorragia asociada a mucosas. Los animales retados sistémicamente con el extracto acuoso de *M. ehrenbergii* tuvieron sangrados tanto por el ano como por la nariz. Se han reportado en Sudamérica un número creciente de picaduras fatales por orugas del género *Lonomia*, en las que tras los síntomas iniciales de dolor, sensación de ardor en la zona, dolor de cabeza, náusea y vómito, progresa de forma rápida a una diátesis hemorrágica severa, acompañada comúnmente de hemorragia mucosa, visceral y hematuria (Hossler, 2009). En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de hemorragia en mucosa anal de animales a los que se les aplicó extracto acuoso de pelos de la oruga *M. ehrenbergii*, poniendo de manifiesto la importancia de estudiar los efectos tóxicos que pudiera tener la picadura masiva de orugas *M. ehrenbergii* en un individuo.

La temperatura y presión arterial son dos parámetros que decaen en los animales cuando se presenta un choque anafiláctico. En los animales expuestos sistémicamente al

extracto acuoso no hubo una caída significativa en la temperatura corporal, mientras que sí la presentaron los animales a los que se les inyectó el C48/80. Por su parte, la presión arterial disminuyó en un porcentaje considerable (37%) a los 1.3 min tras la inyección del extracto acuoso, aunque a los tres minutos se restableció alcanzando los valores iniciales. Se sabe que la histamina liberada sistémicamente por los mastocitos ocasiona vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo que ocasiona una disminución del volumen sanguíneo y por tanto una pérdida de presión arterial (Shahid *et al*, 2009). Sin embargo la hipotensión inducida en los animales en respuesta al extracto acuoso es compensada por el organismo y los animales recuperan en poco tiempo su presión arterial normal. En ratas sensibilizadas y expuesta al alérgeno, se ha demostrado que la histamina almacenada en los mastocitos participa en la disminución rápida (al minuto) de la presión arterial que presentan las ratas como consecuencia de la respuesta anafiláctica. Sin embargo, el mantenimiento posterior de la hipotensión arterial asociada a la anafilaxia se debe a otros mediadores químicos asociados al choque, como factor activador de plaquetas y leucotrienos, producidos por otras células diferentes a los mastocitos ya que se presenta en ratas desprovistas de mastocitos (Shibamoto *et al.*, 2007). Estos mediadores inductores de hipotensión a largo plazo parecen no ser inducidos por el extracto acuoso, por lo que la hipotensión es revertida en los animales. La inyección del C48/80 cuando los animales ya habían normalizado su presión arterial generó una caída en la presión arterial que fue rápida, de menor magnitud y más pronta recuperación que la generada por el extracto acuoso. Este comportamiento coincide con el reportado por Peternel (2006), que demuestra que aplicaciones consecutivas y subcutáneas de dosis bajas del C48/80 en ratas induce un vaciamiento en sus mastocitos, de tal forma que la aplicación posterior del C48/80 vía intravenosa no genera una caída abrupta en la presión arterial media de los animales, sino una disminución ligera en la misma que rápidamente se recupera. Por lo tanto, la condición de que el C48/80 no generó una caída significativa en la presión arterial cuando se aplicó posterior al extracto acuoso de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii*, corrobora que el extracto indujo una secreción parcial de la histamina presente en los gránulos de los mastocitos.

VIII. CONCLUSIONES

El extracto acuoso obtenido de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii* posee un pH y una osmolaridad iguales a los de la piel y el plasma sanguíneo, respectivamente, por lo que no son factores participantes en la inducción de la respuesta urticante en los tejidos.

Los estudios *in vitro* demuestran que el extracto acuoso obtenido de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii* activan mastocitos induciendo liberación de histamina.

El extracto acuoso no presenta efecto citotóxico.

La aplicación intradérmica del extracto acuoso obtenido de los pelos de la oruga *M. ehrenbergii* induce una reacción urticante, caracterizada por la rápida formación de un edema-eritematoso. Este efecto urticante se debe a moléculas de naturaleza proteica presentes en el extracto.

La inyección intravenosa del extracto no provoca signos característicos de choque anafiláctico en los animales, aunque si hay una ligera caída en la presión arterial. Sin embargo produce hemorragias en mucosas, concretamente nariz y ano.

IX. GLOSARIO

Anafilaxia cutánea. Reacción anafiláctica local que se caracteriza porque minutos después del contacto con el antígeno se siente prurito y se observa enrojecimiento localizado, seguido por la formación de una o más zonas bien delimitadas de edema.

Anafilaxia sistémica. Reacción de hipersensibilidad de tipo I, en la que la exposición de un individuo sensibilizado a un antígeno específico origina urticaria, prurito y angioedema, seguidos de colapso vascular y choque, acompañados a menudo por una dificultad respiratoria potencialmente mortal.

Compuesto 48/80 (C48/80). Secretagogo, libera específicamente histamina presente en mastocitos por medio de un proceso de desgranulación exocitótica que requiere energía y calcio.

Histamina. Amina biogénica, es uno de los componentes más importante de los gránulos de los mastocitos y su liberación acompaña la desgranulación de los mismos, posee gran variedad de actividades biológicas, incluida la inducción de la vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, broncoconstricción y contracción del músculo liso bronquial.

Lepidóptero. Orden de insectos holometábolos, casi siempre voladores, conocidos comúnmente como mariposas. Sus larvas se conocen como orugas y se alimentan típicamente de materia vegetal.

Mastocito. Célula secretora altamente especializada que participa en las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

Rojo rutenio. Colorante que tiñe selectivamente los gránulos presentes en los mastocitos que son activados para la secreción de su contenido.

X. REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH y Pillai S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. Sexta edición. Elsevier. Barcelona, España.
- Blank U, Rivera J. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 25: 266–73.
- Brocker C, Thompson DC, Vasiliou V. 2012. The role of hyperostomic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts* 3(4): 345-64.
- Butterfield JH, Weiler D, Peterson EA, Gleich GJ, Leiferman KM. 1990. Sequestration of eosinophil major basic protein in human mast cells. *Lab Invest* 62: 77–86.
- Castellón RL, Palma RA, Padilla DC. 2008. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev Mex* 52: 211-24.
- Clem Angela S. 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *J Global Infect Dis* 3: 73-8.
- Crivellato E, Candussio L, Mallardi F, Ribatti D. 2002. Recombinant human alpha-2a interferon promotes an atypical process of mast cell secretion with ultrastructural features suggestive for piecemeal degranulation. *J Anat* 201: 507.
- De Geyter E, Swevers L, Caccia S, Geelen D, Smagghe G. 2012. Saponins show high entomotoxicity by cell membrane permeation in Lepidoptera. *Pest Manag Sci* 68:1199-1205.
- Díaz JH. 2005. The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *Am J Trop Med Hyg* 72: 347-57.
- Dragonetti A, Baldassarre M, Castino R, Demoz M, Luini A, Buccione R, Isidoro C. 2000. The lysosomal protease cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the rat basophilic/mast cell line RBL. *J Cell Sci* 113: 3289–98.

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, and Ezekowitz RAB. 1997. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:29-35.

Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. 2005 Molecular mechanisms of anaphylaxis: Lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol* 115: 449–57.

Fonacier LS, Dreskin SC, Leung DY. 2010. Allergic skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S138-149.

Freeman JG, Ryan JJ, Shelburne CP, Bailey DP, Bouton LA, Narasimhachari N, Domen J, Simeon N, Couderc F, Stewart JK. 2001. Catecholamines in murine bone marrow derived mast cells. *J Neuroimmunol* 119: 231–38.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM and Tsai M. 2005a. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol* 23: 749–86.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. 2005b. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*; 6:135–42.

Goldsby R, Kindt T, Osborne A, y Kubi J. 2004. *Inmunologia*. Editorail Mc GRaw Hill, quinta edición, México, pp 655.

Hossler EW. 2009. Caterpillars and moths. *Dermatol Ther* 22: 353-66.

Inagaki N, Goto S, Yamasaki M, Nagai H, Koda A. 1986. Studies on vascular permeability increasing factors involved in 48-hour homologous PCA in the mouse ear. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 80:285–90.

Inagaki N, Nagai H. 2009. Analysis of the Mechanism for the Development of Allergic Skin Inflammation and the Application for Its Treatment: Mouse Models for the Development of Remedies for Human Allergic Dermatitis. *J Pharmacol Sci* 110: 251-59.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Inal A, Altintas DU, Güvenmez H, Yilmaz M, Kendirli SG. 2006. Life-threatening facial edema due to pine caterpillar mimicking an allergic event. *Allergol Immunopathol* 34: 171-73.

Kanani A, Schellenberg R, Warrington R. 2011. Urticaria and angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 7: 1-10.

Kaplan AP. 2004. Chronic urticaria: pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 114: 465-474.

Kindt Thomas J, Osborne Barbara A, Goldsby Richard A, Freeman W. 2006. *Immunology*. Sexta edición. pp 473.

Kitamura Y. 1989. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu. Rev. Immunol* 7: 59-76.

Kis GK, Molnár AH, Daruka L, Gardi J, Rákosi K, László F, László FA, Varga C. 2012. The osmotically and histamine-induced enhancement of the plasma vasopressin level is diminished by intracerebroventricularly administered orexin in rats. *Eur J Physiol* 463: 531-36.

Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, *et al.* 2009. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* 206: 411-20.

Kim J y Jung Y. 2012. Increased aquaporine-1 and Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporter 1 expression in choroid plexus leads to blood-cerebrospinal fluid barrier disruption and necrosis of hippocampal CA1 cells in acute rat models of hyponatremia. *J Neurosci Res* 90: 1437-44.

Kindt TH, Goldsby RA y Osborne BA. 2007. *Kuby Immunology*. Sexta edición. Freeman and Company. USA.

Kunder CA, St John AL, Abraham SN. 2011. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. *Blood* 20: 1-12.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Kushnir-Sukhov NM, Brown JM, Wu Y, Kirshenbaum A, Metcalfe DD. 2007. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol* 119: 498–99.

Lagunoff D. 1972a. Vital staining of mast cells with ruthenium red. *J Histochem Cytochem* 11: 938-44.

Lagunoff D. 1972b. The mechanism of histamine release from mast cells. *Biochem Pharmacol* 21:1889.

Lamy M, Pastureaud M, Novak F, Ducombs G, Vincendeau P, Maleville J, Texier L. 1985. Thaumetopoein: an urticating protein from the hairs and integument of the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff., Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *Toxicon* 24: 347-56.

Lamy M, Vincendeau P, Ducombus G, Pastureaud MH. 1983. Irritating substance extracted from the *Thaumetopoea pityocampa* caterpillar; mechanism of action. *Experientia* 39.

Li XM, Wang QF, Schofield B, Lin J, Huang SK, Wang Q. 2009. Modulation of antigen-induced anaphylaxis in mice by a traditional Chinese medicine formula, Guo Min Kang. *Am J Chin Med* 37:113–25.

Lundequist A, Pejler G. 2010. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol Life Sci* 1: 1-11.

Macías AC. 2006. Moléculas de adhesión. Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 22.

Martin S, Esser P, Weber F, Jacob T, Freudenberg M, Schmidt M, Goebeler M. 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. John Wiley & Sons A/S.

McFadden ER, Gilbert IA. 1992. Asthma. *N Engl J Med* 327: 1928-37.

Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033.

Metcalfe DD, Peavy RD and Gilfillan AM. 2009. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 124: 639-46.

Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. 2007. Mast cell in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 217: 1-26.

Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Toshimura T, Sekar Y, *et al.* 2010. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Nature* 3:111.

Novak F, Pelissou V, Lamy M. 1987. Comparative morphological, anatomical and biochemical studies of the urticating apparatus studies of the urticating apparatus and urticating hairs of some Lepidoptera: *Thaumetopoea pityocampa* Shiff., *Th. Processionea* L. (Lepidoptera, Thaumetopoeidae) and *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera, saturniidae). *Comp Biochem Physiol* 1: 141-6

Ohtsu H. 2008. Progress in allergy signal research on mast cells: the role of histamine in immunological and cardiovascular disease and the transporting system of histamine in the cell. *J Pharmacol Sci*; 106:347–353.

Ono E, Taniguchi M, Mita H, Fukutomi Y, Higashi N, Miyazaki E, *et al.* 2009. Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 39: 72-80.

Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 11: S63-8.

Peavy RD, Metcalfe DD. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. 2008. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 310-5.

Pickett JA, Edwardson JM. 2006. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* 7: 109.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Pongor É, Altdorfer K, Fehér E. 2011. Colocalization of substance P with tumor necrosis factor- α in the lymphocytes and mast cells in gastritis in experimental rats. *Imflamm Res* 60: 163.

Rao N, Brown M. 2008. Multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann NY Acad Sci* 1143: 83–104.

Riley JF. 1953. Histamine in tissue mast cells. *Science* 118:332.

Ringvall M, Rönnberg E, Wernersson S, Duelli A, Henningsson F, Åbrink M, Garcia-Faroldi G, Fajardo I, Pejler G. 2008. Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1020–26.

Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. 2008. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol* 98: 85–120.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. 2006. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev* 86: 1309.

Rothschild AM, Schayer RW. 1959. Characterization of histidine decarboxylase from rat peritoneal fluid mast cells. *Biochim Biophys Acta* 34: 392–98.

Ruitenbergh EJ, Elgersma A. 1976. Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature* 264: 258.

Sade K, Schwartz IF, Etkin S, Schwartzberg S, Levo Y, Kibity S. 2007. Expression of inducible nitric oxide synthase in a mouse model of anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17: 379-85

Salinas E, Ventura J, Córdova LE, Quintanar JL. 2004. Presence of SNPA-25 in rat mast cells. *Immunol Lett* 65:105–8.

Salinas E, Quintanar A, Quintanar J, Ramírez N. 2009. Allergen-sensitization in vivo enhances mast cell-induced inflammatory responses and supports innate immunity. *Immunology Letters* 127: 48-54.

Salinas E. 2012. Neuroimmune biology of mast cells. *Adv Neuroimmunol Biol* 2: 1-16.

Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, *et al.* 2005. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 115: 584-91.

Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M, Ali Khan R. 2009. Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an update systematic review. *Open Immunol J* 2: 9-41.

Schechter NM, Irani AM, Sprows JL, Abernethy J, Wintroub B, Schwartz LB. 1990. Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol* 145: 2652–61.

Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. 1981. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol* 126:1290–94.

Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. 1987. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol* 138: 2611–15.

Schwartz LB. 2008. Heparin comes clean. *N Engl J Med* 358: 2505-9.

Selye H. 1965. *The mast cells*. Washington: Butterworths.

Shore PA, Burkhalter A, Cohn Jr VH. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 127: 182-186.

Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. 2004. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci* 101:13607–12.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Simons FER. 2009. Anaphylaxis: recent advances in assessment and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 4: 1-12.

Simons FER, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Finkelman F, Golden DBK, *et al.* 2007. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 120: S2-24.

Simons FE. 2008. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 121: S402-7.

Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J. 1987. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci* 84: 2975.

Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. 2002. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 109: 658-68.

Tupper J, Visser S. 2010. Anaphylaxis. A review and update. *Canadian Family Physician* 56(10): 1009-11.

Vázquez L. (1934). Contribución al conocimiento de los lepidópteros mexicanos (*Morpheis ehrenbergii* Hbn.). *An Inst Biol*; 5(2): 259-267.

Vega JM, Moneo I, Armentia A, Fernández A, Vega J, De la Fuente R, Sánchez P, and Sanchís ME. 1997. Allergy to the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*). *Clin Exp Allergy* 29: 1418-23.

Von Andrian UH, Mackay CR. 2000. Advances in Immunology: T cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020-34.

Wolters PJ, Laig-Webster M, Caughey GH. 2000. Dipeptidyl peptidase I cleaves matrix-associated proteins and is expressed mainly by mast cells in normal dog airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:183-90.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Yamaki K, Yoshino S. 2011. *Aspergillus oryzae* lectin induces anaphylactoid oedema and mast cell activation through its interaction with fucose of mast cell-bound non-specific IgE. *Scan J Immunol* 74: 445-53.

Ziprkowsky L, Rolant F. 1966. Study of the toxin from the poison hairs of *Thaumetopoea wilkinsoni* caterpillars. *J Invest Derm* 46: 439-45.

