

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

**“ Desarrollo, caracterización y análisis
de la alergenicidad de sustitutos
lácteos empleados en pacientes
alérgicos a proteínas de leche bovina”**

Bioq. Paula Adriana Rozenfeld

TESIS
PA
983



2003

DONACION.....
A.....
Fecha.....
Inv. B..... Inv. B. 57043



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

El presente trabajo de Tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado bajo la Dirección del Dr. Carlos Alberto Fossati y la Codirección de la Dra. María Cristina Añón en la Cátedra de Inmunología y el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos.

DONACION.....
A.....
Fecha...15-07-03...
Inv. E.....Inv.....B.S.F.043

AGRADECIMIENTOS

A Alberto Fossati

En principio por haberme aceptado como integrante del laboratorio y permitido trabajar en él. Por darme la libertad necesaria para poder aprender y dejarme equivocarme, y de esa forma fortalecer aun más los conocimientos; por depositarme tu confianza, por dejarme trabajar según mi ritmo, y principalmente por tu bondad, sencillez y sinceridad

A Cristina Añón

En principio, por haberme permitido empezar mi carrera en investigación en el CIDCA, por estar siempre dispuesta a ayudarme y tener un tiempo para escucharme, por darme todo tu apoyo cuando lo necesité.

A Guillermo Docena

Por ayudarme y haber estado presente desde las primeras etapas, por elaborar y discutir junto a mí todos los experimentos y resultados, por compartir conmigo el tema de este trabajo de tesis.

A Gustavo Martínez y Marcos Cívello

Con quienes me inicié en esto de la investigación, me enseñaron sus reglas básicas, y empecé a descubrir la magia que encierra.

A María Serradell

Por el apoyo incondicional como amiga y compañera de laboratorio, por haber tenido las mismas ganas que yo de trabajar en el mismo grupo, por las largas charlas que hemos tenido durante este lapso, por haber compartido conmigo cada paso de este trabajo, al igual que la carrera

A Fernando Chirido

Por haberme presentado el grupo de Inmunología, por tratar siempre de ayudar cuando te es posible, por preocuparte por las cosas de los demás

A Federico Galizia

Por ayudarme con mis ignorancias informáticas, por compartir las mesadas del laboratorio y a veces las mismas ideas.

A Amanda Rey

Que siempre tiene una palabra de apoyo y aliento, y está dispuesta a escuchar y charlar cuando lo he necesitado.

A Martín Rumbo

Que a pesar de no haber compartido mucho, siempre estuviste presente sin dudarlo

A los integrantes del CIDCA

En general, por haberme aceptado para trabajar en el instituto, y ayudarme ante las distintas dificultades surgidas en el camino

Y en particular

a Aldo Campana por su gran empeño puesto para resolver con el HPLC cada una de mis problemáticas presentadas

a Isabel Molina quien me enseñó a preparar la leche de soja
a Lorenza Costa que me facilitó la columna y patrones de FPLC

A mi familia, y en especial a
Martina, Julián y Fabián...

INDICE GENERAL

Introducción	1
Objetivos	71
Materiales y Métodos	73
Resultados y Discusión	95
Conclusiones	155
Bibliografía	158

"En el campo de la observación, la oportunidad sólo favorece a la mente preparada"

INTRODUCCION



INDICE

I- Alergia	4
I-1 Introducción histórica	4
I-2 Definición y mecanismos de las reacciones alérgicas	5
II- Alergia atópica	8
II-1 Introducción	8
II-2 Sistema inmune	9
II-3 IgE	12
II-3.a Características estructurales	12
II-3.b Cambio de isotipo a IgE	12
II-3.c Localización de IgE	13
II-4 Receptores de superficie para IgE	13
II-5 Células efectoras	15
II-5.a Mastocitos y basófilos	15
II-5.b Eosinófilos	20
II-5.c Quimoquinas	20
II-6 Respuestas efectoras	23
II-7 Tipos de enfermedades atópicas	25
II-8 Respuesta inmune dependiente de IgE: defensa contra parásitos	26
II-9 Etiología	27
II-9.a Factores genéticos	28
II-9.b Factores ambientales	29
II-10 Tratamiento	32
III- Alergenos	34
III-1 Características generales	34
III-2 Clasificación de alergenos	35

IV- Alergia alimentaria	36
IV-1 Generalidades	36
IV-2 Alimentos transgénicos	38
IV-3 Tolerancia oral	39
IV-4 Diagnóstico	41
IV-4.a Historia clínica	41
IV-4.b Identificación del alérgeno alimentario	42
IV-4.c Análisis <i>in vivo</i>	43
IV-4.d Análisis <i>in vitro</i>	46
IV-5 Modelos animales de alergia alimentaria	48
V- Alergia a leche de vaca	50
V-1 Incidencia	50
V-2 Etiología y patogenia	50
V-3 Aspectos clínicos	51
V-4 Composición de la leche de vaca. Proteínas de la leche de vaca	52
V-5 Alérgenos de la leche de vaca	56
V-6 Prevención	57
V-7 Sustitutos lácteos	58
V-7.a Leche de distintas especies de mamíferos	59
V-7.b Fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de leche bovina	60
V-7.c Fórmulas a base de proteínas de soja	63
V-7.c.1 Proteínas de soja	64
V-7.c.2 Alergia a soja	67



I- Alergia

I-1 Introducción histórica

El término alergia, introducido por von Pirquet (von Pirquet, 1963) se refiere a todas las formas de reactividad diferente ante una estimulación antigénica, sin importar si esta resulta en una respuesta protectora o en una reacción adversa ante un antígeno. Sin embargo la definición más general de alergia es la de reactividad alterada del sistema inmune ante un estímulo antigénico.

John Bostock, en 1828 describió los síntomas de fiebre de heno en él y otras 27 personas de Londres. Más tarde, en 1862, Philip Phoebus, realizó una descripción basada en 300 pacientes, sobre factores geográficos, hereditarios y sociales. En 1873, Charles Blackley, dio evidencia del polen como agente causal de la enfermedad. Y además, realizó la primer asociación con el estilo de vida: “con el avance de la educación y civilización, se producirá un aumento de la enfermedad”.

La presencia de un anticuerpo presente en el suero que producía reacción alérgica fue demostrada por primera vez por Prausnitz. Este se sensibilizó pasivamente inyectándose en la piel suero de su paciente Kustner, que era alérgico al pescado. Posteriormente, desafió a esa porción de piel con el alergeno, y le apareció una reacción de habón y eritema (Prausnitz, 1921). Esta reacción se denominó de “Prausnitz-Kustner”. Ese anticuerpo se llamó "reagina", pero no podía ser clasificado dentro de las clases de anticuerpos conocidos hasta el momento.

Cuarenta años más tarde, dos grupos de investigación separados encuentran una nueva clase de inmunoglobulina: la inmunoglobulina E (IgE).

El grupo de Johansson (Johansson, 1967) detectó un paciente con un mieloma, cuya inmunoglobulina no tenía los determinantes antigénicos de las inmunoglobulinas conocidas hasta el momento (IgG, IgM, IgA ni IgD) y la llamaron proteína ND. Esta proteína sería una nueva subclase o un nuevo isotipo de inmunoglobulina.

El grupo de Ishizaka e Ishizaka (Ishizaka, 1968) analizan sueros de pacientes atópicos y aislaron la fracción con actividad reagínica. Esa inmunoglobulina tampoco es detectada por antisueros contra los otros 4 isotipos (IgG, IgM, IgA ni IgD), y la llamaron

IgE. Su concentración en sueros de pacientes normales está en el orden de 0,1 a 0,7 $\mu\text{g/ml}$, y su nivel está aumentado en atópicos.

Estos dos grupos compararon sus inmunoglobulinas, y llegaron a la conclusión que se trataba de la misma, y que era un nuevo isotipo, el que se denominó definitivamente IgE.

A partir de ese momento en que se aisló y purificó la IgE, se produjeron anticuerpos específicos para la cadena pesada ϵ . Esto permitió el surgimiento y desarrollo de métodos inmunoquímicos de cuantificación por radioinmunoensayo de IgE total e IgE específica en discos de papel de celulosa, desarrollados por Ceska (Ceska, 1981).

Uno de los alérgenos predominantes en distintas regiones del mundo es el polvo doméstico. En 1964, Voorhorst (Voorhorst, 1964) descubre que el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* es el alérgeno del polvo.

I-2 Definición y mecanismos de las reacciones alérgicas

En ciertos individuos se generan respuestas inmunes adaptativas contra antígenos inocuos que pueden ocasionar patologías graves. Si ese antígeno es una proteína extraña inocua del medio ambiente, la respuesta se llama alergia o hipersensibilidad y a dicha proteína se la denomina alérgeno; si es un antígeno de un tejido propio, se denomina autoinmunidad; la respuesta contra órganos trasplantados se llama rechazo de trasplante.

Las reacciones alérgicas pueden ser producidas por cualquiera de las 4 reacciones de hipersensibilidad (tipos I a IV), definidas por Coombs y Gell (Coombs, 1975), que son reacciones que pueden ser deletéreas para los tejidos o causar daño al organismo. No obstante, a veces, se producen combinaciones de respuestas y múltiples mecanismos efectores. La clasificación es la siguiente:

Reacción de hipersensibilidad de tipo I

También se la llama reacción de hipersensibilidad inmediata. El alérgeno (una partícula soluble) reacciona con células de un tejido, principalmente mastocitos. Estas

células han sido sensibilizadas pasivamente con anticuerpos específicos, de isotipo IgE, que fueron generados en un contacto anterior con el alérgeno, resultando en la liberación de mediadores que producen inflamación. En este caso particular, la alergia se denomina alergia atópica o atopía. Los síntomas se desarrollan en segundos o minutos, e incluyen anafilaxis, angioedema, urticaria, asma, eccema atópico, rinitis alérgica.

Reacción de hipersensibilidad tipo II

Las reacciones tipo II son producidas por anticuerpos, IgG o IgM, que se unen a antígenos en células o a matrices extracelulares. Causan enfermedades que afectan específicamente a las células o tejidos en los que están presentes esos antígenos, y a menudo no son sistémicas. En la mayoría de los casos, estos anticuerpos son autoanticuerpos o en ocasiones pueden ser anticuerpos contra antígenos extraños que presentan inmunoreactividad cruzada con un componente de los tejidos propios.

Se dividen a su vez en dos subclases, a y b. Las primeras son reacciones citotóxicas, en la cual el anticuerpo reacciona con una superficie celular o con un antígeno o hapteno asociado a la superficie de una célula propia. Los mecanismos mediante los cuales causan enfermedad pueden ser opsonización y fagocitosis de las células o inflamación y lesión tisular mediada por el complemento y por fagocitos que presentan el receptor FcγR. Ejemplos de este tipo de reacciones son las transfusiones de sangre incompatibles, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune.

En las reacciones tipo b el anticuerpo se une a un receptor de una superficie celular, e interfiere en su función celular normal. La patología depende de las características de la unión del anticuerpo al receptor, la cual puede producir aumento o disminución de función de dicho receptor. Un ejemplo lo constituye la Miastenia gravis, en la cual el anticuerpo específico es un antagonista del receptor de acetilcolina.



Reacción de hipersensibilidad tipo III

Las tipo III son las reacciones debidas a la formación de inmunocomplejos, donde el anticuerpo IgG o IgM se une a un antígeno soluble. Este antígeno puede ser un autoantígeno o un antígeno extraño. Las características anatomopatológicas de las enfermedades por inmunocomplejos reflejan el o los sitios de depósito de los complejos antígeno-anticuerpo, y no están determinadas por la fuente del antígeno. Por consiguiente, tienden a ser enfermedades sistémicas, con una especificidad escasa o nula por un antígeno particular localizado en un tejido u órgano determinado.

Estos complejos causan enfermedad cuando se producen en cantidades excesivas, no se eliminan de forma eficiente o se depositan sobre ciertos tejidos. El grado de depósito de inmunocomplejos en los tejidos está determinado por las características de los vasos sanguíneos y por la naturaleza de los complejos. Los capilares de los glomérulos renales y la membrana sinovial son vasos en los que el plasma se somete a una ultrafiltración (formando la orina y el líquido sinovial, respectivamente), y estas localizaciones son dos de los lugares más habituales de depósito de complejos inmunes, siendo las manifestaciones clínicas vasculitis, nefritis y artritis. Las propiedades fisicoquímicas de los antígenos y los anticuerpos, como la carga, la valencia y el isotipo de inmunoglobulina pueden influir en la formación y el depósito.

El depósito de los complejos en las paredes vasculares provoca la activación del complemento. Esto produce el reclutamiento y activación de las células inflamatorias, principalmente neutrófilos para que secreten citoquinas y mediadores vasoactivos que provocan un aumento de la adhesión de los leucocitos al endotelio, un aumento de la permeabilidad vascular y un mayor depósito de complejos en las paredes vasculares agrandando los espacios interendoteliales. Ej. enfermedad del suero, reacción de Arthus.

Reacción de hipersensibilidad tipo IV

Las reacciones de tipo IV son las reacciones mediadas por células T, que pueden ser CD4 Th1 o CD8. Las reacciones producidas por linfocitos T CD4 producen una inflamación crónica, que aparece lentamente, en horas o días, y persiste durante largos períodos. Estas células secretan citoquinas que activan a los macrófagos. La lesión tisular



se debe a los productos de los macrófagos activados como enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno, óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias. Las células del endotelio vascular en las lesiones pueden expresar un nivel aumentado de moléculas de adhesión y de clase II del MHC. A menudo producen fibrosis a consecuencia de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento por los macrófagos. Ej. diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide.

En las reacciones mediadas por CD8, estas células lisan directamente a las células que son portadoras de antígenos asociados a moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células CD8 principalmente eliminan células infectadas por virus, aunque dicho virus carezca de efectos citopáticos y producen lesión tisular aunque la infección no sea dañina para el huésped.

Las reacciones alérgicas ocurren cuando un organismo ya sensibilizado es reexpuesto al mismo alérgeno. La sensibilización implica la entrada del mismo a través de alguna de las mucosas (vías aéreas, tracto gastrointestinal o piel) y posterior generación de una respuesta inmune alterada contra ese alérgeno particular. Luego de la sensibilización, las sucesivas exposiciones de alguna de las mucosas al mismo alérgeno, desencadenará una reacción alérgica.

II- Alergia atópica

II-1 Introducción

La alergia atópica o reacción de hipersensibilidad de tipo I es mediada por la inmunoglobulina E (IgE). La principal vía de ingreso de los alérgenos al organismo se produce a través de las mucosas, en especial las mucosas gastrointestinal y respiratoria. Estas mucosas están provistas de un sistema especializado de células, el sistema inmune de mucosas, que se encarga de montar la respuesta inmune localizada frente a la entrada de una sustancia extraña. Ante la primer entrada del alérgeno, éste es captado por células dendríticas de la mucosa y es llevado a los ganglios linfáticos, donde se desarrollará una respuesta inmune. Mediante la colaboración de células presentadoras de antígenos, linfocitos T y linfocitos B, se produce una respuesta alterada que

desencadena la síntesis y secreción de IgE por parte de los linfocitos B. La IgE secretada pasa a circulación y se une a receptores específicos presentes en la membrana de distinto tipo de células (basófilos, mastocitos, eosinófilos activados) donde cumplirá su rol efector. Este proceso se denomina sensibilización (Figura A). Ante la subsiguiente entrada del alérgeno, este se unirá a la IgE presente en la superficie de dichas células, las cuales se activarán y desencadenarán la respuesta efectora.

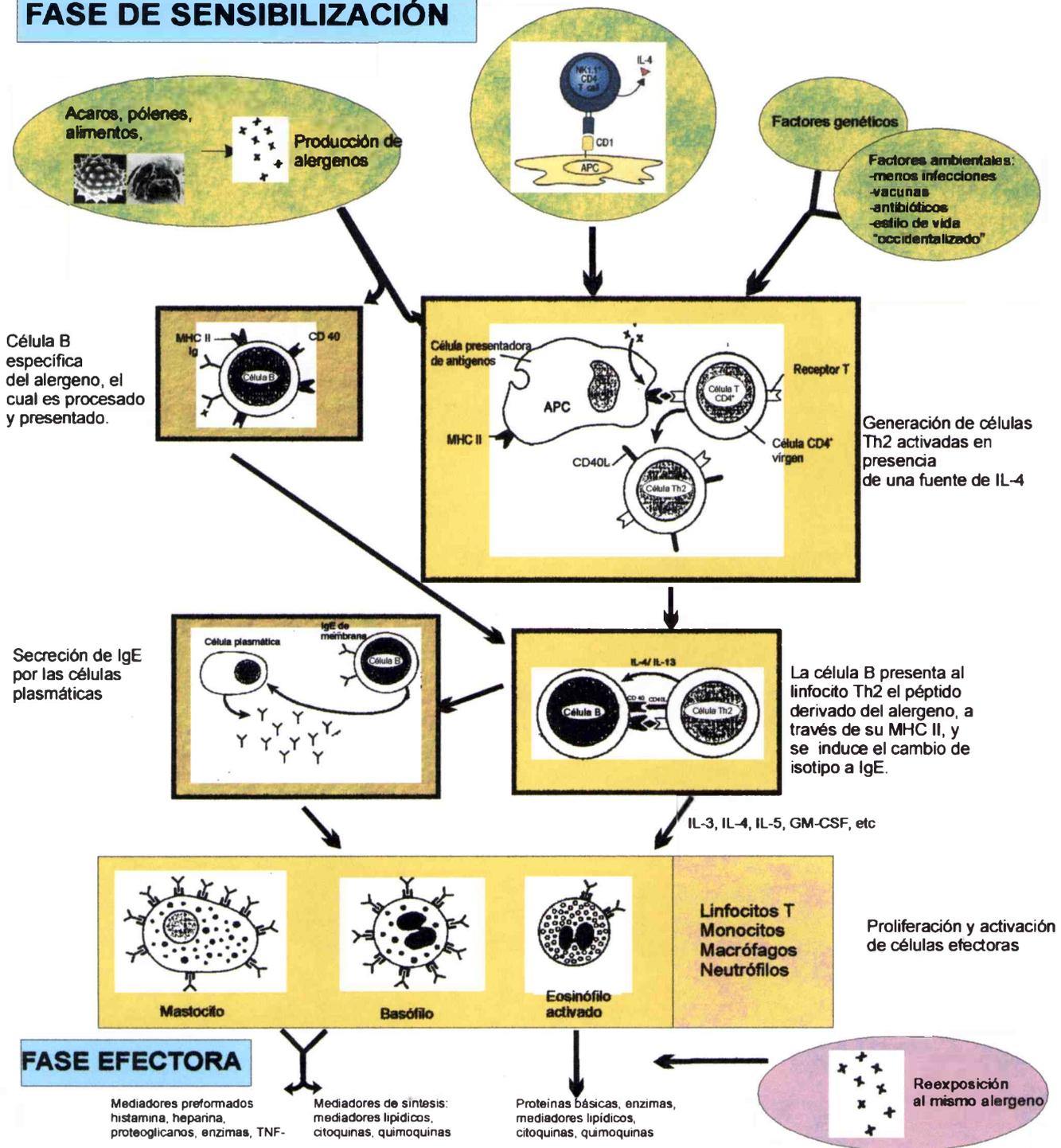
En la figura A se muestra un esquema general de los eventos que conducen a la aparición de una reacción alérgica. En adelante, se describe cada uno de los pasos implicados.

II-2 Sistema inmune: Th1-Th2

Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, al dejar el timo, están predestinados a convertirse en células citotóxicas. En cambio, los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en 2 subtipos: Th1 ó Th2, los cuales difieren en las citoquinas que producen. La diferenciación entre esos 2 destinos se produce en el primer encuentro del linfocito T CD4 vírgen con su antígeno específico, siendo muy importantes las citoquinas que son producidas por las células de la respuesta innata y las interacciones con las células presentadoras de antígenos. La producción de Th1 lleva principalmente a una inmunidad mediada por células fagocíticas, mientras que la de Th2, a inmunidad humoral. Los Th1 están especializados para activar macrófagos, y producen IL-2 e IFN- γ . La función principal de los Th2 consiste en activar células B, y secretar interleuquinas, como IL-4. Esta citoquina junto a la IL-13 media el cambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE.

Hay 2 componentes principales del sistema inmune que llevan a la producción de IgE. El primero favorece la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes (o Th0) a Th2. La exposición a IL-4 favorece la diferenciación a Th2. Ese Th2 va a producir y secretar un grupo específico de citoquinas: IL-3, 4, 5, 6, 9, 10 y 13. El segundo componente involucra la acción de citoquinas y señales coestimuladoras provenientes de linfocitos Th2 que estimulan a los linfocitos B al cambio de isotipo a IgE (ver más adelante).

FASE DE SENSIBILIZACIÓN



FASE EFECTORA

Reacción inmediata	Reacción tardía	Inflamación alérgica crónica
<ul style="list-style-type: none"> -Contracción del músculo liso de bronquios -Contracción del músculo liso intestinal -Hipersecreción de mucus por células de Goblet -Aumento de permeabilidad vascular -Edema -Aumento de flujo sanguíneo local -Aumento de producción de factores quimiotácticos (ej. eotaxina) y expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales. 	<ul style="list-style-type: none"> -Acumulación de células inflamatorias: neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, células T. -Ocurre entre 2 a 24 hs de la exposición al alérgeno -Infiltración celular del tejido 	<ul style="list-style-type: none"> -Cambios estructurales en el tejido -Alteración de función de órganos

Figura A: Esquema de los eventos que conducen a la aparición de una reacción alérgica

No se conoce aún la procedencia de la IL-4 temprana necesaria para dicha diferenciación a Th2. En ratones se observó que las células dendríticas activan, vía CD1, un grupo especializado de linfocitos T CD4⁺, las células NK^{1.1+}, que producen IL-4 en forma temprana y abundante (Figura B) (Chen, 1997). No se sabe si esta vía es también importante en humanos. Otra fuente potencial serían mastocitos, basófilos y/o eosinófilos (Paul, 1993).

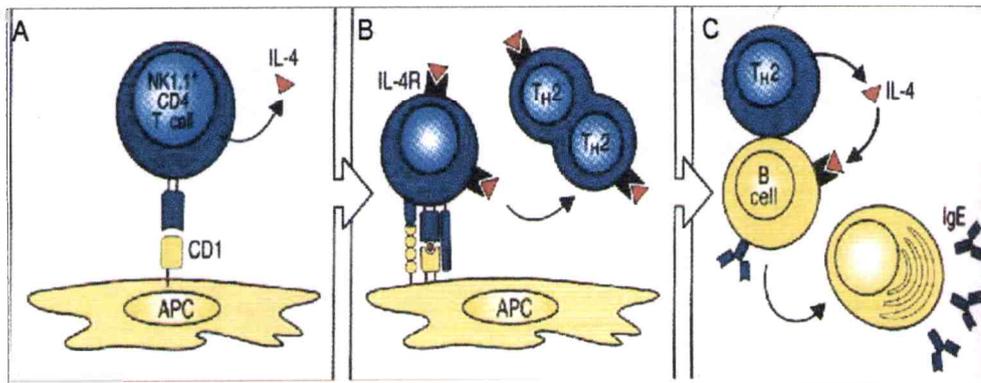


Figura B: Producción de IgE mediada por linfocitos Th2, que se desarrollaron en presencia de IL-4 proveniente de células DC4 NK1.1⁺. A: Secreción de IL-4 por células CD4 NK1.1⁺ que interactúa con una célula presentadora que expresa CD1. B: Los linfocitos T vírgenes se diferencian a Th2. C: interacción entre el linfocito Th2 y un linfocito B. (De: "Immunobiology. The immune system in health and disease.", Janeway, Travers, Walport, Slomchik, 2001).

Las enfermedades atópicas están caracterizadas por un desbalance entre las citoquinas Th1 (IFN- γ , entre otras) y Th2 (principalmente IL-4, 5, 13) (Romagnani, 1997), de modo que se producen cantidades anormalmente mayores de citoquinas tipo II respecto a las tipo I (Bacharier, 1998). Este desbalance puede llevar a la producción elevada de IgE.

Una capacidad disminuida de los linfocitos de sangre de cordón para producir IFN- γ se correlaciona con tendencia aumentada a atopía (Tang, 1994).

La prostaglandina E₂ (PGE₂) afecta el balance de citoquinas tipo I/II, suprimiendo la secreción de IFN- γ (Demeure 1997). La síntesis y liberación de PGE₂ depende, en parte, de factores ambientales tales como la dieta y agentes infecciosos.



II-3 IgE

II-3.a Características estructurales

La molécula de la IgE, al igual que los demás isotipos consiste de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas. A diferencia de las cadenas γ (IgG) que poseen tres dominios en su región constante, la cadena ϵ (IgE), al igual que la μ presenta cuatro dominios constantes. Ese dominio de más, el $C\epsilon 2$ reemplaza a la región bisagra, la cual está ausente. Sin embargo esto no indica que no tenga flexibilidad, sino que podría estar indicando un grado evolutivo inferior. Los dominios $C\epsilon 2$ de ambas cadenas pesadas están unidos por un puente disulfuro. La estructura es curvada y asimétrica en la región de los dominios $C\epsilon 2$ y $C\epsilon 3$ (Wan, 2002). La IgE tiene un porcentaje de hidratos de carbono (13%) similar a la IgM (10%) y mayor al del resto de los isotipos (3-9%). No atraviesa la placenta ya que este tejido no posee los receptores para $C\epsilon$, ni tiene la capacidad de fijar complemento ya que no es reconocida por C1q. A diferencia del resto de los isotipos, la IgE se une a sus receptores para la porción Fc en ausencia de antígeno.

II-3.b Cambio de isotipo a IgE

La inducción de la síntesis de IgE requiere la unión del alérgeno a la inmunoglobulina de superficie de membrana (IgM) de células B específicas de ese alérgeno. Luego, el complejo inmunoglobulina-alérgeno se internaliza, se procesa y se presenta en superficie a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). El complejo MHC II-péptido es reconocido por el receptor de linfocitos T (TCR) del Th2. Este Th2 le va a proveer 2 señales al linfocito B para inducir la síntesis de IgE. Una de ellas es principalmente dependiente de las citoquinas IL-4 e IL-13. Esto resulta en la activación de la transcripción en una región específica del locus de cadena pesada de inmunoglobulinas. La otra señal involucra la unión entre CD40 del linfocito B y el ligando de CD40 (CD40L) del linfocito Th2; la cual activa la maquinaria de recombinación de DNA.

La unión del MHC-II de la célula B con el TCR produce en el linfocito T la expresión del CD40L, que se une al CD40 en el linfocito B, el que es expresado en forma constitutiva. Esto produce en la célula B la expresión de B7.2 (CD 86), el cual se une a CD28, induciendo la secreción de IL-4. Además existen estudios que indican que los mastocitos activados podrían inducir la síntesis local de IgE en las células B (Pawankar, 1997).

La unión de IL-4 e IL-13 a sus receptores en las células B lleva a la activación de STAT-6 (factor de transcripción) (Kaplan, 1996) e induce la transcripción de la forma de línea germinal de cadena pesada ϵ (Del Prete, 1988). Allí va a actuar la maquinaria de recombinación, que produce la unión entre la zona upstream al $C\epsilon$ y downstream los exones VDJ, dando un gen intacto para cadena pesada ϵ (Lorenz, 1995).

II-3.c Localización de IgE

La IgE en plasma se presenta como monómero y su concentración es muy baja (comparada con los otros isotipos). Los valores de IgE total son menores de 500 ng/ml en personas no atópicas. Las concentraciones en personas parasitadas o atópicas puede ser 100-1000 veces mayores (Merrett, 1997). La IgE se encuentra principalmente en los tejidos, unida a la membrana de células, tales como mastocitos, a través de receptores para la porción Fc de IgE. En circulación tiene una vida media corta (2,5 días), sin embargo en los tejidos es del orden de semanas.

II-4 Receptores de superficie para IgE

Hay 2 tipos de receptor de IgE (Figura C)

Fc ϵ RI o Receptor de alta afinidad

Se une a IgE monomérica, a través del dominio $C\epsilon 3$ (Nissim, 1992) con una afinidad (K_a) de 10^9 (McDonell, 2001) a $10^{10} M^{-1}$ (Ishizaka, 1986) y una constante de disociación de $10^5 M^{-1}$ (Kulczycki, 1974) . Está formado por 4 cadenas polipeptídicas, $\alpha\beta\gamma_2$. La cadena α tiene una porción extracelular, con dos dominios tipo inmunoglobulina, que forman el sitio de unión para la IgE. La cadena β atraviesa 4 veces



la membrana plasmática, y los extremos amino y carboxilo terminal están expuestos hacia el citoplasma. Tiene en su porción citoplasmática un motivo de activación del inmunorreceptor vía tirosina (ITAM). Participa de la señalización e incrementa la estabilidad del receptor. Las dos cadenas γ , unidas por un puente disulfuro, son las responsables del transporte del receptor desde el aparato de Golgi a la membrana y participan en la transducción de señales, para lo cual tienen cada una un motivo ITAM. Está presente en la membrana de mastocitos, basófilos y eosinófilos activados (Ishizaka, 1970). La expresión en superficie está regulada positivamente por la concentración de IgE (Yamaguchi, 1999), lo cual proporciona un mecanismo para la amplificación de las funciones efectoras mediadas por la IgE, o en otras palabras les permite a las células responder en mayor medida ante menores cantidades de alérgeno. Su función principal es participar en la activación de las células que poseen este receptor. La activación ocurre cuando un alérgeno se une a varias (por lo menos 2) moléculas de IgE unidas al receptor en la membrana plasmática, produciendo el entrecruzamiento de estos receptores. Así, se inicia la cascada de transducción de señales (Metzger, 1992). Con el puenteo de unos 100 pares de moléculas es suficiente para iniciar la degranulación de los mastocitos (Dembo, 1979).

Se ha encontrado la expresión de este receptor de alta afinidad en otros tipos celulares, por ejemplo en neutrófilos de personas asmáticas, a través del cual se inducía la liberación de IL-8 (Gounni, 2001).

Recientemente se observó en monocitos, células de Langerhans y células dendríticas la expresión de una forma trimérica ($\alpha\gamma_2$) del receptor de alta afinidad, que participaría en la modulación de la diferenciación de estos tipos celulares (Novak, 2001).

Fc ϵ RII o CD23 o Receptor de baja afinidad

Tiene una $K_a = 10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kulczycki, 1974). Es una glicoproteína de 45 kDa, que es miembro de la familia de las lectinas. Hay 2 formas de CD23: a y b (Yokota, 1988). La forma a se encuentra en linfocitos B poco diferenciados, mientras que la forma b se encuentra en linfocitos B, linfocitos T activados, monocitos, eosinófilos, plaquetas, células dendríticas foliculares, algunas células tímicas epiteliales (Delespesse, 1992). Las funciones propuestas de este receptor consisten en mediar la presentación de antígeno a



linfocitos T, regulación de la síntesis de IgE, fagocitosis dependiente de IgE, activación de linfocitos B, homing de linfocitos B a centros germinales, adhesión celular (Conrad, 1994).

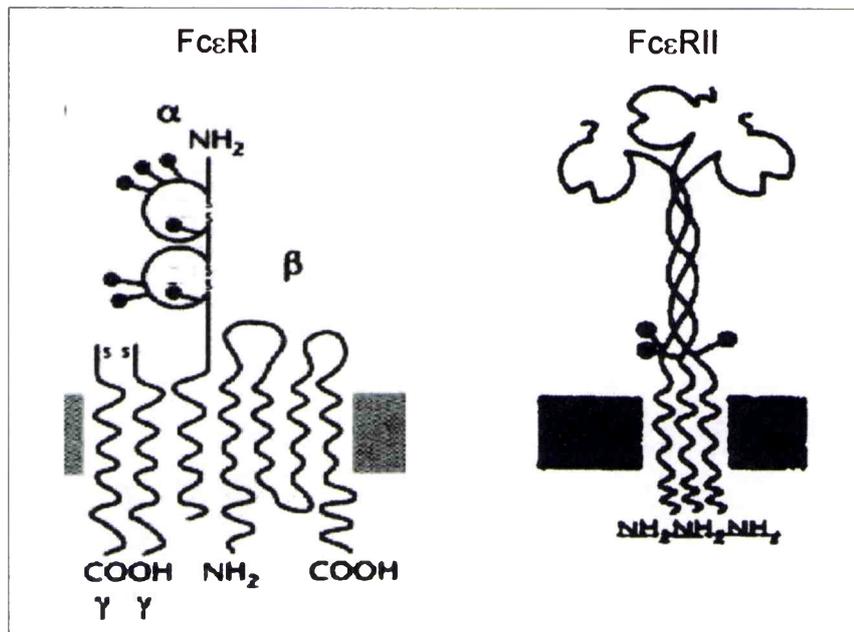


Figura C: Estructura de los receptores para Fc de IgE. (Barclay, 1997)

II-5 Células efectoras

Las principales células efectoras en los procesos alérgicos son los mastocitos, basófilos y eosinófilos. Además en las reacciones tardías y crónicas aparecen en los infiltrados tisulares linfocitos T, mastocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos.

II-5.a Mastocitos y basófilos

Los mastocitos y basófilos presentan varias similitudes, aunque se diferencian en ciertos aspectos. Ambos derivan de células hematopoyéticas CD34⁺. Mientras que los basófilos completan su maduración en médula ósea y luego pasan a circulación periférica (Galli, 2000), los mastocitos completan su diferenciación en tejidos



vascularizados y no circulan en sangre. Los basófilos tienen una vida media corta, de unos días, mientras que los mastocitos tienen una vida media más larga.

Hay dos subpoblaciones de mastocitos (Kitamura, 1989):

Mastocitos de tejido conectivo: se encuentran en el tejido conectivo subendotelial, alrededor de los vasos sanguíneos pequeños y vénulas poscapilares, vasos linfáticos y nervios. Tienen una gran cantidad de receptores de IgE y de histamina almacenada en gránulos. La proliferación a partir de médula ósea no se induce por interleuquinas de linfocitos T.

Mastocitos de mucosas: se encuentran en mucosas y tejidos epiteliales, especialmente de los tractos respiratorio y gastrointestinal. Tienen una menor cantidad de receptores para IgE y menor cantidad de histamina. La proliferación en médula ósea depende de interleuquinas secretadas de linfocitos T, como IL-3, IL-5 y GM-CSF.

El mastocito es el tipo celular principal en mediar la reacción inflamatoria ante la entrada del alérgeno. Tanto el mastocito como el basófilo expresan el FcεRI en forma constitutiva (Rottem, 1992). La principal forma de activación ante la entrada del alérgeno ocurre cuando éste se une a las moléculas de IgE, produciendo el entrecruzamiento de las moléculas de IgE, e iniciando la cascada de activación. Durante la activación se inician dos procesos diferentes: la liberación de mediadores preformados contenidos en gránulos y la síntesis y liberación de nuevas sustancias (Figura D y E).

Liberación de mediadores preformados

La transducción de señales se produce a través de la activación de una tirosina quinasa que fosforila los motivos ITAM de las cadenas β y γ del FcεRI, que lleva a la activación de la proteína quinasa C. Esta separa los complejos de actina-miosina situados debajo de la membrana plasmática permitiendo que los gránulos entren en contacto con la misma.

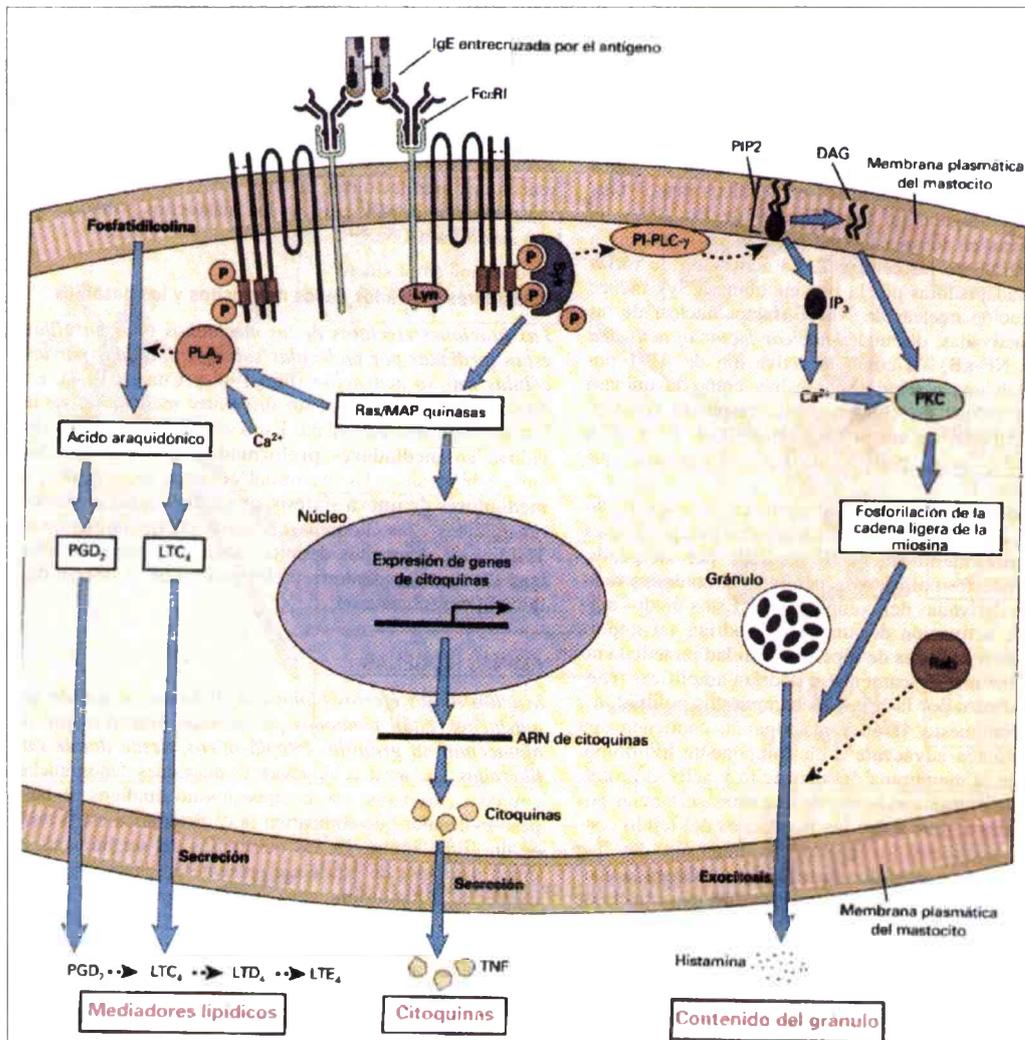


Figura D: Transducción de señales en el mastocito. (De: “Inmunología Celular y Molecular”, de Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000)

Syk y Lyn: tirosina quinasas, MAP: proteína quinasa activada por mitógenos, PI-PLC γ : fosfolipasa C γ específica de fosfatidilinositol, IP $_3$: inositol trifosfato, DAG: glicilglicerol, PIP $_2$: fosfoinositol difosfato, PKC: proteína quinasa C, PLA $_2$: fosfolipasa A $_2$, LTC $_4$: leucotrieno C $_4$, PGD $_2$: prostaglandina D $_2$, TNF: factor de necrosis tumoral.

Los gránulos preformados contienen histamina, heparina, proteoglicanos, y las enzimas quimasa, triptasa, carboxipeptidasa A y serín-esterasas (Costa, 1996). La histamina es una amina vasoactiva que produce incremento local en el flujo sanguíneo, mayor permeabilidad vascular y contracción del músculo liso de bronquios e intestino. Las funciones *in vivo* de las enzimas triptasa y quimasa no se conocen, sin embargo existen varias acciones demostradas *in vitro* que sugieren que sus efectos biológicos son importantes. La triptasa escinde el fibrinógeno y activa la colagenasa, contribuyendo a la

lesión tisular. La quimasa puede convertir la angiotensina I en II, degradar la membrana basal epidérmica y estimular la secreción de mucus. Los proteoglicanos como la heparina y el condroitínsulfato actúan como matrices de almacenamiento de las otras sustancias y controlan el ritmo de liberación tras la exocitosis de los gránulos. También se encuentra en los gránulos TNF- α preformado que causa activación endotelial, con sobreexpresión de moléculas de adhesión que genera un infiltrado en el foco inflamatorio constituido por eosinófilos, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos.

Liberación de mediadores sintetizados de novo

Se sintetizan de novo y liberan mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico, como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos y factor activador plaquetario (PAF). Esta síntesis está controlada por la fosfolipasa A2 que hidroliza los fosfolípidos de membrana para liberar sustancias que son convertidas por otras enzimas en los mediadores definitivos. Las enzimas que actúan luego son la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. A partir de la primera se produce prostaglandina D2, que actúa como vasodilatador y broncoconstrictor, induce la quimiotaxis y acumulación de neutrófilos en el foco de la inflamación. Por la vía de la lipooxigenasa se producen los leucotrienos, produciendo broncoconstricción, aumento de permeabilidad vascular y secreción de mucus. El PAF atrae leucocitos, amplifica la producción de mediadores lipídicos y activa neutrófilos, eosinófilos y plaquetas. Los mastocitos también liberan una gran cantidad de citoquinas como IL-1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 16, TNF- α , TGF- β , GM-CSF y quimoquinas; mientras que los basófilos liberan un espectro más limitado que incluye IL-4 y IL-13 (Brunner, 1993). Las interleuquinas amplifican la respuesta Th2, promueven la producción y activación de eosinófilos, favorecen la inflamación y la producción de citoquinas por varios tipos celulares. Las quimoquinas, como el MIP-1 α , atraen leucocitos.

Los mastocitos son cruciales para la reacción inmediata que se produce como consecuencia de la entrada del alérgeno (Williams, 2000). En cambio, la reacción tardía y crónica reflejan las acciones de los leucocitos reclutados en el sitio de la inflamación (Church, 1994), que aparecen allí gracias a las sustancias liberadas durante la activación de los mastocitos (Wershil, 1991).

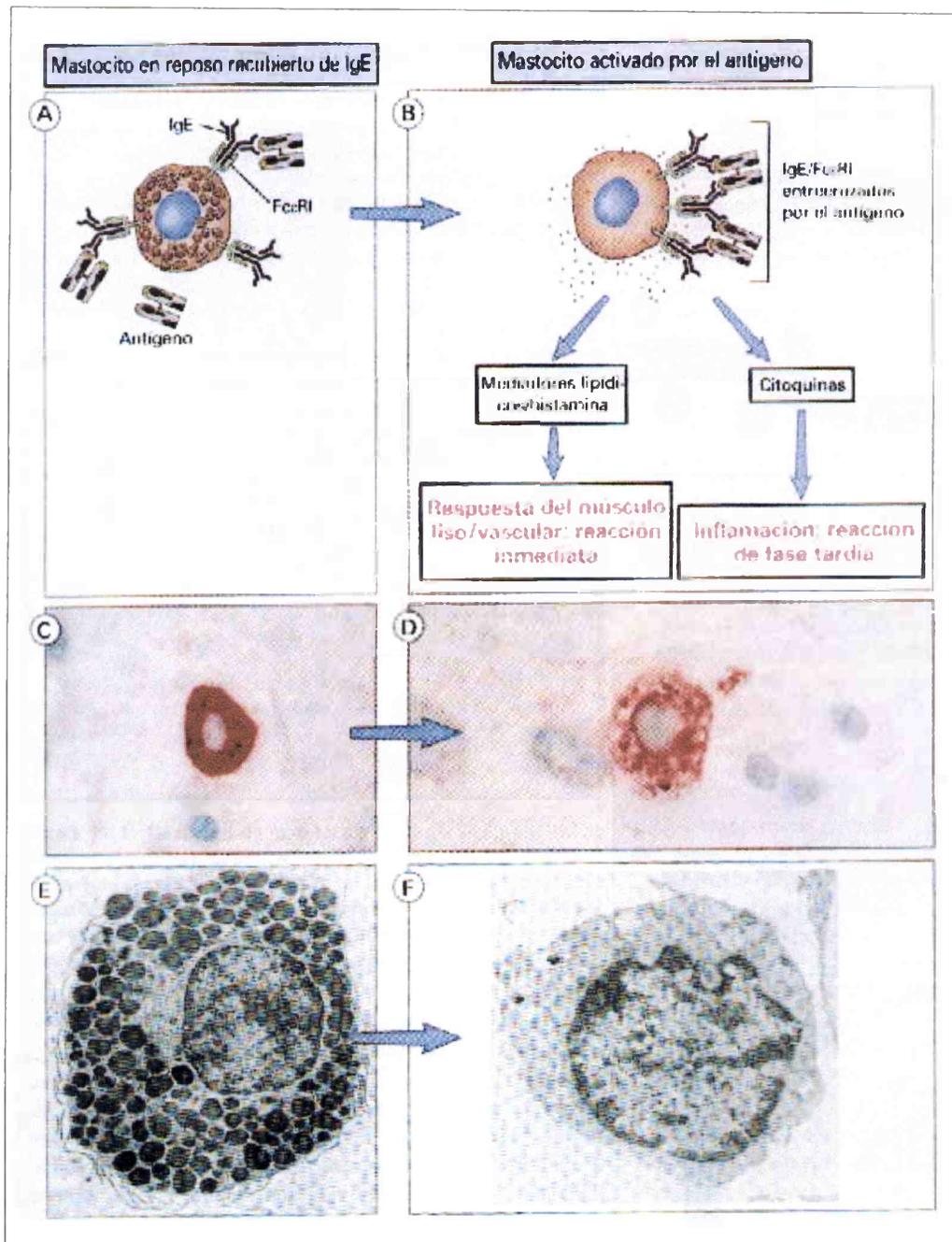


Figura E: activación del mastocito mediante el entrecruzamiento de las moléculas de IgE. A y B: esquemas. C y D: mastocito antes y después de la activación, respectivamente, observado por microscopía óptica. E y F: idem C y D, pero con microscopio electrónico. (De: "Inmunología Celular y Molecular", de Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000)

Los mastocitos y basófilos pueden activarse también en forma independiente del entrecruzamiento de los receptores de IgE, a través de diversas sustancias, como compuestos polibásicos, péptidos, citoquinas y anafilotoxinas derivadas del complemento. Estos modos adicionales de activación podrían ser importantes en las reacciones de hipersensibilidad inmediata no mediadas inmunológicamente.

II-5.b Eosinófilos

Son granulocitos derivados de médula ósea, que se encuentran tanto en circulación como en tejidos, predominantemente en tejido conectivo de sistema respiratorio, gastrointestinal y urogenital. Su característica distintiva es la presencia de gránulos en el citoplasma que contienen proteínas catiónicas. Los eosinófilos pueden destruir microorganismos vía ADCC por medio del FcγR y FcεRI. Al igual que los mastocitos la activación tiene dos fases: liberación de gránulos preformados y síntesis de mediadores lipídicos.

Las proteínas que se encuentran en los gránulos son la proteína catiónica del eosinófilo (proteasa y ribonucleasa tóxicas para los parásitos), proteína básica de membrana (daña membranas), hidrolasa, proteína neurotóxica del eosinófilo (una neurotoxina), colagenasa del eosinófilo (remodelación del tejido conectivo), peroxidasa del eosinófilo (genera radicales libres de oxígeno, produce halogenación y liberación de histamina por los mastocitos) (Gleich, 1993). Además, los eosinófilos presentan otros gránulos que contienen arilsulfatasa y otras enzimas (Weller, 1994). Todas estas sustancias tienen actividad citotóxica, de modo de favorecer la eliminación de parásitos.

Por otro lado, sintetizan moléculas derivadas del ácido araquidónico como prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas como GM-CSF, IL-3, IL-5 e IL-8. Los leucotrienos C4, D4 y E4 causan contracción del músculo liso, aumentan la permeabilidad vascular y secreción de mucus. Las citoquinas GM-CSF, IL-3, IL-5 amplifican la producción y activación de los eosinófilos, y la IL-8 promueve el influjo de leucocitos. También se observó que son capaces de actuar como células presentadoras de antígeno para estimular la función de linfocitos T CD4⁺ (Shi, 2000).

II-5.c Quimoquinas

Las quimoquinas son moléculas de importancia fundamental en el reclutamiento de leucocitos en los tejidos donde ocurre una inflamación alérgica, lo cual es característico de la reacción tardía. Las células que participan en el proceso inflamatorio son activadas por citoquinas, interactúan con el endotelio vascular y migran a través del



mismo para alcanzar el sitio inflamatorio. En la figura F se representan los pasos involucrados en el reclutamiento de células en el sitio de inflamación.

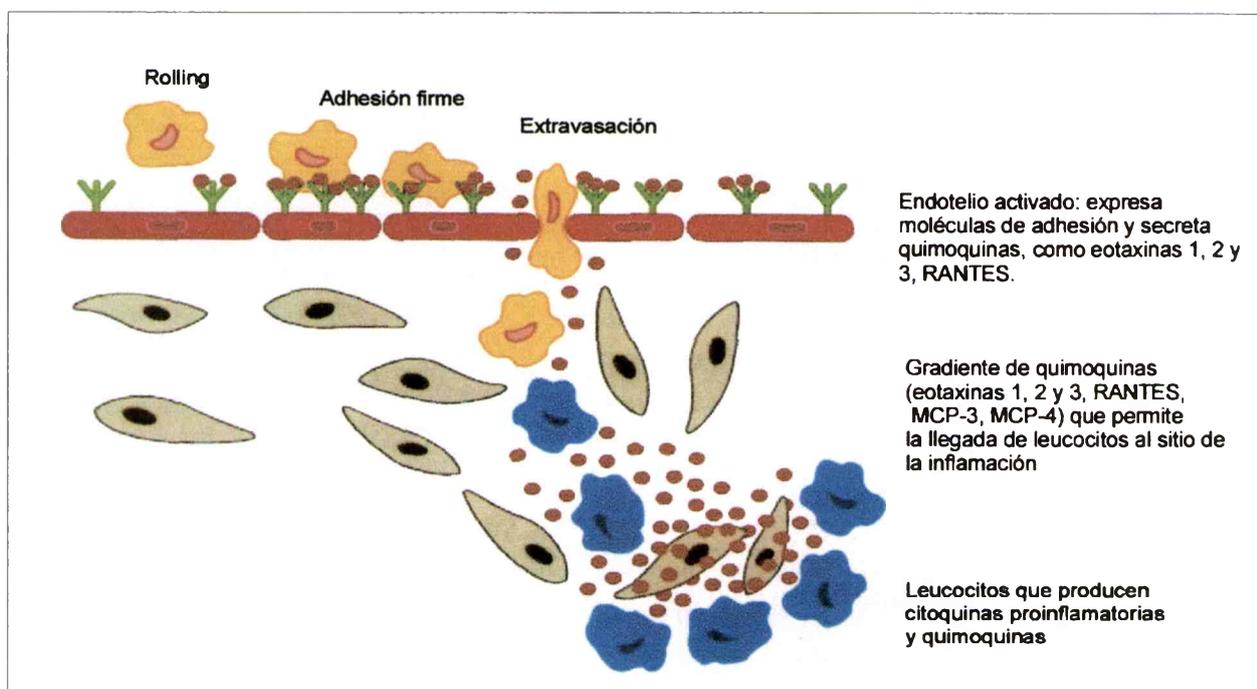


Figura F: esquema de los pasos que median el reclutamiento de células efectoras en el sitio de inflamación (Krensky. 1999)

Las quimoquinas pueden clasificarse en 4 grupos, de acuerdo a la disposición en la estructura primaria de los dos primeros residuos de cisteína. Las CXC quimoquinas, cuyos 2 primeros residuos de cisteína están separados por un único aminoácido, son quimiotácticas para neutrófilos y no tienen (o es muy débil) el efecto sobre eosinófilos y basófilos. Las C-C quimoquinas, que tienen ambos residuos adyacentes, atraen todos los leucocitos excepto neutrófilos. Una tercer familia de quimoquinas, las C-quimoquinas, que no tienen la primera de las cisteínas de la estructura primaria, incluye a la linfotactina y atrae linfocitos inactivados. El último grupo contiene a la fractalquina, que se encuentra únicamente unida a la superficie celular, y tiene 3 aminoácidos entre los 2 primeros residuos de cisteína (CXXXC). En la tabla I se muestran quimoquinas y sus receptores que son importantes en la patogenia de la inflamación alérgica.

Tabla I.- Nomenclatura sistemática y común de quimoquinas y sus receptores que intervienen en la patogenia de la inflamación alérgica.

Nombre sistemático	Nombre común	Receptor
CC-quimoquinas		
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR2, CCR3
CCL11	Eotaxina 1	CCR3
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL22	MDC	CCR4
CCL24	Eotaxina 2	CCR3
CCL26	Eotaxina 3	CCR3
CXC-quimoquinas		
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α	CXCR4

La IL-5 producida por linfocitos Th2 (Bagley, 1997) induce la producción y liberación a circulación de eosinófilos por la médula ósea, promueve su maduración y la eosinofilia en presencia de un alérgeno, pero es débil como factor quimiotáctico. Las quimoquinas, tales como las eotaxinas, son las sustancias que principalmente median la migración transendotelial y el reclutamiento en los tejidos de los eosinófilos (Broide, 2001). En la tabla II se muestra las quimoquinas involucradas en el reclutamiento de células en el foco inflamatorio, y su receptor expresado por dichas células (Siveke, 1998; Jinqun, 1999; Jinqun, 2000; Nagase, 2000). Dicho reclutamiento ocurre gracias a la formación de un gradiente de quimoquinas en el tejido desde el vaso sanguíneo hasta el sitio de inflamación. Una vez que las células alcanzan la zona de máxima concentración, dejan de moverse para ser activadas por factores locales.

Tabla II.- Quimocinas involucradas en el reclutamiento de células en una respuesta alérgica*.

Quimocina	Célula	Receptor
Eotaxinas, MCP-3, MCP-4, RANTES		CCR3
SDF-1	Eosinófilos	CXCR3
IP-10, Mig		CXCR4
Eotaxinas		CCR3
MDC	Linfocitos Th2	CCR4
I-309		CCR8
MCP-1, MCP-3, MCP-4	Basófilos	CCR2
RANTES, eotaxinas		CCR3

* En la tabla se muestran las quimocinas liberadas por el tejido inflamado, las células que resultan atraídas, y el receptor expresado en dichas células, por medio de los cuales se unen a las sustancias quimioattractantes.

Las células epiteliales liberan eotaxina después de la estimulación con TNF- α (Lilly, 1997), y los fibroblastos secretan eotaxina y RANTES en respuesta a IL-4 y TNF- α (Teran, 1999). Además, la IL-5, las eotaxinas, y otras citoquinas Th2 (IL-4, IL-13, IL-9, TNF- α) (Richard, 2000) regulan la producción local de IL-5 y eotaxina por las células epiteliales y la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) (Woltmann, 2000). Las quimocinas producidas por las células epiteliales activadas de la zona de la inflamación y las moléculas de adhesión que expresan permiten la migración o extravasación de las células que las reconocen a través del endotelio activado.

Los eosinófilos expresan las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ y PSGL-1 lo cual les permite el "rolling" y la adhesión firme a los endotelios que expresan P-selectina (Edwards, 2000) y VCAM-1 o MadCAM-1 (Sriramarao, 2000).

II-6 Respuestas efectoras

Existen 3 tipos de respuesta efectora debidas al contacto con el alergen (Charlesworth, 1997; Liu, 1991):

-reacción inmediata: comienza en segundos, y se debe a la activación inmediata de los mastocitos vía el receptor de IgE y otras células efectoras que se encuentran en el sitio de



entrada del alérgeno. Ocurre principalmente a través de la liberación de histamina, la cual produce aumento de permeabilidad vascular (por contraer las células endoteliales de vénulas poscapilares), deposición de fibrina, aumento del flujo de sangre cutánea, prurito, contracción del músculo liso de bronquios e intestino y aumento de la producción de mucus (Holgate, 1993). Una reacción inmediata puede demostrarse mediante la reacción de habón y eritema que se produce luego de la inyección intradérmica de un alérgeno. El sitio de inyección se vuelve rojo y se edematiza por la dilatación local de los vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos del margen del habón se dilatan y se llenan de eritrocitos formando un borde rojo conocido como eritema. La reacción aparece entre 5 a 10 minutos después de la inyección del alérgeno.

La reacción inmediata puede bloquearse mediante la inyección de adrenalina o de antihistamínicos.

-reacción tardía: es causada por la síntesis inducida de sustancias que median el reclutamiento de linfocitos, neutrófilos y macrófagos, los cuales contribuyen a la reaparición de algunos signos y síntomas luego de horas de la exposición al alérgeno, tales como broncoconstricción, aumento de permeabilidad vascular y secreción de mucus. Un ejemplo muy frecuente es el asma alérgico, donde más del 50% de pacientes expresan reacciones tardías. El patrón típico de reactividad bronquial es el desarrollo de una respuesta asmática aguda, a los 10 minutos de la exposición y que se resuelve a las 1-3 horas. Luego exhiben una segunda fase, la respuesta tardía, de broncoconstricción entre las 6-12 horas, que se resuelve a las 24 horas. Los signos (enrojecimiento e hinchamiento de la piel, broncoconstricción) y síntomas (estornudos, respiración sibilante y tos) característicos de este tipo de respuestas están asociados al reclutamiento de leucocitos circulantes en el sitio de las reacciones, dado que los tratamientos con corticoides que disminuyen dicho reclutamiento consiguen una reducción de la respuesta tardía (Peebles, 1997).

La reacción tardía no se bloquea con antihistamínicos, pero puede ser bloqueada con corticoides, ya que inhiben la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas.

-inflamación alérgica crónica: los tejidos afectados por reacciones alérgicas repetidas exhiben cambios estructurales crónicos y alteración en las funciones de los órganos, con

infiltrados de eosinófilos y células Th2. Se cree que estas alteraciones crónicas son consecuencias mismas de la inflamación (Hogg, 1997).

II-7 Tipos de enfermedades atópicas

Las enfermedades atópicas son variadas, y pueden comprometer varios sistemas: piel, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y hasta reacciones generalizadas o sistémicas.

Anafilaxis: reacción inmediata sistémica, que involucra múltiples órganos, y si no se trata puede producir rápidamente la muerte (Bochner, 1991). Suele implicar la presencia sistémica del antígeno introducido por inyección, picadura de insecto o absorción a través de la piel o la mucosa intestinal. El aumento brusco de la permeabilidad vascular y la disminución del tono vascular producen un descenso rápido de la presión arterial o shock, denominado shock anafiláctico. Estos efectos se acompañan también de constricción de las vías respiratorias, hipersensibilidad del intestino, producción de moco en el intestino y árbol respiratorio y urticaria.

El término anafilaxia se utiliza para las reacciones que son mediadas por IgE, sin embargo pueden haber manifestaciones similares que no son mediadas por IgE, llamadas reacciones anafilactoideas. Estas otras reacciones pueden ser producidas por complejos inmunes, activación del complemento, agentes capaces de activar mastocitos (como soluciones hiperosmolares o material de contraste radiológico).

Rinitis alérgica: también se denomina fiebre de heno, en la cual se afecta principalmente el tracto respiratorio superior. Es la forma más frecuente de enfermedad alérgica, afectando al 22% de la población de Estados Unidos. Las manifestaciones son edema de las mucosas, infiltración leucocitaria con abundantes eosinófilos, secreción de moco, congestión nasal, tos, estornudos, rinorrea y dificultad para respirar.

Asma: es un síndrome crónico de las vías aéreas que se produce por sucesivas activaciones de células proinflamatorias, principalmente eosinófilos y mastocitos. Este proceso lleva a una obstrucción de las vías aéreas intermitente y reversible, hiperrespuesta de las vías aéreas reflejada en una broncoconstricción y sensibilidad



aumentada a estímulos no específicos como el aire frío. La gravedad de los episodios asmáticos depende de la hiperreactividad de cada individuo. Afecta al 5-10 % de la población, principalmente chicos, aunque en los últimos 20 años se ha duplicado su prevalencia en países desarrollados

Los procesos asmáticos mediados por IgE son causados generalmente por aeroalergenos domiciliarios. Pero también pueden ser procesos no atópicos originados por infecciones virales (adenovirus, rinovirus, parainfluenza, etc), ejercicio físico, drogas anti-inflamatorias no esteroideas, etc.

Urticaria: inflamación y enrojecimiento localizado y transitorio (habón y eritema) de la piel producidos por los mastocitos del tejido conectivo que contienen abundante histamina. Puede ocurrir en respuesta al contacto directo con el alérgeno o después de que un alérgeno entre en la circulación a través del aparato intestinal o por inyección.

Conjuntivitis alérgica: es una respuesta inflamatoria en la mucosa ocular.

Alergia alimentaria: se produce por la liberación de mediadores de los mastocitos de la mucosa y submucosa intestinales. Las manifestaciones clínicas son aumento del peristaltismo, incremento de la secreción de líquido, vómitos y diarrea. Muchas veces se acompaña también de urticaria y angioedema.

Dermatitis atópica: Es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, que involucra la respuesta de células T contra el alérgeno.

II-8 Respuesta inmune dependiente de IgE: Defensa contra parásitos

Existe bastante evidencia experimental que sugiere que esta forma de respuesta inmune se desarrolló como defensa del huésped contra parásitos, particularmente helmintos (Bell, 1996), ya que las infecciones por estos parásitos presentan muchas características comunes a la atopía: se inducen respuestas mediadas por IgE, donde parte de la IgE es específica para antígenos derivados de esos parásitos, existen niveles aumentados de eosinófilos en circulación, los tejidos en el sitio de la infección tienen infiltrados celulares similares a los de la inflamación alérgica crónica, hay liberación de mediadores por parte de mastocitos y basófilos (que promueven la expulsión del parásito o disminuyen su viabilidad o reproducción) y los eosinófilos producen varias proteínas que pueden ser tóxicas para los helmintos (Galli, 1999).



A pesar de todas estas similitudes, aun está en discusión si la respuesta mediada por IgE es realmente esencial para la defensa contra estos parásitos. En un estudio se observó que la duración de la infección con *Strongyloides* (Nawa, 1985) de ratones deficientes en mastocitos fue mayor que en los ratones control, sin embargo los primeros lograron resolver la infección. En ratones deficientes en IgE, se observaron leves anormalidades en la respuesta contra *Schistosoma mansoni* (King, 1997). Por otro lado, en ciertas infecciones las respuestas mediadas por IgE contribuyen a la patología, como es el caso de la infección experimental con *Leishmania major*, donde se observó que los mastocitos aumentan y prolongan las lesiones (Wershil, 1994). En resumen, las respuestas inmunes asociadas a IgE inducidas por parásitos pueden proteger o dañar al huésped, y esto depende del parásito y del huésped, entre otros.

II-9 Etiología: factores genéticos y ambientales

Las enfermedades que pueden atribuirse a un único gen responsable son relativamente raras (prevalencias bajas), mientras que las enfermedades más comunes (prevalencias mayores al 1%), entre las cuales se encuentran las alergias (con prevalencias de entre 20 y 40%) (Aberg, 1995), en general son multifactoriales, o sea, están controladas por factores genéticos y ambientales. Además existen múltiples variantes (polimorfismo) de múltiples genes (poligenia) que controlan la alergia. La expresión de estos genes varía de acuerdo al entorno ambiental.

Durante las últimas 3 décadas, se observó un incremento al doble o triple en la prevalencia de alergias, como asma bronquial, rinitis alérgica y dermatitis atópica (Working Group Sardinia, 1993). Tanto factores genéticos como ambientales contribuyen a la iniciación y mantenimiento de la enfermedad alérgica. Dado que la proporción de mutaciones naturales es baja, el cambio en las condiciones ambientales, de estilo de vida y principalmente el mejor control de enfermedades infecciosas durante la niñez se cree que son los responsables del aumento de la incidencia de alergia. En la actualidad, alrededor de un 40% de individuos en países industrializados muestran una tendencia a la producción anormal o aumentada de IgE.

II-9.a Factores genéticos

Pacientes con una historia familiar de alergia tienen un riesgo 2-3 veces mayor de ser alérgicos que un paciente sin historia familiar de esta enfermedad (Kjellman, 1977). A partir de estos estudios en familias atópicas, surge el primer reporte de marcadores polimórficos en el DNA asociados con atopía, en el cromosoma 11q (Cookson, 1989). A partir de ese momento, surgen más de 22 loci predisponentes a atopía, en distintos cromosomas, por ejemplo en 5q (Marsh, 1994; Rosenwasser, 1995). Los más importantes son:

Cromosoma 11q13: Cookson propuso que el gen candidato en este cromosoma era el de la subunidad β de Fc ϵ RI dado que se encontraron ligamientos entre este gen y varios fenotipos asociados con alergia, como ser asma (Daniels, 1996), IgE total y específica (Palmer, 1998), dermatitis atópica (Folster-Holst, 1998).

Cromosoma 5q31-33: es la zona para la cual la evidencia de ligamiento con atopía es más fuerte, y ha sido replicado por muchos grupos (Martinez, 1998; Ober, 1998). Esta región contiene un cluster de genes formado por los de IL-3, 4, 5, 9, 13, GM-CSF, receptor de glucocorticoides I (GRL1) y receptor β 2-adrenérgico. En un estudio se encontró que la mayor asociación entre IgE total y dicho cluster correspondía al gen de IL-4 (Marsh, 1994). Hay evidencia de un polimorfismo en el promotor de IL-4 que se asocia en forma débil con IgE específica para *Deratohagoides pteronyssimus* (Walley, 1996). El receptor β 2-adrenérgico es el blanco de acción de los agonistas β 2, que son utilizados para tratar la broncoconstricción en el asma. Se encontró una mutación en este gen que era más frecuente en asmáticos esteroide-dependientes (Turki, 1995). En pacientes homocigotas, esta mutación producía una mayor desregulación del receptor mediada por los agonistas β 2 (Green, 1994).

Cromosoma 12q: la región de interés es 12q15-24.1 (Barnes, 1999). En esta zona se encuentra, entre otros, el gen de IFN- γ , cuyos efectos se contraponen a los de IL-4.

Cromosoma 6p21: los primeros estudios estuvieron dirigidos a asociación con HLA-DP, DQ y DR (Young, 1994a; Hizawa, 1998), los cuales están relacionados con respuestas a alérgenos específicos, haciendo que ciertos complejos péptido-MHC favorezcan respuestas Th2.

Cromosoma 16: En este cromosoma se encuentra el gen que codifica para el receptor de IL-4. Se ha informado una asociación entre atopía y una mutación en la cola citoplasmática de la cadena α de dicho receptor, la cual produce una activación del mismo (Hershey, 1997) en un grupo pequeño de pacientes. Se ha detectado otra mutación, en la parte extracelular de la cadena α del receptor, que también activa al receptor (Mitsuyasu, 1998). Sin embargo existe otro reporte que descarta a las mutaciones de este gen como predisponentes a atopía (Haagerup, 2001).

En cuanto a respuestas a antígenos específicos, también se encontró asociación con la cadena α (Moffatt, 1994) y β (Noguchi, 1998) del TCR, que se encuentran en los cromosomas 14q11 y 7q35, respectivamente.

II-9.b Factores ambientales

Blackley realizó la primer asociación entre alergia y estilo de vida, dado que notó que esta enfermedad afectaba a personas de mayor nivel socioeconómico, y predijo que con el avance de la educación y civilización, se produciría un aumento de la enfermedad. Y eso fue lo que sucedió, especialmente luego de 1960. Se hace referencia al incremento de las enfermedades alérgicas debido a la occidentalización del estilo de vida. Estas son mayores en personas de mayor nivel económico y de Occidente (von Mutius, 1994; Williams, 1994). Los estudios epidemiológicos realizados en Suiza, Austria, Finlandia y Alemania comparando áreas urbanas y rurales, muestran que las alergias son más prevalentes en la ciudad (Gassner-Bachmann, 2000; Riedler, 2000; Bibi, 2002).

Entre los factores ambientales predisponentes a alergia se incluyen cambios en los niveles de alérgenos (debidos al uso de sistemas de calefacción, alfombras, muebles), en la polución ambiental, cambios dietarios y disminución de infecciones (hipótesis de higiene).

Se ha propuesto como explicación al aumento de prevalencia la pérdida de algún factor protector en el medio ambiente, como ser varios tipos de bacterias, que pueden desplazar el balance de citoquinas. De hecho, individuos de zonas rurales expuestos durante la infancia a un ambiente con alto contenido de bacterias, esporos de hongos u otro material particulado tienen menor prevalencia de atopía (Kilpelainen, 2000).



La hipótesis de higiene (Erb, 1999) establece que la reducción de enfermedades como resultado de la vacunación, la prescripción de antibióticos junto al desarrollo de nuevos antibióticos y la higiene en países industrializados ha contribuido a la mayor incidencia de atopía. Está demostrado que niños que tienen un gran número de hermanos tienen menor tendencia a alergia, dado que están expuestos a un mayor número de infecciones (Strachan, 1997). Con respecto a las infecciones virales, que son marcadores de falta de higiene y las más frecuentes durante la infancia, en general tienen efecto protector para el desarrollo de alergia (Shaheen, 1996), salvo algunas excepciones como la del virus sincicial respiratorio (Sigurs, 1995). Si las infecciones disminuyen el riesgo de alergia, entonces, el aumento de vacunaciones produciría el efecto contrapuesto. Esto fue mostrado en el estudio con las vacunas contra el sarampión, paperas y rubeola (Alm, 1999), pero con BCG los resultados son contradictorios. El aumento de la prescripción de antibióticos también aumentaría el riesgo de alergia (Wickens, 1999).

Flora del tracto gastrointestinal

La alteración de la flora intestinal en los últimos años debida al cambio dietario y al uso de antibióticos ha producido un cambio en la respuesta inmune. El conjunto de bacterias que colonizan al neonato puede tener influencia en el posterior desarrollo de alergia. Una colonización tardía por bacterias Gram-negativas lleva a menores niveles de LPS, produciendo un anormal desarrollo de la tolerancia oral. Hay resultados que indican que la microflora es diferente entre chicos alérgicos y no-alérgicos (Bjorkstén, 1999).

Polución ambiental

Es una creencia común, y remarcada por grupos de preservación del medio ambiente, que el incremento de alergia se debe a la mayor polución del aire por los automotores e industrias. Pero aun existe una gran controversia en este sentido, debido en parte al tipo de sustancia contaminante que se considere. En el estudio de alergia en infancia (ISAAC, 1998), se encontró que la polución del aire no tiene conexión con el aumento de prevalencia de alergia. Además, países como Nueva Zelanda, tienen el aire limpio y la prevalencia de alergia es muy alta. Se demostró que la polución del aire



clásica, como por ejemplo SO_2 , no estaba asociada a atopía, mientras que la polución debida a gases de automóviles podría estar relacionada con los aumentos de prevalencia de alergia (Behrendt, 1995). El incremento de alergias estuvo en paralelo con el aumento del uso de las naftas. La exposición a los gases que emanan de automóviles estimula la formación de IgE (Peterson, 1996) y la producción de citoquinas tipo II (Díaz-Sánchez, 1996)

Humo de tabaco

Niños expuestos al humo de tabaco tienen eosinofilia, y aumento de IL-4 e IgE (Kabesch, 2000). La exposición al humo durante el embarazo es un factor de riesgo de desarrollo de alergia en los chicos (Halken, 1995). Sin embargo, no parece probable que el humo sea el factor causante del aumento de prevalencia de alergia, dado que la proporción de uso de tabaco en diferentes grupos socioeconómicos o regiones geográficas no va acompañada de la misma forma en cuanto a la prevalencia de alergia.

Nuevos alérgenos

La utilización de nuevos compuestos químicos (nuevos alimentos, nuevos antibióticos) podría eventualmente causar aumento de alergia, sin embargo la mayoría de las alergias son causadas por sustancias naturales conocidas. Sólo en pocos casos se han observado aumentos de la prevalencia por la introducción de nuevos alérgenos, como ser el árbol *Prosopis juliflora* en Kuwait (Ellul-Milcaleff, 1984).

Hormonas y stress

Se ha propuesto que el aumento de stress en la comunidad es factor predisponente a alergia, y sería mediado por glucocorticoides, que estimulan la producción de citoquinas tipo II (Ramírez, 1996). También las hormonas sexuales, como estrógenos y progesterona favorecen la inmunidad tipo Th2 (Piccinni, 1995). Pero aun no existen datos epidemiológicos que indiquen que uno de estos factores sea responsable del aumento.

Consumo de ácidos grasos

Existe un cambio en la dieta, hacia un mayor consumo de ácidos grasos omega-6 con respecto a omega-3, lo cual aumenta la actividad de PGE₂, y éste la inmunidad Th2. Por otra parte, la leche materna de madres atópicas tiene omega-6 aumentado (Yu, 1998), además de un aumento de citoquinas tipo II (Bottcher, 2000). Esto podría explicar las discrepancias observadas sobre los efectos protectores de alergia de la leche materna.

Aspirina

La aspirina se ha dejado de usar en niños a partir de 1980, y se sugirió que podría ser la causa del aumento de alergia (Varner, 1998). La aspirina disminuye la producción de PGE₂, sin embargo aun no hay evidencia epidemiológica suficiente a favor de esta hipótesis.

II-10 Tratamiento

El tratamiento más efectivo consiste en eliminar la exposición al alérgeno en cuestión. Sin embargo esto no siempre es posible, por ejemplo cuando el alérgeno es un polen. Para estos casos, se dispone de tratamientos medicamentosos, que corrigen la reacción inflamatoria pero no consiguen cambiar el tipo de respuesta inmune que la genera.

La adrenalina es la primera droga de elección ante una reacción anafiláctica, ya que relaja el músculo liso de los bronquios y contrarresta la alta permeabilidad vascular (Bai, 1997). También actúa inhibiendo la transducción de señales en los mastocitos.

Los β₂-agonistas son utilizados por su efecto broncodilatador, para contrarrestar un ataque de asma. Eliminan o previenen respuestas inmediatas, pero no tienen efecto sobre las reacciones tardías.

Otra droga para tratar las alergias son los antihistamínicos (Du Buske, 1996), que bloquean la unión de la histamina a sus receptores H1 de las células blanco como las células endoteliales vasculares y células musculares lisas vasculares, gastrointestinales y respiratorias. Son utilizados para eliminar los síntomas de las reacciones inmediatas.



El cromoglicato de sodio estabiliza al mastocito, previniendo la liberación de mediadores por parte de dichas células. Se utiliza como medicación preventiva de ataques de asma cuando es difícil evitar la exposición al alérgeno. También se utiliza como tratamiento de conjuntivitis alérgica y rinitis.

Los glucocorticoides inhiben la transcripción y traducción de los genes que median la producción de citoquinas y mediadores lipídicos en linfocitos T, mastocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos y macrófagos (Almawi, 1998). Inhiben la migración de células inflamatorias desde los vasos sanguíneos a los tejidos dado que reducen la expresión de moléculas de adhesión (Mori, 1997) y sus ligandos, corrigiendo las reacciones tardías y crónicas. Son útiles en el tratamiento del asma y otras enfermedades alérgicas asociadas con inflamación alérgica crónica, como dermatitis atópica y rinitis alérgica (Barnes, 1997). En la actualidad se utilizan esteroides inhalados, ya que producen menores efectos colaterales que los sistémicos.

La inmunoterapia o hiposensibilización altera el tipo de respuesta inmune. Se realizan sucesivas introducciones del alérgeno a los individuos alérgicos, las cuales pueden realizarse por distintas vías (sublingual, intradérmica, endovenosa). Se comienza con pequeñas dosis de alérgeno y con el tiempo se van aumentando gradualmente hasta llegar a dosis de mantenimiento. Requiere una manipulación óptima de las dosis y tiempos de administración del alérgeno y su aplicación se debe realizar bajo condiciones de seguridad para la salud del paciente. Al principio se produce un aumento de IgE, seguido por una disminución de IgE e incremento de IgG. La efectividad clínica es alta en pacientes alérgicos a venenos de insectos. La explicación es que la IgG bloquea el antígeno e impide que se una a la IgE.

La inmunoterapia también se ha intentado utilizar para el tratamiento de alergia alimentaria, como la anafilaxia por maní (Nelson, 1997). Este tratamiento se realiza inoculando extractos alérgicos poco caracterizados que pueden causar reacciones anafilácticas severas. Por ello, no se puede alcanzar la dosis lo suficientemente alta para lograr un resultado óptimo, y una alta proporción de pacientes desarrollan reacciones adversas. Una nueva estrategia para inmunoterapia en el futuro consiste en la producción de alérgenos que contengan epitopes reconocidos por las células T que induzcan tolerancia y que no sean reconocidos por la IgE (Shin, 1998).

Un tratamiento más reciente consiste en la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-IgE, llamado Omalizumab, que es un anticuerpo humanizado IgG₁ específico que se une a IgE libre por el sitio de unión a FcεRI, ubicado en el dominio C3 de la molécula de IgE. Esto impide la unión de la IgE a las células efectoras portadoras del receptor de alta afinidad (Shields, 1995). El sitio de unión para el receptor de baja afinidad, CD23, está cercano al de alta, y por ello se cree que también impediría la unión a este receptor. Al suministrar Omalizumab subcutáneamente se logra una disminución del 90% de la IgE sérica a las 24 horas. Durante la terapia continuada, al disminuir la concentración de IgE sérica, se reduce la expresión de FcεRI en las células efectoras, y así la respuesta de éstas a un estímulo alérgico (MacGlashan, 1997). Este anticuerpo no puede producir el entrecruzamiento de las IgE presentes en la superficie de las células efectoras (Shields, 1995), por lo tanto no puede producir activación de estas células, o sea, no habría riesgo de reacción anafiláctica. Forma complejos pequeños, solubles y no fijan complemento (Fox, 1996), con lo cual no produce complicaciones por precipitación o deposición de complejos inmunes. Los pacientes tratados con Omalizumab, comparados con tratamiento con placebo, reducen (pero no pueden eliminar) el uso de glucocorticoides inhalados y tuvieron menos exacerbaciones del asma (Soler, 2001). Este tratamiento aun está en fase experimental.

III- Alergenos

III-1 Características generales

Los alergenos son sustancias comunes y abundantes del medio ambiente. La mayoría de las alergias están causadas por un número limitado de alergenos. Aún no se conoce exactamente qué convierte a un antígeno en un alergeno, pero hay ciertas características que son comunes entre todos los alergenos:

- son proteínas (o glicoproteínas) pequeñas, solubles en agua, que son transportadas en partículas desecadas, como pólenes. Algunos son haptenos que se unen a proteínas.
- en contacto con la mucosa, el alergeno eluye de la partícula y difunde hacia el interior de la mucosa.

-son presentados al sistema inmune en pequeñas dosis. La presentación de un antígeno a baja dosis y a través de una mucosa favorece la inducción de respuestas tipo Th2 con producción de IgE.

-algunos tienen actividad enzimática. Se ha observado que muchos alergenos son enzimas. Por ejemplo, uno de los alergenos del ácaro *Dermatophagoides pteronyssimus* (alergeno principal en Argentina), el Der p1, es una cisteín-proteasa de la familia de la papaína (Schulz, 1998). Se propusieron dos teorías para explicar esta observación. La primera se relaciona con que la IgE es importante en la respuesta contra parásitos, y éstos, invaden al huésped liberando enzimas que destruyen el tejido conectivo, y se ha propuesto que esas enzimas favorecen las respuestas Th2. La segunda teoría indica que las enzimas en sí mismas serían capaces de iniciar respuestas Th2, induciendo directamente la producción de IL-4 o IL-13 por mastocitos, basófilos o células T.

Los alergenos se nombran de acuerdo a las reglas publicadas en 1994 por la World Health Organization/ International Union of Immunological Sciences Allergen Nomenclature Sub-committee (King, 1995). El nombre lleva las 3 primeras letras del género, la primera o las 2 primeras letras de la especie y un número arábigo. Por ejemplo, el primer alergeno encontrado del *Dermatophagoides pteronyssimus* se denomina Der p1.

III-2 Clasificación de alergenos

Los alergenos pueden clasificarse en:

-aeroalergenos: se encuentran en el aire, y pueden dividirse a su vez en:

-alergenos domésticos: son perennes. Uno de los alergenos domésticos más comunes es el llamado polvo de habitación, que luego se descubrió que contiene principalmente al ácaro *Dermatophagoides pteronyssimus*. El primer alergeno conocido de este ácaro se llamó Der p1, que resultó ser de la materia fecal. Otros ejemplos son: cucarachas, piel de mascotas (perro, gato), hongos (*Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Alternaria*)

-estacionales o pólenes, que son las gametas masculinas de las plantas. Los pólenes causantes de alergias son aquellos de plantas anemófilas. La polinización de este



tipo de plantas, al ser distribuidos por el viento es al azar, y por ello, dichas plantas producen grandes cantidades de pólen. Los pólenes pueden ser de:

- árboles: plátano, ácer, fresno
- gramíneas: Lolium, Bromus, Fleum, Cynodon
- malezas: Ambrosia

-ingestantes: producen las alergias alimentarias. Los alergenos alimentarios más comunes son: leche de vaca, huevo, pescado, trigo, soja y maní.

-inyectables

-por picaduras de insectos. En el caso de abeja, avispa y hormiga es por inyección del veneno, que posee en los 3 casos una composición similar: fosfolipasas, hialuronidasas y compuestos neurotóxicos. En el caso del mosquito y jején, se debe a la inyección de saliva, y los alergenos son proteínas de la saliva.

-por drogas como penicilina, amoxicilina, cefalosporina, sulfa-metoxazol, aspirina, que pueden ingresar al organismo en forma oral o inyectable. Actúan como haptenos.

-Ocupacionales: son los alergenos que están presente en el lugar de trabajo. Como ejemplo, alergia al látex, trigo, papaína, amilasa, etc.

-por piel: otra vía de entrada posible de alergenos parecería ser la piel (Saloga, 1994). En ratones, se ha demostrado con diferentes alergenos, que se producía la sensibilización y/o inducción y continuación de la reacción alérgica a partir de la piel.

IV- Alergia alimentaria

IV-1 Generalidades

Las primeras descripciones de reacciones adversas a alimentos provienen de Hipócrates, hace más de 2000 años, pero la comunidad médica no demostró interés por su conocimiento e investigación, hasta mucho tiempo después. Descripciones correspondientes a reacciones adversas a leche de vaca ya se observan desde el primer y

segundo siglo, mientras que las primeras reacciones anafilácticas producidas por la ingesta de huevo y pescado fueron observadas en los siglos 16 y 17, respectivamente.

Las reacciones adversas a alimentos pueden estar causados por muchos mecanismos y pueden involucrar a agentes externos al alimento, aditivos, componentes moleculares del alimento o factores inherentes al individuo (psíquicos, infecciones). Las reacciones pueden ser tóxicas o no tóxicas. Mientras que las primeras tienen efecto sobre todos los individuos, las últimas afectan sólo a individuos susceptibles. Las reacciones no tóxicas, comprenden las intolerancias, cuyos mecanismos son no inmunológicos (ej. intolerancia a la lactosa por déficit intestinal de β -galactosidasa, alteraciones anatómicas) y las alergias, aquellas que son mediadas por el sistema inmune. La mayoría de las reacciones adversas a alimentos son intolerancias.

Las reacciones alérgicas pueden estar causadas por cualquiera de los 4 mecanismos de reacciones de hipersensibilidad. La mayoría (60%) de las alergias alimentarias son mediadas por IgE presentándose principalmente en niños a partir de las primeras ingestas de alimentos. La prevalencia de alergia alimentaria es diferente entre la población infantil y adulta, siendo mayor en la primera (alrededor del 8%) que en la última (2%) (Young, 1994b, Jansen, 1994, Sampson, 1999; Schafer, 2001). La mayoría de los niños, en unos pocos años, generan tolerancia al alimento alergénico, excepto en casos de alergia a maní, nueces y pescado.

El espectro de alimentos alergénicos depende de los hábitos dietarios de la región, siendo los más comunes: huevo, leche de vaca, maní, nueces, soja, trigo, pescado y mariscos. También es diferente el tipo de alimentos causales entre adultos y chicos. En los primeros los alérgenos más comunes son: nueces, maní, soja, frutas, vegetales, pescados y mariscos, mientras que en los chicos, la leche de vaca, el huevo, el maní, la soja y el trigo son los más frecuentes (Schafer, 2001). Un alimento que la gente cree como causal de alergia es el chocolate, sin embargo los agentes alergénicos reales son otros ingredientes agregados como la leche, huevo o maní.

Los síntomas de alergia alimentaria más comunes son orales (42,9%), cutáneos (28,7%), gastrointestinales (13%), sistémicos (3,2%) y múltiples (12,2%). En un 35% de los niños con dermatitis atópica, los síntomas cutáneos se deben a hipersensibilidad a alimentos (Burks, 1998; Eigenmann, 1998). También es una de las causas frecuentes de



muerres por anafilaxis, tanto en niños como en adultos (Yunginger, 1992; Sampson, 1992). La cantidad de anafilaxis por alérgenos alimentarios está en aumento.

Muchos alérgenos alimentarios tienen similitud de secuencia primaria con pólenes (ej. polen de abedul y manzana), lo cual produce el llamado síndrome de alergia oral (Jeep, 2001). El síndrome involucra la orofaringe, y los síntomas son prurito y angioedema en labios, lengua, paladar y faringe.

No existe ninguna terapia específica para las alergias alimentarias. El único tratamiento efectivo es eliminar el alimento alérgico de la dieta. Por esta razón, establecer fehacientemente cuál es el alimento alérgico es de importancia fundamental para el paciente y para su profilaxis. La educación del paciente y sus padres es relevante, de modo de indicarle todos aquellos alimentos en los que se puede encontrar el alérgeno y los distintos nombres utilizados en el etiquetado. Realizar una cuidadosa lectura de la etiqueta del alimento a ingerir es vital, así como instar a las industrias a declarar todos los ingredientes. Otra fuente de peligro consiste en la existencia de alérgenos ocultos, que aparecen por el uso de los mismos utensilios o maquinarias para procesar alimentos de distinto origen.

Hay sustancias presentes en los alimentos que pueden producir reacciones similares a una alergia alimentaria. Una de ellas es la histamina, que se encuentra en altos niveles en quesos, vino y ciertos pescados. El glutamato monosódico (MSG) es un aditivo, que produce rubor, sensación de calor, dolor de cabeza, presión facial, dolor de pecho cuando se ingiere en altas cantidades (conocido con el nombre de síndrome de restaurant chino). Los sulfitos que se utilizan como antimicrobianos producen un fuerte broncoespasmo en personas asmáticas. La prevalencia de reacciones por aditivos es del 1%.

IV-2 Alimentos transgénicos

El uso de la biotecnología para la introducción de alguna mejora en los alimentos, generando alimentos transgénicos presenta un nuevo desafío en el campo de la alergia alimentaria. La transferencia de genes de microorganismos, plantas o animales en alimentos podría originar la aparición de nuevos agentes alérgicos. Las compañías



biotecnológicas podrían estar introduciendo proteínas alergénicas desde el organismo donador hacia un alimento.

La Food and Drug Administration (FDA) estableció una reglamentación en este campo, que obliga a realizar tests de seguridad de los alimentos transgénicos y etiquetar aquellos alimentos que tengan genes transferidos de los 8-10 alimentos más comúnmente alergénicos (FDA, 1992). Sin embargo esta regulación no contempla y no protege al consumidor de alergenitos transgénicos menos conocidos. El mayor reto consistirá en analizar el potencial alergénico de proteínas de fuentes que previamente no se conociera que fueran alergénicas. Se debe analizar la proteína en su estado inicial (en el alimento "dador") y en el alimento transgénico. Para esto es necesario expandir la investigación básica y clínica en alergia alimentaria. De esta manera se tendrá una mayor cantidad de muestras de suero de pacientes con diferentes alergias alimentarias, de modo de poder testear los nuevos alimentos transgénicos antes de su introducción en el mercado.

La evidencia sugiere que la vasta mayoría de las proteínas recombinantes serán seguras y no hay evidencia de que éstas sean más alergénicas que las proteínas tradicionales.

IV-3 Tolerancia oral

El término tolerancia oral, descrito por primera vez en 1911 (Wells, 1911), se refiere a un estado de no respuesta sistémica ante un dado antígeno que fue introducido previamente por vía oral. La importancia fisiológica de este fenómeno sería la prevención de las respuestas inmunitarias a los antígenos alimentarios y a las bacterias que residen en condiciones normales como comensales en la luz intestinal y que son necesarias para la digestión y absorción.

En ratones se ha demostrado la existencia de tolerancia oral, tanto para la inmunidad celular como la humoral (Hanson, 1977), y se ha observado que se induce un grupo de células T que secretan TGF- β (Miller, 1991). En un principio se creyó que esos linfocitos T eran CD8⁺, pero estudios más recientes indican que son CD4⁺ (Chen, 1995). En humanos también se ha observado la existencia de este tipo de respuesta (Husby, 1994).

Los mecanismos por los cuales se produce la tolerancia oral son delección, anergia clonal y supresión. El mecanismo de delección clonal es un fenómeno más raro, y ocurriría ante altas dosis de antígeno en el contexto de linfocitos T de alta afinidad (Van Parijs, 1996). Bajo condiciones fisiológicas de administración de antígeno puede inducirse anergia (Melamed, 1993), un estado de inactivación completa de los linfocitos T específicos del antígeno, o la producción de células que inhiben la activación de otras células T y mantienen el estado de supresión activa. Este grupo de células se denomina T regulatorias o Treg, y son CD4⁺CD25⁺ (Takahashi, 1998). Bajo el nombre de Treg se agrupan varios tipos celulares con actividad inhibitoria: Th3 (Chen, 1994), Tr1 (Groux, 1996) y células anérgicas (Lombardi, 1994), sin embargo la relación precisa entre ellas aun no ha sido establecida.

Algunos estudios sugieren que linfocitos T que expresan el TCR $\gamma\delta$ tienen un rol importante en la tolerancia (McMenamin, 1991).

Se propuso anteriormente que la inducción de tolerancia refleja una activación preferencial de respuestas Th2 sobre las Th1. Pero se demostró que la citoquina necesaria para la generación de células Tr1 es la IL-10 (O'Garra, 1998), y no la IL-4, con lo cual, el tipo de respuesta no es Th2. Además durante la tolerancia se suprime la producción de IgE (McMenamin, 1995) y se pudo inducir tolerancia en ratones knock-out para IL-4 (Garside, 1995).

La forma en que el organismo diferencia un microorganismo patógeno, contra el cual debe montar una respuesta vía Th1, de un antígeno inccuo y producir Tr1, está en el balance entre TGF- β e IL-12 en el intestino (Strober, 1997). Los patógenos iniciarán la producción de IL-12 y otras citoquinas proinflamatorias por macrófagos y células dendríticas, mientras que aquellos antígenos que no median una respuesta inflamatoria inducen la producción de células secretoras de TGF- β . El organismo detecta la presencia de prácticamente todos los patógenos que pueden infectarlo a través de los receptores tipo Toll (TLRs) (Poltorak, 1998). Estos receptores tienen la capacidad de reconocer un espectro de moléculas derivadas de diferentes patógenos, como lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, lipopéptidos, DNA bacteriano que contiene dinucleótidos CpG no metilados, flagelina, RNA de doble cadena (Takeuchi, 1999; Hemmi, 2000, Hayashi, 2001; Alexopolou, 2001).



Las células regulatorias además de regular las respuestas en el intestino, pueden modular respuestas inmunes sistémicas. La inmunosupresión producida por las células Tr1 es antígeno-dependiente. Sin embargo la función efectora de las células Tr1 no es antígeno-específica. Este fenómeno se denomina “antigen-driven bystander suppression”. Esto significa que las células Tr1 antígeno-específicas podrían migrar al órgano blanco e inhibir respuestas no sólo contra su antígeno específico sino también contra otros antígenos presentes en su microambiente. Este fenómeno puede aprovecharse para inducir oralmente tolerancia en el tratamiento de alergias o autoinmunidad. Para esto, se debería inducir tolerancia en un individuo ya sensibilizado. Esta propiedad ha sido demostrada (Staines, 1995), sin embargo tiene varias dificultades relacionadas a la cantidad de antígeno a administrar y la vía de administración.

IV-4 Diagnóstico

Para la alergia alimentaria es esencial realizar el diagnóstico diferencial de otras reacciones adversas a alimentos. El diagnóstico comienza con la historia clínica y examen físico. El objetivo es determinar una correlación entre la sintomatología observada, la exposición al alérgeno y la participación del sistema inmunológico.

IV-4.a Historia clínica

La historia clínica debe incluir la historia familiar de atopía, antecedentes personales de atopía, presencia de enfermedades con características de atopía, momento y lugar de aparición de síntomas. Se basa entonces en la descripción de eventos por parte del paciente o de sus padres, los cuales deben considerarse subjetivos. Sólo el 40% de las sospechas de alergia alimentaria pueden verificarse por la prueba confirmatoria (Sampson, 1988a). Se debe establecer el alimento sospechado y la cantidad ingerida, el tiempo entre la ingestión y aparición de síntomas, si la ingestión de ese alimento en otras ocasiones produjo reacciones similares. Cuando existe sospecha de alergia alimentaria, se debe intentar identificar el alérgeno alimentario en cuestión.



IV-4.b Identificación del alergeno alimentario

Una vez que se tenga la sospecha de el/los alimentos responsables del desorden alimentario, se inicia una dieta de eliminación. Esta se realiza durante 2 a 6 semanas, para observar la desaparición de los síntomas. El tiempo depende de los síntomas, si son gastrointestinales mejora en 1-2 días, pero un eccema atópico requiere entre 1-2 semanas. Luego se hace el desafío con el alergeno sospechado, y por último el mantenimiento de la dieta de exclusión. En el período de la dieta de eliminación, al ser corto, no se requiere prestar gran atención a los suplementos dietarios necesarios, pero sí, en la dieta de mantenimiento. La dieta inicial puede ser:

-exclusión simple: cuando las reacciones son inmediatas y se detecta fácilmente al alergeno, se elimina solamente el alimento que se sospecha.

-Empírico: se eliminan los alergenos alimentarios más comunes, que son, en orden de importancia: huevo, maní, leche, soja, nueces, crustáceos, pescado y trigo. También chocolate y aditivos, pero dan reacciones tardías. La dieta más común consiste en evitar leches de vaca, oveja y cabra, huevo, cereales (excepto arroz), cítricos, chocolate y aditivos.

-Pocos alimentos permitidos: se le da una dieta con los únicos alimentos permitidos, por ej. cordero, arroz, zanahoria, pera, durazno, azúcar, té, margarina, fórmula a base de soja o hidrolizado de leche.

-Fórmula hipoalergénica: se utiliza en individuos que no responden a las anteriores. Son los hidrolizados de leche, fórmulas a base de aminoácidos, hidrolizados de carne de vaca y soja.

Si la dieta fue llevada a cabo correctamente por el paciente y no hubieron otras condiciones que pudieran agravar el cuadro alérgico, la persistencia de los signos clínicos excluye a los alimentos eliminados de dicha dieta como causales de la patología (Kelly, 1995). Sin embargo en ciertos casos la dieta es tan pobre en diferentes alergenos que no es posible identificar definitivamente al alergeno responsable. Por ello, si los síntomas se resuelven, se debe continuar con el diagnóstico definitivo.

IV-4.c Análisis *in vivo*

Los análisis *in vivo* permiten determinar si el mecanismo es inmunológico o no, evaluar la función de distintos órganos e identificar al alérgeno. Una de las metodologías utilizadas consiste en la realización de pruebas cutáneas, ya que en la piel se encuentran los elementos necesarios para desencadenar la respuesta alérgica.

Pruebas cutáneas

-Prick test

La prueba se realiza colocando una gota de una solución glicerinada del extracto alérgico, y pellizcando la piel con una lanceta, sin que sangre. Como control positivo se coloca otra gota con solución de histamina y como control negativo solución fisiológica. Se deja unos 15 minutos, y luego se mide el tamaño del habón y eritema. El resultado se considera positivo cuando el tamaño del habón y/o el eritema es por lo menos la mitad del de la histamina y mayor que el del control negativo.

Un resultado positivo en prick test indica una posible asociación con alergia a ese alimento, sin embargo el valor predictivo positivo es sólo del 50%. En cambio, el valor predictivo negativo es mayor al 95% (Norgaard, 1992), con lo cual un resultado negativo, prácticamente excluye una alergia alimentaria.

La principal ventaja de este método reside en que indica la presencia de IgE específica para el alérgeno a analizar en la superficie de los mastocitos presentes en la piel. También, son pruebas rápidas, se pueden analizar varios alérgenos al mismo tiempo y en general no son costosas.

Sin embargo tiene algunos inconvenientes. Los extractos comerciales no están estandarizados, y no se conocen con certeza las proteínas presentes en los mismos. Además, frecuentemente, los extractos comerciales pierden proteínas lábiles, produciendo un resultado falso negativo, especialmente con frutas y vegetales (Ortolani, 1989). En los casos en que la historia clínica sea bastante convincente, se debe repetir el prick test con el alimento fresco (Rosen, 1994). Esta técnica se denomina “prick to prick”.



En general es conveniente realizarlo en niños mayores a 2-3 años. Niños menores de 1 año pueden tener alergia alimentaria y dar negativo el prick test, y en niños menores de 2 años, el tamaño del habón suele ser menor (Menardo, 1985).

Esta prueba no se puede realizar en casos de dermatitis, lo cual es muy común en niños o cuando no se puede discontinuar el tratamiento medicamentoso al cual se encuentra sometido el paciente. Si el paciente es tratado con antihistamínicos el tamaño del habón será menor, al igual que en casos de tratamientos prolongados con corticosteroides.

-Patch test

Mitchell en 1982 (Bruin-Weller, 1999) demostró que la aplicación sobre la piel sana de alergenos podía inducir lesiones eccematosas sólo en aquellos pacientes que también tenían una reacción positiva inmediata en la piel, para ese alergeno. A partir de allí se empezó a usar como herramienta para estudiar el rol de aeroalergenos en dermatitis atópica, o sea, se utiliza para estudiar reacciones tardías. Se aplica sobre la piel un papel impregnado en la solución del alergeno, y se observa el resultado a las 24-72 hs.

-Intradermoreacción

Se inyecta en la piel una solución del alergeno, y se observa la presencia de una reacción inflamatoria a los 15 minutos, caracterizada por un habón y eritema. Esta prueba es más riesgosa ya que se utiliza un mayor volumen de extracto.

Desafío alimentario

Loveless, en 1950, fue quien primero utilizó la prueba de desafío alimentario para establecer el diagnóstico de alergia alimentaria (Loveless, 1950). May, en 1976, introdujo el uso de la prueba de desafío doble ciego, controlado con placebo (DBPCFC) como diagnóstico confirmatorio de alergia alimentaria (May, 1976).

Los desafíos alimentarios pueden ser abiertos, donde el paciente y el médico conocen el contenido del alimento, simple ciego donde sólo el médico tiene



conocimiento o doble ciego cuando ninguno de los dos sabe acerca del contenido. Este último es el indicado, ya que elimina toda subjetividad posible.

Antes del test, se deben eliminar de la dieta durante 2 semanas todos los alimentos que contengan al alérgeno, y dejar de tomar antihistamínicos 7 días antes. El test debe ser realizado en lugares con el equipamiento adecuado para tomar medidas de emergencia y en presencia de personal profesional entrenado, dado que se está exponiendo al paciente al alérgeno desencadenante del cuadro de alergia. Se administra el alimento alérgico en ayunas. Primero se coloca una gota de una solución del alérgeno 13% en el borde interno del labio inferior, luego de 15-20 minutos 1-2 ml del mismo. Así se va incrementando la dosis, hasta los 200 ml. Si en algún momento se observa la aparición de cualquier síntoma, el test se da por finalizado y el resultado se considera positivo. Luego de la última administración, el paciente queda en observación durante 4 horas. Si no tiene síntomas, debe seguir consumiendo el alimento, y anotar cualquier reacción. Pueden haber reacciones tardías luego de 3-7 días.

El alimento a analizar debe ser enmascarado, lo cual puede realizarse de diferentes formas. En fórmulas elementales o jugos para niños pequeños, en purés o hamburguesas para niños mayores y adultos.

El desafío a doble ciego controlado con placebo es la prueba confirmatoria de alergia alimentaria (Sampson, 1988a) ya que se tiene una relación directa entre la ingesta del alimento y el cuadro alérgico. Pero tiene varias desventajas, lo cual hace que en muchos casos no se realice. No resulta práctico; requiere varias horas del paciente y su familia y de atención médica; expone al paciente a reacciones alérgicas o a una reacción anafiláctica; se puede analizar sólo de a un alérgeno por vez y el paciente debe discontinuar el uso de los medicamentos durante más de una semana, lo cual en muchos casos no es posible.

Sin embargo, no siempre es posible suplantar la prueba de desafío. Alrededor de 10% de pruebas de desafío positivas para alimentos en chicos con dermatitis atópica no son mediadas por IgE (no se encuentra IgE específica y el prick test es negativo) (Niggemann, 2001).



IV-4.d Análisis *in vitro*

Consiste en la utilización de distintos métodos inmunoquímicos que detectan la presencia de IgE total y específica en suero.

Determinación de IgE total

Este análisis se realiza debido a que la mayoría de las alergias son atópicas. El método para dosar IgE total se denomina PRIST*: Paper Radio Immuno Sorbent Test, donde se usa como fase sólida papel de celulosa activado con BrCN. Consiste en un ensayo de captura, donde se sensibiliza el papel con un antisuero anti-IgE, luego se incuban distintos papeles con diluciones del estándar de referencia internacional o con el suero del paciente. Y por último se agrega un anticuerpo anti-IgE conjugado a una marca radiactiva (También se puede realizar usando como conjugado una enzima). Como estándar se utiliza un patrón internacional de IgE, donde 1 unidad corresponde a 2,4 ng de IgE. El resultado se expresa en unidades/ml (U/ml).

Los valores de referencia, definidos en términos de probabilidad según la edad de los pacientes, son los siguientes:

Edades	Atopía poco probable	Atopía altamente probable
de 0-3 años	< 10 U/ml	> 30 U/ml
de 3-6 años	< 15 U/ml	> 60 U/ml
más de 6 años	< 20 U/ml	> 100 U/ml

* Los términos PRIST y RAST son marcas registradas de Amersham Biosciences. Sin embargo se utilizan como nombre común de las metodologías para la determinación de IgE total y específica.

Si la cantidad de IgE es elevada con respecto al valor de referencia, es probable que el paciente sea atópico. Hay que realizar el diagnóstico diferencial de las parasitosis, que cursan con IgE total elevada. Una vez hecho esto, se realiza la determinación de IgE específica.

Determinación de IgE específica

El método para dosar IgE específica, o sea, determinar la especificidad de la IgE en el suero del paciente, se denomina RAST*: Radio Allergo Sorbent Test, o en el caso de utilizar una enzima EAST. Se acopla el papel activado con el alérgeno a testear, y se incuba con el suero del paciente. Por último se agrega un antisuero anti-IgE conjugado. El problema de este método es que no existe un patrón de IgE específico de cada alérgeno. Por lo tanto se realiza una semicuantificación, haciendo una curva de referencia utilizando como sistema antígeno-anticuerpo el alérgeno más frecuente de la región y cuatro diluciones de un pool de suero de pacientes atópicos a dicho alérgeno. En nuestra región el alérgeno utilizado para la curva de calibración es el *Dermatophagoides pteronyssimus*. Se utiliza un extracto caracterizado en base a una internacional de referencia. Para la curva de calibración se realizan las siguientes diluciones del pool de sueros conteniendo 50 U IgE/ml: 1:1, 1:5, 1:25 y 1:50. Aquella muestra con una DO menor a la de la dilución 1:50 es clase 0, y se considera negativo. La muestra con DO entre la de las diluciones 1:50 y 1:25 es clase 1; entre la de 1:25 y 1:5 es clase 2; entre 1:5 y 1:1 es clase 3 y mayor a la DO de la dilución 1:1 es clase 4.

Otros métodos de detección de IgE específica son el dot-blot y el inmunoblotting, donde el alérgeno se encuentra unido a una membrana de nitrocelulosa. En el caso específico del inmunoblotting, las proteínas del extracto alérgico se encuentran separadas electroforéticamente. La membrana se incuba con el suero del paciente, y luego la IgE se revela con un antisuero anti-IgE conjugado. Mientras que el EAST detecta la presencia de IgE específica para un extracto alérgico, el inmunoblotting revela la especificidad de reconocimiento de dicha IgE por cada una de las proteínas separadas por el método electroforético utilizado.

Las pruebas *in vitro*, que involucran la utilización de métodos inmunoquímicos, tienen la gran ventaja de que no exponen al riesgo de anafilaxis al paciente, y no requieren la discontinuación de la medicación. También permite evaluar varios alérgenos a la vez. La desventaja es que sólo evalúa un único elemento de la reacción alérgica como es la IgE, y sólo la IgE sérica, no aquella presente en los tejidos en la superficie de las células efectoras. El RAST tiene una menor o igual sensibilidad que el prick test (Sampson, 1984). Se prefiere el RAST sobre el prick test en pacientes con



abundante dermografismo, severa dermatitis atópica, o cuando no pueden discontinuar el uso de antihistamínicos.

El screening de niños con reacción inmediata puede hacerse con prick, o con RAST, dado que ambos métodos proporcionan la misma información (Vanto, 1999).

Un test de laboratorio que de valores de predictibilidad similares que el reto alimentario con menor riesgo sería muy útil. En un estudio (Sampson, 1997a) encontraron los valores de IgE para varios alimentos (huevo, leche, maní y pescado) por encima de los cuales había un 95% de predictibilidad de reactividad clínica, eliminado así, en esos casos, el uso del desafío alimentario.

En otro reporte encontraron el tamaño que debía tener el habón en el prick test por encima del cual el reto alimentario siempre da positivo, y así se elimina la necesidad de realizar el desafío. Para chicos menores a 2 años ese diámetro, para leche de vaca, es de 6mm y para mayores a 2 años, de 8 mm (Hosking, 2000). Lo ideal sería determinar el tamaño del habón por alérgeno puro y no por alimento ya que contiene una mezcla de varios alérgenos.

IgE en sangre de cordón

Los valores de IgE sérica en sangre de cordón se encuentran más elevados en neonatos con historia familiar de atopía (Croner, 1992). Sin embargo, su valor predictivo positivo es bajo.

Dosaje de otros isotipos de inmunoglobulinas

Algunos trabajos sugerían un rol patogénico de los anticuerpos IgA e IgG₄ (Isolauri, 1992; Quinti, 1989), pero no se ha probado su rol fisiopatogénico (Host, 1994). La mayoría de los individuos presentan otros anticuerpos específicos de proteínas alimentarias, distintos de IgE, que resultan inocuos (Husby, 1988; Strobel, 1992).

IV-5 Modelos animales de alergia alimentaria

La falta de modelos animales en los que se produzca en forma espontánea la aparición de reacciones alérgicas al ser expuestos a componentes alérgicos, ha determinado que no se conozca en forma fehaciente el rol de los factores genéticos,



ambientales e inmunológicos en la generación, activación y expansión de linfocitos T específicos, responsables de los mecanismos fisiopatogénicos. La ventaja de contar con modelos animales reside en el conocimiento de su base genética y control de factores ambientales. Mediante manipulación genética de estos animales podría estudiarse la incidencia de la expresión de ciertos genes en mecanismos inmunológicos efectores, y desarrollarse nuevas estrategias terapéuticas correctivas.

En los últimos años se han producido avances en la creación de modelos animales de alergia alimentaria (en rata, ratón, cobayo) que reproduzcan la patología observada en humanos (Atkinson, 1994; Kitagawa, 1995; Li, 1999; Li, 2000). En los mismos se busca activar al sistema inmune de distintas formas y desviar la respuesta específica hacia mecanismos efectores Th2.

El obstáculo más importante en el desarrollo de un modelo animal de alergia es la tolerancia inmunológica innata desarrollada hacia este tipo de antígenos alergénicos que se administran por vía oral.

En uno de los modelos murinos de hipersensibilidad de tipo I a leche de vaca sensibilizan ratones C3H/HeJ de 3 semanas por administración intragástrica de leche de vaca con toxina colérica como adyuvante para eliminar la tendencia a tolerancia oral. Se indujo una reacción anafiláctica, con niveles aumentados de IgE, histamina plasmática y degranulación de mastocitos, mayor permeabilidad intestinal y vascular, inflamación bronquial e hipersecreción de mucus (Li, 1999).

En otro de los modelos descritos, estudiaron la capacidad de péptidos y de un hidrolizado de β -lactoglobulina de inducir tolerancia en ratones que luego fueron inmunizados con β -lactoglobulina, con hidróxido de aluminio como adyuvante, para generar un cuadro de alergia. Encontraron que los péptidos con tamaño menor a 4500 Da fueron capaces de suprimir la activación de mecanismos Th2-dependientes (Pecquet, 2000). En un modelo experimental en ratas alérgicas, observaron que los hidrolizados parciales inducen un cuadro de tolerancia mientras que los extensivos no, indicando que el tamaño del péptido también resulta relevante en la vía de inducción de un estado de tolerancia (Fritsché, 1997).

El desarrollo de este tipo de modelos puede proveer una herramienta importante para evaluar los mecanismos inmunopatogénicos en mucosas y sistémicos, y para explorar nuevas terapias correctivas del sistema inmune.



V- Alergia a leche de vaca

La mayoría de los casos de alergias a leche de vaca son mediados por IgE (60%), o reacción de hipersensibilidad tipo I, aunque también hay evidencia de que mecanismos de hipersensibilidad de tipos II, III y IV (Host, 1994; Bruijnzeel, 1995, Hill, 1996) pueden estar participando en la patogenia de las reacciones alérgicas.

V-1 Incidencia

La alergia a leche de vaca es la alergia alimentaria más común en la primera infancia. Se ha observado un marcado incremento de esta patología a partir de 1960, posiblemente debido a la exposición incrementada a leches maternizadas formuladas a partir de leche de vaca, como consecuencia de una disminución en la alimentación a base de leche materna. La prevalencia informada en países industrializados varía entre 1,8 a 7,5% (Host, 1990b; Bock, 1987). Esta gran variación se debe a diferencias en el criterio diagnóstico, alérgenos utilizados, etc. En estudios prospectivos basados en la prueba de desafío la incidencia es de 2-3% (Schrande, 1993; Hosking, 2000). La incidencia de alergia a leche de vaca en chicos alimentados sólo con lactancia materna es de 0,4-0,5% (Host, 1988)

V-2 Etiología y patogenia

Al consumir un alimento, se observa una absorción de proteínas a través de la mucosa intestinal. Como respuesta fisiológica normal, se producen anticuerpos contra las proteínas de ese alimento o se induce tolerancia (Host, 1994; Husby, 1988). Los anticuerpos producidos en individuos no atópicos son fundamentalmente de isotipo IgG e IgA (Johansson, 1984). Los mecanismos inmunológicos que previenen la entrada de antígenos extraños en el tracto gastrointestinal de un recién nacido no alcanzan la madurez hasta los 4-6 meses. La cantidad de ácido estomacal es baja durante el primer mes de vida (Hyman, 1985), la actividad proteolítica no alcanza los niveles óptimos hasta los 2 años, la IgA en las secreciones es muy baja en los primeros meses de vida



(Burgio, 1980), y las microvellosidades intestinales están inmaduras, produciendo una unión y transporte alterados de los antígenos por la mucosa intestinal (Bresson, 1984).

Por otro lado, la introducción temprana de muchos antígenos estimula la producción excesiva de IgE (Taylor, 1973) en individuos genéticamente predispuestos instaurando el estado de atopía. El desarrollo de atopía es mayor en niños que han recibido alimentos sólidos antes de los 4 meses de vida (Fergusson, 1990).

La sensibilización prenatal puede ser importante en la patogénesis, como indicaría la detección de IgE específica a proteínas de leche de vaca en sangre de cordón en un alto porcentaje de pacientes que luego desarrollan alergia a leche de vaca (Host, 1992). Es posible detectar en el suero y leche materna la presencia de alérgenos alimentarios en estado nativo (Host, 1990a; Chirido, 1998). Estos alérgenos podrían sensibilizar al feto en la vida intrauterina y al niño en la etapa de lactancia. También depende del estado de alimentación de la madre ya que la leche materna puede contener cantidades variables de citoquinas que modulan la respuesta inmune intestinal en el niño. Sin embargo, no en todos los casos se recomienda eliminar los alérgenos alimentarios de la dieta materna, sólo en aquellos con alta predisposición familiar. Con respecto a esto, se ha descrito un caso neonatal de alergia a leche de vaca, lo cual daría evidencia de que hubo una sensibilización intrauterina (Feiterna-Sperling, 1997). También existen casos de sensibilización a través de la lactancia materna, ya que niños alimentados exclusivamente con leche materna, desarrollan una respuesta efectora ante el primer contacto con leche de vaca (Host, 1988).

V-3 Aspectos clínicos

La edad de comienzo de síntomas de alergia a leche de vaca depende de la edad de introducción de la leche de vaca, en general ocurre dentro del primer año de vida. El 50% de chicos tienen una reacción durante la primera semana de ingestión de leche de vaca, y el 75% dentro de las 4 semanas. (Host, 1988).

Los síntomas pueden ser cutáneos (60%), gastrointestinales (50-60%), respiratorios (20-30%), anafilaxia (9%) (Host, 1994). Una de las manifestaciones más frecuentes de alergia a leche de vaca en los niños es la dermatitis atópica, alcanzando una incidencia del 80% (Cantani, 1999). Las reacciones pueden ser inmediatas (de 1



minuto a 1 hora luego de la exposición), intermedias (más de 1 hora) o tardías (luego de varios días) (Hill, 1986).

El pronóstico es bueno, con una remisión de 50% al año de vida, 75% a los 2 y 90% a los 3 años; gracias al desarrollo de los fenómenos fisiológicos de tolerancia oral (Host, 1994). Un 25% de niños con IgE específica para leche de vaca al año de edad desarrollan otras alergias (Host, 1990b). En estos casos, pueden aparecer reacciones a otros alimentos en el 50% o a alérgenos inhalantes en el 75%.

V-4 Composición de la leche de vaca. Proteínas de la leche de vaca

La leche es una solución y una emulsión. Es una solución de proteínas, glúcidos, iones, vitaminas, y una emulsión de lípidos. La leche contiene 40 g/l de grasa, organizada en glóbulos grasos. Para eliminarla, se centrifuga a 4000 g a 50°C, reduciendo el contenido de lípidos a 0,5 g/l. El principal hidrato de carbono de la leche es la lactosa, cuya concentración es de 30g/l. Las proteínas de la leche de vaca (30 g/l) se clasifican en 2 grupos según su solubilidad a pH=4,6 a 20°C: las caseínas que son insolubles y las proteínas del suero, fracción soluble en esas condiciones. Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas totales.

Fracción de caseínas

La concentración de caseína de la leche de vaca es de 25 g/l. Contiene 4 tipos de caseínas en una relación $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : \beta : \kappa = 4:1:4:1$ (Papiz, 1986). Son secretadas en forma de micelas de caseína complejadas con fosfato de calcio, con un tamaño de 50 a 250 nm de diámetro (Monaco, 1987). Aparentemente su rol fisiológico es el transporte de fosfato de calcio.

La acidificación a pH=4,6 produce la disolución del fosfato de calcio y precipitación de las proteínas. El aislamiento de la fracción de caseínas a partir de leche bovina se realiza generalmente a través de precipitación isoeléctrica, mediante el agregado de HCl o H₂SO₄ hasta pH=4,6. Luego pueden redisolverse por neutralización, adicionando NaOH. El caseinato así solubilizado contiene a todas las caseínas, sin embargo es muy difícil separarlas entre sí, debido a su fuerte tendencia a autoagregarse.



Otro método alternativo de separación de caseína es la coagulación con renina, enzima que degrada la κ -caseína, en dos polipéptidos, la para- κ -caseína y el glicomacropéptido. Este tratamiento altera la estabilidad de la micela, ya que precipita a la para- κ -caseína estabilizante del complejo proteico en medio acuoso, y queda soluble el macropéptido.

Las α y β caseínas tienen estructuras secundarias desordenadas o al azar, por tener 8,5% y 17 % de residuos de prolina distribuidos uniformemente en la molécula, lo cual desfavorece la formación de α hélices u hojas β . En la tabla III se muestran algunas características de las moléculas de caseína:

Tabla III.- Características de las moléculas de caseína

Proteína	% en caseína*	PM (Da)	SerP/mol [#]	Glucosilación	Cys/mol ^{&}
α s1	40-45	23551	8-9	No	0
α s2	10	25238	10-13	No	2
β	35-40	24028	5	No	0
κ	9-15	19038	1-2	Sí	2

* Porcentaje en la micela. [#] Cantidad de residuos de serina fosforilados. [&] Cantidad de residuos de cisteína por mol (cys/mol).

Las caseínas tienen la característica de tener varios residuos de serina fosforilados a través de los cuales pueden unir calcio. En las α y β -caseínas los residuos de serina fosforilados tienden a estar agrupados en regiones particulares, de secuencia SerP-SerP-SerP-X-SerP. Estas regiones tienen una alta carga negativa a pH neutro y unen calcio fuertemente. La única caseína glucosilada es la κ -caseína.

Las caseínas son altamente hidrofóbicas, por tener muchos aminoácidos no polares. En la β caseína la mayoría de la carga y los grupos polares están en los primeros 40 aminoácidos. Es una proteína anfipática, con un extremo hidrofílico y el otro hidrofóbico. La κ -caseína tiene el extremo N-terminal hidrofóbico (1-105) y el C-terminal hidrofílico (106-169). Tiene 4 sitios de glucosilación, pero sólo la mitad de las moléculas están glucosiladas. Las α -caseínas tienen distribuidos más uniformemente los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos, aunque hay zonas más hidrofóbicas. Debido a su



hidrofobicidad tienden a interactuar con otros materiales hidrofóbicos o entre ellas. Por ejemplo, en una solución de β -caseína, éstas se agregan formando partículas de 30 moléculas individuales (Kajiwara, 1988).

La estructura de la micela aún está en discusión, existen 2 modelos pero ninguno explica completamente el comportamiento observado. Un modelo propone que las micelas están formadas por submicelas similares o idénticas, las cuales a su vez consisten de varias (alrededor de 30) moléculas de caseína (Slaterry, 1973). Estas submicelas están unidas entre sí por fosfato de calcio, mientras que las caseínas individuales se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas. El otro modelo propone un contacto mayor entre los grupos fosfato de los residuos de serina de las caseínas con el fosfato de calcio, donde las submicelas serían fosfato de calcio rodeado por caseínas, y se unirían entre sí mediante uniones hidrofóbicas (Holt, 1992).

La mayoría de la κ -caseína se encuentra en la superficie de la micela, actuando como estabilizadora (Dalglish, 1989). Esta capacidad se debe al extremo C-terminal, que contiene la porción glucosilada (glicomacropéptido), el cual protruye de la micela. El tratamiento de las micelas con renina, elimina el glicomacropéptido y las micelas se agregan (Dalglish, 1992).

Además existen en la leche productos de degradación proteolítica de las caseínas. Las γ -caseínas y algunos componentes de la fracción proteosa-peptona provienen de la degradación proteolítica por parte de la plasmina de β -caseína. Las λ -caseínas provienen de la α_{s1} -caseína, y el glicomacropéptido y la para- κ -caseína de la acción de la renina sobre la κ -caseína.

Proteínas del suero

Las proteínas del suero son una mezcla de proteínas con propiedades diversas. Las proteínas mayoritarias del suero son la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, que constituyen el 70% de ellas. Las que siguen en cantidad son la albúmina de suero bovino (BSA) y las inmunoglobulinas.

La β -lactoglobulina (2-4 g/l en suero, PM de 18,3 kDa) está formada por 162 aminoácidos, con 1 grupo tiol y 2 puentes disulfuro. Tiene un bolsillo capaz de unir vitamina A y ácidos grasos. Es una proteína altamente organizada, con una gran



proporción de hojas β (43-50%), y con sólo 10-15% de hélice α y 15-20% de β -turns (Papiz, 1986). Su estructura compacta la hace resistente a la proteólisis completa. La α -lactoalbúmina (1,5 g/l en suero, PM de 14,2 kDa) está compuesta por 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuro. Es parte de la enzima galactosil-transferasa, participando de la síntesis de lactosa. Tiene poca estructura secundaria, 9% de hojas β y 30% de hélice α (Alexandrescu, 1993). Tiene una alta flexibilidad. La BSA (0,25g/l) está formada por 582 aminoácidos. Funciona como proteína transportadora de moléculas hidrofóbicas en fluidos biológicos. Es compacta en su extremo C-terminal. Las Inmunoglobulinas (0,65g/l) tienen un PM de 148-1000 kDa y tienen función de anticuerpo. La lactoferrina es una metaloproteína, que contiene Fe^{3+} , de 80-92 kDa y 703 aminoácidos. Contiene 16 puentes disulfuro.

Otras proteínas minoritarias presentes en el suero son lipoproteinlipasa, fosfatasas ácidas y alcalinas, lisozima, xantina oxidasa, lactoperoxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, alfa-amilasa, factores de crecimiento, hormonas.

Una forma de caracterizar las proteínas presentes en la leche es la separación electroforética. Inicialmente la electroforesis en geles de poliacrilamida para separar proteínas de leche de vaca se realizaba en presencia de urea. Sin embargo, dado que la separación no se realiza según pesos moleculares, se debe incluir proteínas puras como patrones. En este tipo de electroforesis, el orden de movilidad decreciente entre las caseínas es: $\alpha_{s1} > \alpha_{s2} > \beta > \kappa$. En el caso de las electroforesis en presencia de SDS, las caseínas se separan de acuerdo a su PM, sin embargo se observa una anomalía entre α_{s1} y β , apareciendo la primera como si tuviera un tamaño mayor que la segunda. Este comportamiento anómalo se debe a la presencia de una mayor cantidad de grupos fosfato en la α_{s1} que le altera su carga neta. En la figura G se observa una separación electroforética típica de un extracto proteico de leche de vaca.

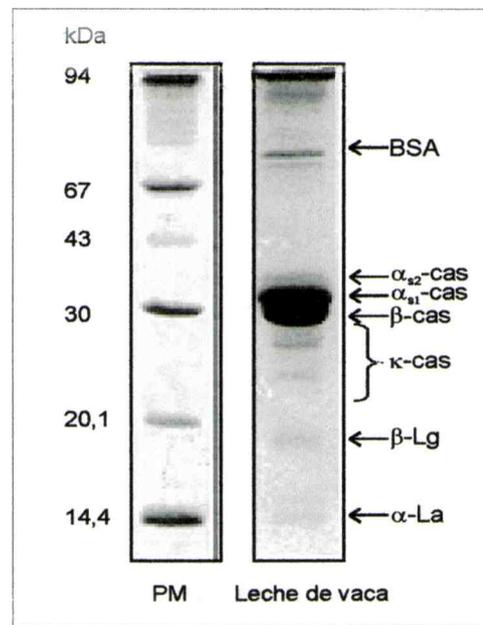


Figura G: SDS-PAGE de proteínas de leche de vaca. La tinción se realizó con Coomassie-Blue R-250.

V-5 Alérgenos de la leche de vaca

La mayoría de los pacientes muestran IgE específica para más de una proteína presente en la leche de vaca. Durante mucho tiempo se consideró a la β -lactoglobulina como el principal alérgeno (Bleumink, 1968). Actualmente, se han establecido que varias de las otras proteínas actúan como alérgenos, como las caseínas, α -lactoalbúmina y BSA (Otani, 1989). Varios estudios observaron una gran incidencia de las caseínas como alérgenos, en términos de frecuencia e intensidad de las respuestas (Stoger, 1993; Docena, 1996). Entre las caseínas, el orden de potencia alérgica es $\alpha_{s1} > \beta > \alpha_{s2} = \kappa$ (Bernard, 1998).

Se han publicado varios estudios sobre los epítopes alérgicos de la α_{s1} -caseína, encontrándose distintos péptidos inmunorreactivos a lo largo de toda la molécula (Otani, 1986; Spuergin, 1996). Los epítopes de α -caseína son preferencialmente secuenciales (Kohno, 1994). En cuanto a la β -caseína, Otani y col encontraron 6 sitios antigénicos cuyos epítopes son secuenciales (Otani, 1987). La β -lactoglobulina es una proteína cuya estructura le da una gran resistencia al pH ácido y a las proteasas (Reddy, 1988), permitiendo que quede intacta luego del proceso de digestión. Esto favorece que la



proteína intacta se absorba a nivel intestinal. Por el contrario, la pérdida de la conformación no tuvo efecto sobre la inmunorreactividad, sugiriendo que los epitopes son secuenciales (Selo, 1998). Por medio de estudios de mapeo de epitopes, se encontró que hay epitopes a lo largo de toda la estructura primaria de la molécula (Takahashi, 1990). Los estudios de epitopes de la α -lactoalbúmina muestran que muchos sueros no reconocen péptidos derivados de la proteína intacta, sugiriendo la importancia de los epitopes conformacionales (Maynard, 1997).

V-6 Prevención

La lactancia materna es importante en muchos aspectos, ya que transfiere al niño inmunidad de la madre, protege contra ciertas infecciones respiratorias (Rylander, 1993), desórdenes gastrointestinales y estimula la maduración del sistema inmune (Hanson, 1999).

La lactancia materna puede disminuir la sensibilización alérgica, gracias a reducir la exposición y la absorción intestinal de proteínas alimentarias. La absorción intestinal de proteínas alimentarias, causada por un aumento de la permeabilidad intestinal es un fenómeno universal en los neonatos, siendo mayor en los bebés pretérmino que en los nacidos a término (Robertson, 1982). Esta entrada de proteínas también puede ocurrir por una injuria del epitelio intestinal. La maduración intestinal ocurre entre los 3 y 4 meses de vida (Israel, 1988). La leche materna, a través de la IgA secretoria inhibe la absorción de proteínas (Walker, 1977). Estos beneficios de la leche materna fueron publicados por primera vez por Grulee y Stanford (Grulee, 1936) en 1936, quienes observaron una disminución en la incidencia de dermatitis atópica en niños amamantados comparados con bebés alimentados con leche bovina durante los primeros 6 meses de vida. A partir de varios estudios, puede concluirse que las enfermedades alérgicas son reducidas por una lactancia materna prolongada (más de 4 meses, preferiblemente 6 meses) y la introducción de alimentos sólidos después de los 6 meses (Hill, 1996; Kajosaari, 1983).

De todas maneras, existen casos de alergia a leche de vaca en niños alimentados exclusivamente mediante lactancia materna (Host, 1988). A partir de esto, surgieron estudios que comparan el desarrollo de alergia en niños amamantados, con o sin



restricciones en la dieta de la madre. La restricción dietaria a la madre consiste en evitar la ingesta de leche de vaca y otros productos lácteos, huevo, pescado, maní y soja. Los resultados sugieren que los niños cuyas madres eliminaron alérgenos de la dieta, desarrollan menos enfermedades alérgicas (Chandra, 1989a; Hattevig, 1989). De todas maneras, sólo se recomienda en casos donde el bebé tiene síntomas o signos de alergia o predisposición familiar.

Otra medida preventiva analizada fue eliminar alimentos alergénicos de la dieta materna durante el embarazo. Esta restricción dietaria no disminuyó la prevalencia de alergia en los hijos (Falth-Magnusson, 1992)

En los casos donde la madre decide no amamantar, y el niño tiene alta predisposición a alergia, se pueden utilizar los hidrolizados como forma de prevención de alergia (Vandenplas, 1992; Halken, 1993a). Se observó que la alimentación con un hidrolizado parcial de suero durante los primeros 6 meses de vida redujo la incidencia de atopía, comparada con el uso de leche de vaca o de soja (Vandenplas, 1995; Marini, 1996).

V-7 Sustitutos lácteos

Hasta antes del siglo 20, la lactancia materna era el único alimento disponible para los neonatos. A partir de la década del '50, las fórmulas a base de leche bovina (leches maternizadas) comenzaron a aparecer en el mercado. El relativo bajo costo y la mayor facilidad para alimentar a los bebés, llevó a que la mayoría de ellos fueran alimentados a base de fórmulas artificiales a partir del nacimiento (Martinez, 1981). Esta tendencia comenzó a revertirse hace unos 10 años, donde un mayor número de madres retornaron a la lactancia como forma de alimentar a sus hijos. Sin embargo, dado que a partir de los 2-3 meses del nacimiento, las madres que trabajan fuera de su casa deben retornar a sus trabajos, las fórmulas siguen siendo importantes en la nutrición de los niños.

A principios de siglo, empezó a utilizarse la leche de soja en los casos de intolerancia a leche de vaca. El primer reporte data de 1909, desde cuando comenzó a utilizarse formulaciones a base de proteínas de soja como alimento para niños, y a partir de 1920 se empezó a utilizar en niños alérgicos a leche de vaca.



En la actualidad existen 3 tipos de sustitutos lácteos disponibles: leche de distintas especies de mamíferos (oveja, cabra, etc), leche de soja e hidrolizados de proteínas de leche de vaca.

Los hidrolizados de proteínas de leche de vaca han sido desarrollados con el propósito de reducir la alergenicidad de sus proteínas, y así proveer un sustituto para alimentar a los niños alérgicos.

Hace unos pocos años aparecieron en el mercado fórmulas a base de aminoácidos, las cuales son utilizadas con éxito en niños cuya intolerancia es tan grave que no toleran los hidrolizados extensivos. Este tipo de fórmula es segura porque carece de polipéptidos que puedan constituir epitopes.

V-7.a Leche de distintas especies de mamíferos

Leche de distintas especies de mamíferos, como oveja o cabra, son alguno de los productos lácteos utilizados como sustituto para niños con alergia a leche de vaca.

Por otro lado, las proteínas de leche de vaca, oveja, cabra y búfalo presentan inmunoreactividad cruzada, y por ello su uso para la alimentación de niños alérgicos a leche de vaca es controversial (Wilson, 1988; Businco, 1995, Restani, 1999a). Dicha inmunoreactividad se basa en la alta homología de secuencia existente entre las moléculas de caseínas de esas leches, que alcanza el 90%. En cambio la homología entre las distintas moléculas de caseínas presentes en una única especie no supera el 30% (Spuergin, 1997). Esta reactividad cruzada puede ponerse de manifiesto mediante reacciones *in vivo* e *in vitro* que involucran la IgE de pacientes alérgicos a leche de vaca que nunca habían consumido leche de otro mamífero. Este fue el caso de pacientes que mostraron reactividad para proteínas de leche de oveja, cabra y búfalo (Spuergin, 1997; Restani, 1999a). En un estudio realizado mediante pruebas de reto alimentario con leche de cabra, el 92% de pacientes alérgicos a leche de vaca no la toleraron (Bellioni-Businco, 1999). La leche de yegua es otro de los sustitutos posibles. El reporte de Businco y col (Businco, 2000) indica un pobre reconocimiento por parte de la IgE sérica de las proteínas de la leche de yegua. Por el contrario, se han observado alergias a proteínas de leche de oveja, cabra o yegua, sin alergia a leche de vaca (Wuthrich, 1995; Gall, 1996).



Otro sustituto analizado por el grupo de Restani y col, (Restani, 1999a) fue la leche de camello, con la cual no detectaron reactividad cruzada. Dado que la composición de aminoácidos de las proteínas es similar a las de la leche bovina, podría ser propuesta como alimento, siempre que se verifique nutricionalmente que es apta para el consumo humano.

V-7.b Fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de leche bovina

Hay un gran número de fórmulas hipoalérgicas disponibles en el mercado internacional. La antigenicidad residual y la alérgenicidad potencial de un hidrolizado depende del procesamiento aplicado, el que generalmente es mantenido en secreto por la industria que lo produce. Estos sustitutos son producidos usando tres técnicas básicas: tratamiento térmico, hidrólisis enzimática y/o ultrafiltración. Durante el tratamiento térmico se desnaturaliza la proteína, eliminando sus epitopes conformacionales. Este tratamiento facilita la hidrólisis enzimática (por hacer más accesibles los sitios de corte a la proteasa) y reduce la alérgenicidad de las proteínas del suero, pero no de las caseínas. En contraste, la proteólisis destruye las proteínas alérgicas y sus epitopes (Jost, 1987). En base al grado de hidrólisis, los sustitutos pueden dividirse en parciales o extensivos. En los hidrolizados extensivos el PM de los péptidos es menor a 1500 Da, mientras que los parciales contienen una cantidad significativa de péptidos con PM mayor a 4000 Da, y 5% con PM mayor a 15000 Da (Businco, 1993). Fórmulas con péptidos menores a 1200 Da son menos alérgicas (Anonymous, 1989). Sin embargo, puede ocurrir la agregación de péptidos de bajo PM, y estos agregados pueden ser antigénicos y alérgicos (Matsumuda, 1987). Además, los hidrolizados parciales pueden contener proteínas de leche de vaca intactas, y desencadenar síntomas en el 50% de pacientes alérgicos (Dean, 1993; Restani, 1995). En general, se recomienda el uso de los hidrolizados parciales sólo como prevención de alergia, y los extensivos como sustituto dietario para niños alérgicos a leche de vaca.

A menudo, es necesaria la inclusión de un paso posterior de ultrafiltración para remover péptidos de alto PM y proteínas intactas. La ultrafiltración resulta en una gran disminución de la alérgenicidad *in vivo* e *in vitro*, comparada con el mismo hidrolizado sin ultrafiltrar (Rugo, 1991).



La composición de la fórmula hipoalérgica depende de la fuente proteica, del grado de hidrólisis y además del procesamiento posthidrólisis, tal como la eliminación de enzimas y proteínas residuales. A mayor grado de hidrólisis, quedan expuestos un mayor número de aminoácidos hidrofóbicos otorgando un gusto amargo a la fórmula, lo cual reduce la aceptación por parte de los consumidores. Además la osmolaridad de la fórmula aumenta, produciendo diarreas. Por lo tanto, cuanto más hidrolizadas están las proteínas las propiedades alérgicas se reducen, pero por el contrario, el gusto empeora y la osmolaridad y el costo aumentan. Al elegir un sustituto se debe considerar su valor nutricional, alérgenicidad, gusto, osmolaridad y costo (Tabla IV)

Tabla IV.- Comparación entre las características de las fórmulas a base de hidrolizados de leche de vaca: extensivos y parciales (Businco, 1997)

	extensivos	parciales
Inmunogenicidad	-	+/-
Alérgenicidad	+/-	+++
Proteínas intactas	-	++
Epitopes reactivos	+/-	+++
Gusto agradable	-	+
Osmolaridad	+++	+
Bajo costo	-	+

La American Academy of Pediatrics Subcommittee on Nutrition and Allergic Disease de Estados Unidos de América recomendó que una fórmula sea designada como hipoalérgica cuando la proteína ha sido modificada para reducir la antigenicidad, de modo que el 90% de los individuos alérgicos a esa proteína la toleren con un 95% de confianza (Kleinman, 1991). Un comité dentro de la European Society of Paediatric Allergy and Clinical Immunology (ESPACI) sugiere que sólo los hidrolizados extensivos deben usarse tanto para tratamiento como para prevención en grupos de riesgo (Businco, 1993).

Considerando la fuente proteica utilizada, los hidrolizados pueden provenir de caseínas, proteínas de suero o mezcla de suero y caseínas. Los primeros en aparecer, hace unos 40 años, fueron los hidrolizados extensivos de caseína. (Tabla V).

**Tabla V.-** Fórmulas "hipoalergénicas" disponibles comercialmente

Fuente proteica	Hidrolizados extensivos	Hidrolizados parciales	
Caseína bovina	Alimentum	KAS 1000	
	Nutramigen		
	Pregestimil		
Suero de leche de vaca	Profylac	Beba HA	
	Alfa-Ré	Nidina HA	
	Pepti-Junior		Good Start
			Nutrilon Pepti
			Nutrilon Pepti Plus
			NAN HA
			Humana HA
Suero y caseína		Aptamil HA	

Los hidrolizados parciales son indicados para reducir el riesgo de sensibilización en niños con alta predisposición a atopía. Algunos autores informaron un efecto beneficioso de estas fórmulas (Vandenplas, 1988; Chandra, 1991), sin embargo, otros no observaron diferencia en la incidencia de alergia en comparación con la alimentación con leche de vaca (Schmitz, 1992; Mallet, 1992).

Los hidrolizados, tanto parciales como extensivos, contienen una actividad antigénica residual (Plebani, 1990; Ragno, 1993), y se han observado reacciones anafilácticas, tanto con los parciales (Ellis, 1991; Tarim, 1994) como con los extensivos (Businco, 1989; Saylor, 1991, Hoffmann, 1997). La antigenicidad y alergenidad residual del hidrolizado es, en parte, dependiente del PM de los péptidos remanentes (Rugo, 1992). Es difícil determinar el límite de PM debajo del cual se pueda garantizar ausencia de antigenicidad y alergenidad. Péptidos de 700 Da o más tienen el tamaño suficiente como para unirse a anticuerpos específicos (Plebani, 1992). Sin embargo para producir el entrecruzamiento de las moléculas de IgE presentes en las células efectoras son necesarios al menos 2 epitopes presentes en la misma molécula. Estudios en animales mostraron que péptidos menores a 3000 Da no fueron capaces de inducir reacciones mediadas por IgE. En humanos se observó que péptidos entre 3000 y 5000 Da fueron suficientes para provocar reacciones (van Beresteijn, 1994). Péptidos de un hidrolizado con PM entre 1400 y 2600 fueron capaces de unirse a la IgE y de producir



reacción positiva en prick test, mientras que aquellos en el rango de 950 a 1400 Da se unieron a IgE pero la prueba cutánea fue negativa (van Hoeyveld, 1998). Esto indica que en el rango de PM entre 950-1400 Da, el péptido no sería lo suficientemente grande como para que existan 2 epitopes. La antigenicidad residual también cambia con el tipo de proteasa utilizada (van Beresteijn, 1995), produciendo un espectro diferente de péptidos.

Recientemente se ha propuesto el uso de una fórmula (Neocate) a base de aminoácidos, con lo cual está asegurada la ausencia de epitopes alérgicos. Además contiene lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas. Se utiliza para niños con alergia a leche de vaca e intolerancia a múltiples proteínas alimentarias (Hill, 1995), y ha sido bien tolerada por éstos, representando un gran avance en el tratamiento de esta patología (de Boissieu, 1997).

V-7.c Fórmulas a base de proteínas de soja (Leche de soja)

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa que se comenzó a cultivar en China probablemente entre los siglos 7 a 11 antes de Cristo. Los productos a base de soja son comunes en la comida asiática, e incluyen aceite, harina, salsa, bebidas, tofu, fórmulas para lactantes, etc. Las proteínas de soja son ampliamente utilizadas en productos alimenticios debido a sus propiedades funcionales y nutricionales, tales como la solubilidad, formación de espumas, emulsificación, alto contenido de aminoácidos esenciales. Esto hace muy difícil a un alérgico a soja encontrar alimentos libres de soja, además, no siempre está presente esta información en el rótulo. La amplia utilización de la soja en la alimentación de individuos alérgicos y no alérgicos ha expuesto a gran parte de la población, sensibilizándola. Se ha transformado en uno de los principales alérgenos alimentarios, tanto en niños como adultos. Por ello actualmente se considera a las proteínas de soja un alérgeno alimentario importante.

El primer reporte del uso de soja como sustituto a la leche de vaca es de 1909 (Ruhrah, 1909), y como sustituto lácteo para la alimentación de niños con alergia a leche de vaca de 1929 (Hill, 1929). Las fórmulas a base de soja eran el único sustituto disponible, ya que los hidrolizados proteicos a partir de leche bovina fueron desarrollados más recientemente. Las fórmulas a base de soja contienen proteínas



purificadas, una mezcla de aceites vegetales, maltodextrinas, almidón de maíz o sacarosa como fuente de hidratos de carbono y carecen de lactosa, y se denominan comercialmente leches de soja. El consumo de estas fórmulas asegura un adecuado crecimiento, contenido proteico y mineralización ósea.

V-7.c.1 Proteínas de soja

El poroto de soja tiene 3 componentes estructurales mayores, la cáscara, el cotiledón y el hipocotiledón, que representan el 8, 90 y 2% del peso del poroto, respectivamente. El poroto entero de soja está compuesto por un 20% de lípidos, 12% de agua, 35% de proteínas y el 23% de hidratos de carbono. Las proteínas presentes en las semillas pertenecen a 3 grupos según su función, las de reserva, estructurales y proteínas biológicamente activas. Las primeras son las mayoritarias, las cuales son sintetizadas y depositadas como cuerpos proteicos durante el desarrollo del endosperma, en el cotiledón de la semilla. Su función es servir como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de la semilla durante la germinación. Las proteínas biológicamente activas son distintas enzimas, como inhibidor de tripsina, lipoxigenasa, hemaglutinina, β -glucosidasa, β -amilasa, citocromo c, fosfatasa.

El 90% de las proteínas de la semilla de soja son solubles en soluciones salinas, por lo cual se las denomina globulinas, el restante 10% son solubles en agua, y son llamadas albúminas. El 75% de las globulinas precipitan a $\text{pH}=4,5-4,8$, dando origen a un producto que se llama precipitado ácido de proteínas o globulinas de soja, mientras que las que quedan solubles constituyen el suero. Las globulinas pueden dividirse en 4 fracciones, de acuerdo al coeficiente de sedimentación, en 2S, 7S, 11S y 15S. Según otra clasificación, desde el punto de vista inmunoquímico, se dividen en glicinina, α -conglucina, β -conglucina y γ -conglucina (Catsimpoolas, 1969). La glicinina corresponde a la fracción 11S, la α -conglucina a la fracción 2S, y la globulina 7S está formada por la β -conglucina, la γ -conglucina y la globulina 7S básica (Tabla VI). Los componentes mayoritarios son la globulina 11S o glicinina y la 7S o β -conglucina.

Tabla VI.- Clasificación de las globulinas de soja.

Fracción (según coeficiente de sedimentación)	Fracción (según inmunoquímica)	% del total de proteína	Peso molecular (kDa)
2S	α -conglucina	22	8; 12; 21.5
7S	β -conglucina	36	150-200
	γ -conglucina		170
	globulina 7S básica		168
11S	glicina	31	300-380
15S	---	11	600

Globulina 7S

Está compuesta por 3 fracciones: β -conglucina, γ -conglucina y globulina 7S básica. La primera es la más abundante, del 30-50% del total de las proteínas de la semilla. La globulina 7S básica es una glicoproteína de 168 kDa, pI de 9,05-9,26, y está formada por 4 subunidades compuestas por 2 polipéptidos de 26 y 16 kDa unidos por S-S. La γ -conglucina es una glicoproteína, formada por 3 subunidades idénticas de 170 kDa. La β -conglucina (Figura H) tiene un PM de 150-200 kDa, y está compuesta por 4 polipéptidos, 3 de los cuales son mayoritarios, α' (72 kDa), α (68 kDa) y β (52 kDa), y uno minoritario, similar en tamaño a β . Las secuencias de aminoácidos de todas las subunidades es altamente homóloga. Se identificaron diferentes tipos de trímeros: $\alpha'\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha'\alpha\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3 , β_3 donde las subunidades están unidas por uniones no covalentes

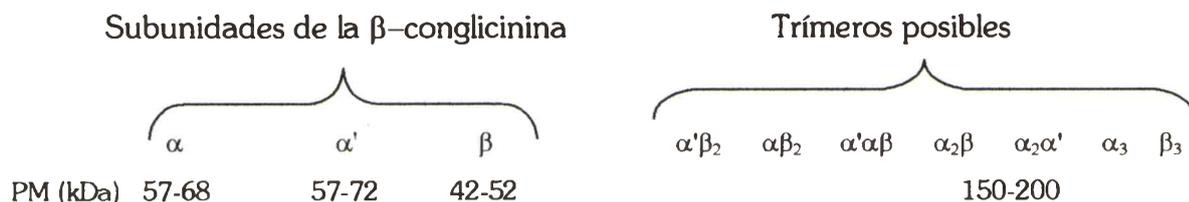


Figura H: Estructura molecular de la β -conglucina



Globulina 11S

La globulina 11S de soja se llama glicinina, y es un hexámero de 300-380 kDa. Cada subunidad del hexámero está compuesta de un polipéptido ácido A (pI ácido) con un PM de unos 35 kDa y uno básico B (pI básico) de aproximadamente 20 kDa de PM, que están unidos por un puente disulfuro (Figura I). Se sintetizan como un único polipéptido precursor, y luego es modificado postraduccionalmente formando los 2 polipéptidos. El sitio del procesamiento en todos los precursores es la unión Asn-Gly, teniendo entonces todos los A Asn en el extremo C-terminal y todos los B Gly en el N-terminal. Se identificaron 5 subunidades: $A_{1a}B_{1b}$ (G1), A_2B_{1a} (G2), $A_{1b}B_2$ (G3), $A_5A_4B_3$ (G4) y A_3B_4 (G5). La subunidad $A_5A_4B_3$ es sintetizada en forma similar a las otras, sólo que el polipéptido ácido es escindido para producir A_5 (97 aa) y A_4 (257 aa), siendo A_5 el del extremo N-terminal. En las 5 subunidades se encontró un solo puente S-S entre A y B, y la posición propuesta es entre el aminoácido 7 de B y 85-88 de A. En $A_5A_4B_3$, la unión disulfuro se encuentra entre A_5 y B_3 .

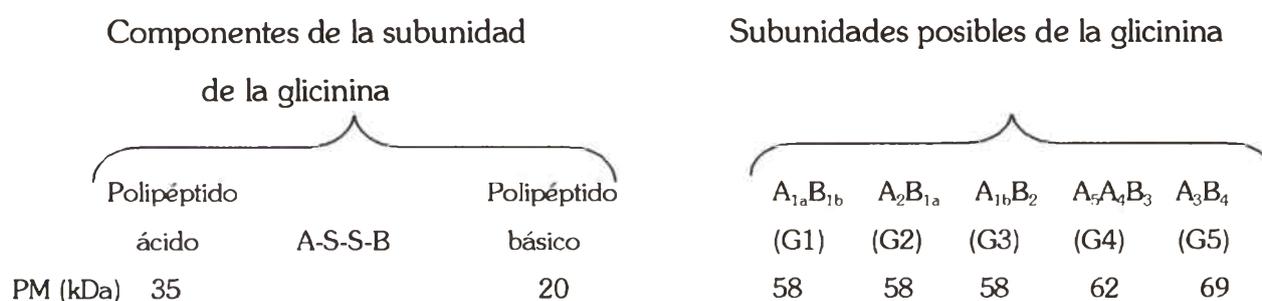


Figura I: Estructura molecular de la glicinina

Hay una alta homología de secuencia y de estructura secundaria entre las subunidades de 7S y 11S, indicando que provienen de un gen ancestral común. En cada subunidad hay 3 dominios: el del C-terminal, el central y el N-terminal. El C-terminal contiene hojas β y β turns, y es la región más conservada, además es altamente hidrofóbica, indicando que estaría orientada hacia el interior de la estructura. La región central contiene una mezcla de hojas β , hélice α y β turns. La región N-terminal consiste de β turns y hélice α . La principal diferencia entre 7S y 11S es atribuida a una región



hipervariable entre el dominio central y el C-terminal en las 11S, que resultó de una inserción de un polipéptido ácido rico en glu y asp.

En la figura J se muestra una electroforesis SDS-PAGE de un extracto acuoso de leche de soja en la que se muestran los tamaños relativos de cada componente. En la electroforesis se distinguen las bandas correspondientes a las subunidades que componen a las globulinas 7S y 11S.

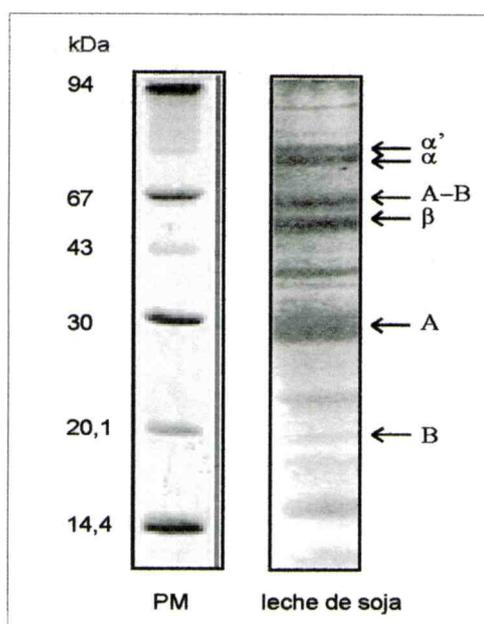


Figura J: SDS-PAGE de proteínas de leche de soja. La tinción se realizó con Coomassie-Blue R-250.

V-7.c.2 Alergia a soja

Las fórmulas a base de soja son empleadas en el tratamiento de diversas patologías alimentarias tales como alergia a leche de vaca, intolerancia a lactosa y gastroenteritis severa.

Las proteínas de soja son tan antigénicas como las de leche de vaca (Eastman, 1978), y por ello su uso para prevención de atopía no ha sido beneficioso, mostrando iguales resultados que el uso de leche de vaca (Miskelly, 1988; Chandra, 1989b).

La soja es uno de los principales alérgenos alimentarios en Japón. Varios trabajos demostraron (Shibasaki, 1980; Bush, 1988) que la fracción 7S es la más alérgica, y en

particular la subunidad α de la β -conglucina (Ogawa, 1995). También existen trabajos en los que se demuestra la presencia de epitopes para IgE en la fracción 11S (Burks, 1988). Otros de los componentes alergénicos frecuentemente reconocido por la IgE del suero de pacientes alérgicos a soja es el Gly m Bd 30K, una proteína de 34 kDa asociada a los cuerpos proteicos o proteína vacuolar P34; la fracción 2S, que incluye el inhibidor de tripsina tipo Kunitz de 20 kDa (Moroz 1980; Shibasaki 1980) y otra proteína de 20 kDa, diferente de la anterior aún no caracterizada (Herian, 1990; Zeece, 1999).

Existe bibliografía en la cual se muestra una alta incidencia de alergia a soja, de hasta el 47%, sin embargo muchos de esos trabajos son de bajo rigor científico. En ninguno de ellos se ha realizado el diagnóstico en base a la prueba de desafío, y en varios, tampoco se realizó la medida de IgE específica; en cambio están basados en historia clínica o reportes de los padres. Muchos de estos trabajos se realizaron antes de que se imponga la prueba de desafío como prueba confirmatoria para el diagnóstico de la alergia alimentaria. Los estudios de Kuitunen y col (Kuitunen, 1975) y Jakobsson (Jakobsson, 1979) quienes estudiaron niños con intolerancia a leche de vaca, informan una incidencia de 11% y 35%, respectivamente; en ninguno de los 2 estudios se hicieron desafíos ni la medición de IgE específica. Freier (Freier, 1988) indica una incidencia de alergia a soja del 30% en niños alérgicos a leche de vaca. Bishop y col (Bishop, 1990) estudió niños con alergia a leche de vaca, diagnosticada por desafío, e indica una incidencia del 47% en ese grupo, sin embargo el diagnóstico para alergia a soja no fue realizado por medida de IgE específica ni desafío. Gerrard y col (Gerrard, 1973) mostró que 20% de chicos alérgicos a leche bovina, alimentados con leche de soja, tenían síntomas, pero no realizó desafío.

Hay varios estudios que evalúan la incidencia/prevalencia de alergia a soja, comparada con la de alergia a leche de vaca. En la tabla VII (Cantani, 1997) se muestra el resumen de 14 estudios.

A partir de la tabla, surge que la prevalencia promedio de alergia a soja es 7.1%, mientras que la de alergia a leche de vaca es de 24.9%. Hay pocos estudios donde el diagnóstico de alergia a soja se haya hecho mediante la prueba de desafío, en los cuales encontraron una incidencia que no supera el 5%. En los estudios de Sampson (Sampson, 1988b) y Giampietro (Giampietro, 1992) encontraron que 5% de niños con dermatitis atópica eran alérgicos a soja. Bruno y col (Bruno, 1997), encontraron que sólo



el 1% de un grupo de 505 niños con síntomas sugestivos de alergia alimentaria tenían alergia a soja, haciendo el diagnóstico por desafío, mientras que el prick test arrojaba un resultado del 6%. Magnolfi y col (Magnolfi, 1996) también encontraron una prevalencia del 1% en una cohorte de 700 niños atópicos. Por estos resultados, Bruno y col (Bruno, 1997) llegan a la conclusión de que la alergia a soja no es tan común, como se creía años atrás.

Tabla VII.- Estudios que evalúan la incidencia/prevalencia de alergia a soja, comparada con alergia a leche de vaca

Número de pacientes	Diagnóstico	Alergia a leche de vaca (%)	Alergia a soja (%)	Cita
150	H	NR	36	Gerrard, 1967
59	H	7,5	10	Gerrard, 1973
20	D (leche de vaca) P (soja)	1,9	35	Jakobsson, 1979
68	D	41	1	Minford, 1982
86	IgE	9	6,6	Hattevig, 1984
54	D	85	0	Benincori, 1985
160	D	11	5	Sampson, 1988
21	D (leche de vaca y soja), IgE (soja)	100	9,5	Host, 1990b
74	D	36,3	10,5	Bock, 1996
1314	H, IgE	6,5	1,9	Bergmann, 1994
112	D	NR	0	Kivity, 1994
355	S, IgE, D	14,3	0	Crespo, 1995
507	IgE	14	1,5	Noferi, 1995
710	D	18,9	6	Bock, 1988
	Promedio	24,9	7,1	

H: historia clínica, D: desafío, S: skin prick test, P: reporte de los padres, NR: no reportada.

El único trabajo en el cual se informa la incidencia de alergia a soja en niños alérgicos a leche de vaca es el de Bock y col (Bock, 1990), quienes encontraron que 7% de niños alérgicos a leche bovina tenían síntomas al hacer la prueba de desafío con soja.



En un estudio sobre 92 niños alérgicos a leche bovina, que fueron alimentados con fórmulas a base de proteínas de soja, ninguno de ellos desarrolló alergia a soja durante 1 año de seguimiento (Sampson, 1997b).

Existen algunos estudios en los cuales muestran que fórmulas a base de soja fueron capaces de inhibir la unión de la IgE sérica de pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca. En el estudio de Dean y col (Dean, 1993) encontraron un cierto grado de inhibición de una fórmula a base de soja, que no pudieron explicar. En el estudio de Rugo y col (Rugo, 1992) encontraron que pacientes alérgicos a leche de vaca tenían IgE específica para soja, lo cual podría explicarse por coexistencia de alergia a ambos alimentos. Pero dado que la fórmula a base de soja pudo inhibir la unión de la IgE a leche de vaca mediante RAST de inhibición, proponen como explicación la existencia de reactividad cruzada entre epitopes de proteínas de leche de vaca y de soja. Este mismo resultado encontraron Strobel y col (Strobel, 1989).

Se debe ser cuidadoso al sacar conclusiones a partir de varios estudios donde los procedimientos para realizar el diagnóstico son diferentes. No es posible comparar datos donde el diagnóstico se realizó en base a un desafío doble ciego con datos altamente subjetivos obtenidos a partir del informe de los padres. También se debe tener en cuenta las edades de los pacientes de cada estudio, ya que la prevalencia de alergia cambia notablemente. Aun usando la misma metodología diagnóstica los extractos utilizados, aunque sean del mismo alimento, pueden ser diferentes.

OBJETIVOS



La alergia a leche de vaca es la alergia alimentaria de mayor prevalencia en la primera infancia. Una de las causas es la exposición temprana de proteínas extrañas a la mucosa intestinal aun inmadura de los bebés hasta alrededor de los 4 meses de vida. La lactancia materna puede disminuir la sensibilización alérgica, gracias a reducir la exposición y la absorción intestinal de proteínas alimentarias. En aquellos casos donde la posibilidad de lactancia materna no existe, el principal y único alimento para los bebés consiste en una fórmula maternizada a base de proteínas de leche de vaca. En niños con predisposición genética a atopía, este tipo de alimentación puede provocar el desarrollo de una alergia a las proteínas bovinas. No existe ninguna terapia específica para las alergias alimentarias. El único tratamiento efectivo es eliminar el alimento alergénico de la dieta. Esto implica un problema grave, dado que se le debe quitar de su alimentación el único alimento que se le proporciona en esa etapa de su vida.

Existen en el mercado distintas alternativas de reemplazo de la leche bovina. Uno de los sustitutos más frecuentemente empleados es la leche de soja. Sin embargo, no existe una única fórmula que cumpla con las necesidades de todos los pacientes y asegure la inocuidad total. Por ello, se hace necesario el estudio de cada una de las fórmulas disponibles y el perfil de sensibilización de cada paciente, para lo cual los métodos inmunoenzimáticos proporcionan una herramienta altamente eficaz.

Por lo tanto los objetivos del presente trabajo de tesis son:

- Caracterizar la composición proteica, antigénica y alergénica de diferentes sustitutos lácteos utilizados como dieta de reemplazo para niños con alergia a leche de vaca, mediante métodos inmunoenzimáticos.
- Caracterizar la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y soja.
- Identificar el componente de inmunoreactividad cruzada entre leche de vaca y soja.

MATERIALES Y METODOS



INDICE

▪ Sustitutos lácteos empleados	74
• Leche de distintas especies de mamíferos	74
• Hidrolizados de proteínas de leche de vaca	74
• Leche de soja	75
▪ Soluciones	75
▪ Extractos proteicos	76
• Preparación	76
• Purificación de caseínas	76
• Suero y precipitado de soja	77
▪ Determinación de la concentración de proteínas	77
▪ Suero hiperinmune de conejo anti-leche de vaca	77
▪ Determinación de proteínas antigénicas de leche de vaca mediante	78
ELISA competitivo secuencial	
▪ SDS-PAGE	79
▪ Tricina-SDS-PAGE	79
▪ Inmunoblotting	79
▪ ELISA de inhibición	81
▪ Cromatografía de afinidad	81
▪ Electroforesis bidimensional de proteínas de soja	83
▪ Electroelución de S ₃₀	83
▪ HPLC de fase reversa de S ₃₀	84
▪ Isoelectroenfoque	84
▪ Secuenciación de S ₃₀	85
• Electrotransferencia a membrana de PVDF	85
• Digestión proteolítica in gel y HPLC del extracto peptídico	85
▪ Tricina-SDS-PAGE de S ₃₀ e inmunoblotting	86
▪ Identidad/similitud de secuencia	86

▪ Digestión proteolítica de S ₃₀	87
▪ Obtención de anticuerpos monoclonales	87
• Producción de líquido ascítico	88
• Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales	89
▪ Suero de pacientes alérgicos a leche de vaca	89
▪ Determinación de IgE total	89
▪ Determinación de IgE específica (EAST)	90
▪ Determinación de IgE e IgG específicas para soja por ELISA	91
▪ en suero de pacientes alérgicos a leche de vaca	
▪ Determinación de IgE e IgG específicas por Inmunoblotting	92
▪ Prueba cutánea	92
▪ Alergenicidad de soja y S ₃₀ por métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	92
▪ Ética y consentimiento	93





Sustitutos lácteos empleados

Como sustitutos lácteos se utilizaron para este trabajo:

Leche de distintas especies de mamíferos

- leche de vaca
- leche de oveja
- leche de cabra
- leche de búfalo
- leche de yegua
- leche humana

Como leche de vaca se utilizó leche descremada en polvo comercial (Molico, Nestlé). La leche de las otras especies de mamíferos se obtuvo de distintos criaderos de animales, y la leche humana a partir de un grupo de madres en período de lactancia.

Hidrolizados de proteínas de leche bovina

- NAN HA (Nestlé): hidrolizado parcial de proteínas del suero de leche de vaca
- Beba HA 1 (Nestlé): hidrolizado parcial de proteínas de suero de leche de vaca
- Beba HA 2 (Nestlé): hidrolizado parcial de proteínas de suero de leche de vaca
- Humana HA 1 (Humana): hidrolizado parcial de proteínas de suero de leche de vaca
- KAS 1000 (Kasdorf): hidrolizado parcial de caseína bovina
- Pregestemil (Mead-Johnson, The Netherlands): hidrolizado extensivo de caseína bovina
- Aptamil HA 1 (Milupa): hidrolizado parcial de proteínas de suero y caseína de leche de vaca



Leches de soja

- Nursoy (Wyeth; USA): fórmula a base de proteína de soja hidrolizada
- ADES (Argentina): leche de soja
- ALPRO (Bélgica): leche de soja
- CIDCA: leche de soja producida en el CIDCA a partir de materias primas proporcionadas por Refinerías de Maíz, S.A.
- leche de soja: preparada en el laboratorio a partir de porotos de soja comerciales, así como también a partir de 4 variedades de porotos de soja (INTA): Asgrow 4004, Asgrow 4656, Don Mario 43 y Caminera 32.

Soluciones

- PBS: 0,14M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; pH=7,4.
- TBS: 0,14M NaCl; 2,7mM KCl; 50mM Tris; pH= 8,5.
- Solución para sensibilización (ELISA): buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,1M pH=8.
- Solución de lavado (ELISA, EAST, Inmunoblotting): 0,9 g% NaCl; 0,05% Tween 20.
- Solución de bloqueo y diluyente (ELISA, EAST, Inmunoblotting): 5% de suero de caballo (v/v) en PBS.
- Solución de sustrato para peroxidasa (ELISA): 2 mg/ml o-fenilendiamina (SIGMA), 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ H_2O_2 30 vol en buffer citrato-fosfato pH 5.
- Solución de sustrato para fosfatasa alcalina (ELISA, EAST): 5,5 mM p-nitrofenilfosfato de sodio, 0,5 mM de MgCl_2 en buffer glicina 50 mM pH=10,5 (Wiener).
- Solución de sustrato para peroxidasa (inmunoblotting): 0,5 mg/ml de 4-cloronaftol y 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ H_2O_2 30 vol en una solución de metanol:TBS 1:5.
- Solución de sustrato para fosfatasa alcalina (inmunoblotting): 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio (NBT/BCIP) en buffer pH=9,5 (Sigma).



Extractos proteicos

Preparación

Las leches en polvo (NAN HA, Beba HA 1 y 2, Humana HA 1, KAS 1000, Pregestemil, Aptamil HA 1, Nursoy y Molico) se disolvieron (2,5% p/v) en buffer TBS. Se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos, y los sedimentos se descartaron.

El extracto proteico preparado a partir de la fórmula a base de soja Nursoy se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 12%, debido a su bajo porcentaje de proteínas. Luego de agregar el TCA, se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2500 g durante 20 minutos. El sedimento se resuspendió en NaOH 0,1N, agitándose 3 horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4500 g durante 5 minutos y se descartó el sedimento. De esta manera, la muestra fue concentrada 8 veces.

La leche de soja se preparó disolviendo porotos de soja enteros molidos en 0,14 % p/v NaHCO_3 a 90°C. Se homogeneizó utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX 20000, se enfrió y se centrifugó a 5000 g durante 20 minutos a 20°C.

Las leches de distintas especies de mamíferos fluidas se desgrasaron mediante extracción con cloroformo.

El contenido de lípidos de todos los sustitutos analizados se eliminó mediante extracción con cloroformo, utilizando una relación de extracto a cloroformo de 5:1. Los extractos fueron dializados (membrana de 2 kDa de cutoff) contra agua bidestilada, durante toda una noche a 4°C.

Purificación de caseínas por HPLC

La purificación de monómeros de caseína se realizó mediante cromatografía de fase reversa en un equipo de HPLC (Waters, Millipore), utilizando una columna Sephasil Protein C4 ST 4,6/250, con un tamaño de poro de 5 μm (Amersham Biosciences).

Se disolvió caseína de leche de vaca (Hammerstam) en buffer A (0,1 % ácido trifluoroacético), y se aplicó a la columna. Para la elución se utilizó un gradiente de buffer B (50% acetonitrilo-0,1% ácido trifluoroacético) desde 0 a 100%, durante 60



minutos, a un flujo de 0,8 ml/min. La cromatografía se siguió mediante un detector UV a 280 nm.

Suero y precipitado de soja

El extracto de leche de soja preparado en el laboratorio se llevó a pH=4 con HCl 1N. Las proteínas del suero (sobrenadante) se separaron mediante centrifugación a 3000g durante 20 minutos. El precipitado se lavó 3 veces con HCl y se redisolvió con NaOH 1N, hasta pH= 8. Ambas fracciones se dializaron contra TBS (membrana de 2 kDa de cutoff) durante toda la noche a 4°C, y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó según el método de Lowry (Lowry, 1951) y/o el método del ácido bicinconínico (Pierce), empleando como estándar de calibración seroalbúmina bovina (SIGMA).

Suero hiperinmune de conejo anti-leche de vaca

Cuatro conejos New Zealand se inmunizaron con leche de vaca descremada de origen comercial (Molico, Nestlé), mediante el siguiente protocolo: una primer inmunización empleando 200 µg de proteínas de leche de vaca y Adyuvante de Freund completo (2 ml) por conejo; luego se realizaron cuatro inoculaciones sucesivas con cantidades de proteína decreciente hasta 100 µg en Adyuvante de Freund incompleto. Las inmunizaciones fueron realizadas cada 15-20 días. Previamente a cada inoculación se realizó una sangría parcial para controlar el título de anticuerpos contra leche de vaca. Finalmente se realizó una sangría total, obteniéndose aproximadamente 50 ml de suero de cada conejo. Para determinar el título del antisuero se desarrolló un ELISA indirecto. Se sensibilizó la placa con leche de vaca (1 µg de proteína/ fosa) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 3 lavados. Las fosas se incubaron con 200 µl de solución de bloqueo 2 horas a 37°C. Luego se incubaron con diluciones seriadas del antisuero



durante 1 hora a 37°C. Con posterioridad al lavado, se reveló la presencia de anticuerpos con un antisuero anti-inmunoglobulinas (Ig) de conejo conjugado a peroxidasa (BIO RAD) 1/3000, incubando 1 hora a 37°C. Se agregó 100 µl de sustrato para peroxidasa y luego de 10 minutos la reacción se detuvo agregando 50 µl de H₂SO₄ 4N. Se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos, hasta que se realizó la sangría total aproximadamente a los 3 meses. El pool de sueros fue almacenado a - 20°C hasta su empleo.

Determinación de proteínas antigénicas de leche de vaca mediante ELISA secuencial de inhibición

Para la cuantificación de proteínas antigénicas de leche de vaca se desarrolló un ELISA secuencial de inhibición, empleando el suero hiperinmune anti-leche de vaca obtenido en conejo.

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) agregando 100 µl (1 µg de prot/ fosa) del extracto de leche de vaca, e incubando toda la noche a 4°C. Luego de lavar las fosas con solución de lavado, se incubó con 200 µl de solución de bloqueo.

Paralelamente se realizó la preincubación de volúmenes iguales del antisuero diluido 1/130000 con diluciones del estándar o muestra a cuantificar durante 60 minutos a 37°C. Cada muestra y estándar se analizó por triplicado. El estándar es una solución de leche de vaca Molico, cuya concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Lowry.

Cien µl de la mezcla de preincubación se incubaron en cada fosa sensibilizada durante 60 minutos a 37°C. Se lavó con solución de lavado. Se incubó con 100 µl del antisuero anti-Ig de conejo conjugado a peroxidasa 1/3000 (BIO RAD) durante 60 minutos a 37°C. Para el desarrollo de color se agregó solución de sustrato para peroxidasa. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 4N y se midió la densidad óptica a 490 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos con las diluciones del estándar y las muestras se transformaron en función logit (Tijssen, 1985). Los valores obtenidos con las diluciones del estándar se utilizaron para obtener la curva patrón, la cual se construyó graficando el valor logit en función de la concentración de proteínas del estándar. Para



las muestras analizadas en forma paralela se obtuvo la concentración de proteínas antigénicas interpolando la curva patrón. Cada muestra se analizó a distintas diluciones de manera de poder utilizar la región más apropiada de la curva para obtener el resultado. El resultado se expresa como mg/ml de proteína en el extracto.

SDS-PAGE

La composición proteica de los extractos se analizó separando las proteínas por SDS-PAGE (Mini Protean III (BIO RAD)) con un sistema discontinuo según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). Se emplearon geles de poliacrilamida 14%. Se sembró entre 5 y 20 μg de proteína por calle. Las electroforesis se realizaron a 25 mA durante 20 minutos para el gel de apilamiento y a 50 mA durante 50 minutos para el gel de resolución. Los geles fueron fijados y coloreados con Coomassie brilliant blue R-250 o tinción de plata.

Los PM de las proteínas presentes en las muestras se obtuvieron a partir de una curva patrón, para la cual se utilizaron los siguientes polipéptidos de PM conocido (Bio Rad): α -lactoalbúmina (14,2 kDa); Lisozima (20,1 kDa); Anhidrasa carbónica (30 kDa); Ovalbúmina (43 kDa), BSA (67 kDa); Fosforilasa (94 kDa). La curva patrón se obtuvo graficando distancia en cm recorrida por el polipéptido/ distancia total versus PM.

Tricina-SDS-PAGE

Para separar componentes de PM menor a 20 kDa, se empleó el método desarrollado por Schagger y von Jagow (Schagger, 1987), que permite la resolución de proteínas en el rango de 1 a 100 kDa. Para este sistema discontinuo se utilizó poliacrilamida 4% para el gel de apilamiento y poliacrilamida 16% para el de resolución. Se sembró entre 5 y 20 μg por calle. Las corridas se realizaron a 30 V durante 1 hora para el gel de apilamiento y a 90 V durante 4 horas para el gel de resolución. Los geles fueron fijados en una solución de 50% metanol-10% ácido acético, durante 30 minutos. La coloración se realizó con Coomassie brilliant blue R-250 en 10% ácido acético o plata. Los patrones de bajo PM utilizados son los siguientes (Sigma): Bradiquinina (1,06 kDa);



Cadena B de insulina bovina (3,496 kDa); Aprotinina de pulmón bovino (6,5 kDa); α -lactoalbúmina (14,2 kDa); Mioglobina (17 kDa); Triosafosfato isomerasa (26,6 kDa).

Inmunoblotting

Las proteínas separadas por medio de electroforesis fueron electrotransferidas (Tsang, 1983) a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 nm (SMI), durante 45 minutos a 300 mA. Como buffer de transferencia se utilizó 0,025 M Tris, 0,2 M glicina, en metanol: agua 1:5, pH=8,3. La eficiencia de la transferencia de proteínas fue corroborada mediante tinción reversible de proteínas con Ponceau S. Posteriormente las membranas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con solución de bloqueo. Las membranas fueron reveladas con distintos anticuerpos, según el caso:

- Suero de conejo anti-leche de vaca diluido 1/1000 en solución de bloqueo, toda la noche a 4°C
- Anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-caseína bovina desarrollados previamente en el laboratorio, toda la noche a 4°C. Los AcMo utilizados fueron: 1D5-I, 2A1-I y 3B5-I, que reconocen principalmente α -caseína, β -caseína y κ -caseína, respectivamente. Se utilizó el sobrenadante de cultivo de los hibridomas productores de los mismos, sin diluir.
- Suero de pacientes alérgicos a leche de vaca diluido 1/5, toda la noche a temperatura ambiente (la selección de estos sueros se describe más adelante).

Se lavó con solución de lavado y la presencia de anticuerpos específicos unidos al antígeno inmovilizado se reveló de la siguiente forma:

- Suero de cabra anti-Ig de conejo conjugado a peroxidasa (BIO RAD) diluido 1/1000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C o un sistema de amplificación que consiste en una primera incubación con un anticuerpo monoclonal anti-Ig de conejo biotinilado (Sigma) diluido 1/2000, y luego con Streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina o peroxidasa (PIERCE) diluido 1/1000 durante 1 hora a 37°C.
- Suero de conejo anti-Ig de ratón conjugado a peroxidasa (BIO RAD) diluido 1/1000 en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.

- Anticuerpo monoclonal anti-IgE humana (específico de cadena ϵ) conjugado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology) diluido 1/1000 en solución de bloqueo durante 12 horas a temperatura ambiente.

El revelado de las membranas se realizó empleando las soluciones de sustrato para inmunoblotting.

ELISA de inhibición

Se desarrolló un ELISA competitivo secuencial, similar al ELISA de cuantificación, para detectar la presencia de reactividad cruzada entre soja y leche de vaca. Para ello, se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) agregando 100 μ l de leche de vaca (1 μ g de prot/ fosa) o de soja (10 μ g de prot/ fosa), e incubando toda la noche a 4°C. Luego del lavado, se incubó con solución de bloqueo durante 2 horas a 37°C. Paralelamente se realizó la preincubación de volúmenes iguales del antisuero de conejo anti-leche de vaca (dilución 1/300.000 para la sensibilización con leche de vaca y 1/1000 para la de soja) con diluciones de los extractos homólogos o inhibidor, durante 60 minutos a 37°C. La dilución del antisuero utilizada corresponde al título determinado para cada uno de los extractos. El título se define como aquella dilución que produce una DO igual al 50% de la DO máxima.

Cien μ l de la mezcla de preincubación se incubaron en cada fosa sensibilizada con proteínas de leche de vaca o soja durante 60 minutos a 37°C. Luego, se continuó como en el ensayo de cuantificación.

Se graficó el % de inhibición versus la concentración de inhibidor. La inhibición se calculó como $(A_m - A_x)/A_m$, siendo A_m la absorbancia máxima sin inhibidor y A_x la absorbancia de la muestra utilizada como competidor.

Cromatografía de afinidad

Se desarrolló una cromatografía de afinidad con el fin de purificar los anticuerpos específicos de proteínas de soja del suero de conejo anti-leche de vaca.



-Acoplamiento

Medio gramo de CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) se lavó 4 veces con HCl 1 mM frío, centrifugando durante 3 minutos a 3000 g. Se realizó un lavado final con buffer de acoplamiento (0,1M NaHCO₃; 0,5M NaCl, pH=8,3). Se agregó 0,5 ml de leche de soja preparada en el laboratorio (concentración de proteína=17mg/ml) y 0,5 ml de buffer de acoplamiento. Se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas no acopladas se eliminaron realizando lavados con buffer 0,05M fosfato de sodio; 1M NaCl, pH=7,5. La eficiencia del lavado se siguió midiendo la absorbancia a 280nm.

-Bloqueo

Se agregó 2,5 ml de 100mM etanolamina en buffer 0,5M fosfato de sodio pH=7,5. Se incubó 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó con 20 volúmenes de PBS.

-Incubación con el antisuero

Se agregó 1 ml de una dilución 1/100 del antisuero de conejo anti-leche de vaca (llamado suero pre-cromatografía). Se incubó 2 horas a temperatura ambiente. La solución conteniendo los anticuerpos no retenidos (llamado suero post-cromatografía) se analizó por ELISA indirecto para analizar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos de proteínas de soja. Los anticuerpos no retenidos se lavaron con PBS.

La unión de los anticuerpos del suero de conejo a la Sepharosa se verificó por ELISA indirecto sensibilizando con leche de vaca o soja. Luego se incubó con el antisuero pre o post-cromatografía, durante toda la noche a 4°C. La presencia de anticuerpos se reveló como se indicó anteriormente.

Los pasos de acoplamiento, lavado e incubación con el antisuero se realizaron en batch. La elución de los anticuerpos retenidos se realizó en columna.

-Elución

Para la elución de los anticuerpos retenidos, se agregó 8 ml de dietilamina pH=11. Se recolectaron fracciones de 2 ml sobre tubos que contenían 1 ml de PBS. El eluato conteniendo los anticuerpos específicos se dializó contra PBS, durante toda la noche a 4°C. Dicho eluato se utilizó en ensayos de ELISA indirecto e inmunoblotting.



Por ELISA indirecto se determinó la especificidad de los anticuerpos para leche de vaca, caseína, α -caseína (purificada por HPLC), β -caseína (purificada por HPLC), β -lactoglobulina (comercial) y BSA (comercial). Membranas de nitrocelulosa conteniendo proteínas de leche de vaca o soja se incubaron con el eluato, durante toda la noche a 4°C. La presencia de anticuerpos de conejo se reveló como se indicó anteriormente.

Electroforesis bidimensional de proteínas de soja

Se realizó una electroforesis en dos dimensiones (Utsumi y col, 1984), la primera en condiciones desnaturizantes y la segunda en condiciones desnaturizantes y reductoras de puentes disulfuro. La primera dimensión, se realizó de la manera explicada en SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida 14%. Se sembró 17,5 μ g del extracto de leche de soja. Las calles se cortaron y guardaron en glicerol 10 % v/v a -20°C hasta su uso. Antes de la segunda dimensión, se realizó un tratamiento reductor a cada calle. Para ello, se sumergieron las calles en buffer Tris-HCl 62,5 mM, SDS 1 % p/v, sacarosa 20 % p/v, 2-mercaptoetanol 0,2M, pH=6,8, durante 30 minutos a 55°C. Para la segunda dimensión, se emplearon geles de poliacrilamida 14%, en cuya parte superior se colocó la calle pretratada. Las corridas se realizaron a 40 mA. La coloración de los geles se realizó con plata.

Electroelución

Se realizó una electroforesis empleando geles preparativos (Hoeffler) de poliacrilamida 14%. Se sembró 6 mg de proteína de soja por gel. Las corridas se realizaron a 70 mA durante 5 horas. Paralelamente se corrió un estándar de PM conocido para identificar la zona de interés a electroeluir. Una vez terminada la corrida, se cortó la zona del gel que contenía la banda correspondiente a un peso molecular de 30 kDa. Se realizó la electroelución de las proteínas contenidas en dichas porciones de gel, durante 5 horas a 10 mA por tubo, usando como buffer de electroelución: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 % p/v. Se dializó contra agua bidestilada. La proteína electroeluida se analizó mediante ELISA de inhibición de la unión del suero de conejo,



SDS-PAGE, inmunoblotting, isoelectroenfoque y se confirmó su pureza mediante HPLC. La proteína aislada por este método la denominamos S₃₀.

HPLC de fase reversa de S₃₀

Para analizar la pureza del extracto de S₃₀ obtenido por electroelución se realizó una cromatografía HPLC de fase reversa, para lo cual se utilizó una columna C₁₈ (Amersham Biosciences) en un equipo de HPLC (Waters, Millipore). La columna fue equilibrada con una solución de acetonitrilo:agua:TFA 20:80:0,1%. Se sembró una alícuota de 100 µl de la proteína aislada por electroelución conteniendo 2 µg de proteína, y se eliminó el material no retenido pasando 15 ml de la misma solución. El material retenido fue eluido usando 130 ml de un gradiente lineal de acetonitrilo (20-60%) y luego 30 ml de acetonitrilo 60%. El pico eluido se colectó y analizó por SDS-PAGE.

Isoelectroenfoque

Se empleó una celda horizontal de isoelectroenfoque (Model 111 Mini IEF Cell, Bio-Rad) y se preparó un gel de poliacrilamida cuya composición fue: 1 ml de glicerol 25% p/v, 1 ml de la mezcla acrilamida 24,25% p/v, bis-acrilamida 0,75% p/v, 0,25 ml de una mezcla de anfolitos (rango de pH: 3-10), 2,75 ml de agua bidestilada, 1,5 µl de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 30 µl de (NH₄)₂S₂O₈ 100 mg/ml. La mezcla se desgasificó durante 10 minutos antes del agregado del (NH₄)₂S₂O₈ y el TEMED.

La corrida se llevó a cabo manteniendo el voltaje constante inicialmente a 100 V durante 20 minutos, luego a 200 V durante 20 minutos y finalmente 450 V durante 80 minutos. Los patrones de pI conocido se colorearon con Coomassie Blue R250 y los componentes proteicos de las muestras se identificaron mediante tinción con plata. Para el inmunoblotting, los componentes separados se transfirieron por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa, y el revelado se realizó según se indicó anteriormente.



Secuenciación de S₃₀

Para la secuenciación de S₃₀ se ensayaron 2 métodos:

Electrotransferencia a membrana de PVDF

Se realizó un SDS-PAGE del extracto de S₃₀ y luego se electrotransfirió, durante 45 minutos a 300 mA a membrana de PVDF (Immobilon P) (Matsudaira, 1987), previamente activada por inmersión en metanol durante 10 segundos. El buffer de electrotransferencia fue CAPS 10mM en metanol 10%, pH=11,0. Luego se tiñó la membrana con 0,1% Coomassie blue en metanol 50% durante 5 minutos y se decoloró con metanol:ácido acético:agua 5:1:4 v/v. Se cortó la banda de interés, se secó y se guardó a -20°C hasta su uso.

Digestión proteolítica “in gel” y HPLC del extracto peptídico

La digestión “in gel” para posterior secuenciación se realizó de acuerdo al método de Rosenfeld mejorado por Hellman (Rosenfeld, 1992; Hellman, 1995). Se realizó un SDS-PAGE, sembrando 10 µg/calle de S₃₀. El gel se coloreó con 0,1% Coomassie blue R-250 - 20% metanol - 0,5% ácido acético y luego se decoloró con 30% metanol. Las bandas de interés se cortaron y se lavaron con 500 µl de buffer bicarbonato de amonio 100 mM pH=8 durante 1 hora. Los puentes disulfuro se redujeron agregando 150 µl de buffer bicarbonato de amonio y 10 µl de 45 mM ditioneitol. Se incubó a 60°C durante 30 minutos. Se alquilaron los grupos sulfhidrilo resultantes agregando 10 µl de 100mM de iodoacetamida. Se dejó en incubación 30 minutos en la oscuridad. Se descartó el solvente y se lavó con 500 µl de 50% acetonitrilo- 50% de buffer bicarbonato de amonio durante una hora. Se agregó 50 µl de acetonitrilo, y luego de 15 minutos se removió el solvente y se secaron completamente en un evaporador rotatorio (Speed Vac). Se agregó 0,2 µg de tripsina (Sigma) en 10 µl de 25mM bicarbonato de amonio. Luego se agregó 50 µl de buffer adicional para cubrir totalmente el gel. La digestión se realizó a 37°C durante toda la noche. El sobrenadante se colectó en un vial, junto con los

péptidos del gel que se extrajeron 2 veces con 50 μ l de 60% acetonitrilo-0,1% TFA. Se concentró en Speed Vac hasta 25 μ l.

La separación de los péptidos obtenidos por digestión "in gel" se realizó mediante HPLC de fase reversa. Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ de 220mm de largo x 2,1 mm de diámetro (Vydac V₁) en un equipo de HPLC. La columna fue equilibrada con una solución de 0,1% TFA. Se sembró el extracto proveniente de la digestión "in gel". Se eliminó el material no retenido pasando 5 ml de la misma solución. El material retenido fue eluido usando 90 ml de un gradiente lineal de acetonitrilo desde 0% hasta 50% y luego 30 ml de 50 a 100%. Los picos se colectaron y 2 de ellos se secuenciaron (los de mayor DO a 210 nm).

La secuenciación se realizó mediante el método de Edman, en el Lanais-Pro (CONICET-Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires).

Tricina-SDS-PAGE de S₃₀ e inmunoblotting

Se sembró 2 μ g de S₃₀ con o sin 2-mercaptoetanol. La corrida se realizó según se indicó anteriormente. La tinción se realizó con plata. Las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa y se revelaron con el antisuero de conejo y los AcMo anti-caseína. El revelado se realizó según se indicó previamente.

Identidad/similitud de secuencia

Se analizó la similitud de secuencia entre la proteína de soja que cruza con leche de vaca (glicinina B3) con distintas proteínas de leche de vaca. De este modo se intentó detectar posibles epitopes secuenciales similares entre las proteínas de ambos orígenes. Para tal fin, se utilizó un programa de computadora Bestfit, que busca el mejor alineamiento entre partes de dos secuencias, por más pequeñas que sean. Se comparó la secuencia de la glicinina B3 con las proteínas mayoritarias de leche de vaca: las 3 caseínas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. El programa da como resultado el porcentaje de identidad (n° de aminoácidos iguales) y el porcentaje de similitud (n° de



aminoácidos similares en cuanto a su composición química) entre las proteínas comparadas.

Digestión proteolítica de S₃₀ en solución

Para la hidrólisis de S₃₀ en solución se disolvieron 0,62 mg de S₃₀ en PBS. Se trató con ditioneitol y iodoacetamida, de modo de reducir los puentes disulfuro y complejar los grupos sulfhidrilo resultantes. Se dializó contra el buffer adecuado (según sea la enzima comercial a utilizar) usando una membrana de diálisis de cut-off= 2000. Para la hidrólisis con AspN (Sigma) se dializó contra buffer bicarbonato 50 mM pH=8, y se agregó 0,4 µg de proteasa, para la de LysC (Sigma) se dializó contra buffer Tris/HCl 50 mM pH=9,2 y se agregó 2 µg de proteasa y para la de tripsina (Sigma) se dializó contra buffer bicarbonato 50 mM pH=8, y se agregó 10 µg de proteasa.

La separación de péptidos se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 30 en un equipo de FPLC (Amersham Biosciences). Para la elución se utilizó buffer fosfato 0,1M pH=7, a un flujo de 0,8 ml/min. Los cromatogramas se obtuvieron mediante un detector de luz UV a 280 nm.

Se colectaron fracciones de 1,1 ml, las cuales fueron analizadas mediante ELISA indirecto. Para lo cual se sensibilizaron fosas agregando 100 µl de cada fracción, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego del bloqueo, se agregó suero de conejo anti-leche de vaca diluido 1/1000, y se incubó durante toda la noche a 4°C. La presencia de anticuerpos específicos se reveló como se indicó anteriormente.

Obtención de anticuerpos monoclonales

Se inmunizaron 4 ratones BALB/c de 7 semanas de edad con S₃₀. Se siguió el siguiente protocolo de inmunización: una primer inmunización intraperitoneal empleando Adyuvante de Freund Completo y 20 µg de proteína/ 0.2 ml PBS/ ratón; luego se realizaron cuatro inoculaciones sucesivas con Adyuvante de Freund Incompleto y cantidades de proteína decreciente hasta 10 µg. El período de tiempo entre cada una de ellas fue de 15 días aproximadamente. Siete días luego de cada inoculación se



realizaron sangrías parciales por el plexo retroorbital para obtener el título de anticuerpos específicos contra el inmunógeno empleado.

El ratón con mayor título de anticuerpos específicos fue sacrificado y se extrajeron células de bazo para la fusión siguiendo la técnica de Galfré y Milstein (1981). Para la hibridación de células somáticas se empleó una línea celular mielomatosa (NSO) proveniente de ratones BALB/c, no productora de anticuerpos y deficiente en el gen que codifica la enzima de la vía de reutilización de bases púricas: hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Las células de bazo ($100 \cdot 10^6$ células) y las células NSO ($50 \cdot 10^6$ células) se fusionaron en presencia de polietilenglicol siguiendo el protocolo establecido.

Se crecieron las células en medio de cultivo selectivo: RPMI 1640 en presencia de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) y suero fetal bovino 20 %, a 37°C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Luego de 10-15 días de crecimiento se realizó el screening de los hibridomas de cada fosa por ELISA indirecto para identificar aquellos que son secretores de anticuerpos específicos. Los hibridomas cuyos sobrenadantes de cultivo mostraron valores positivos, respecto a los controles empleados, fueron expandidos y crecidos. Para determinar la especificidad de los anticuerpos secretados se analizaron los sobrenadantes por Elisa indirecto, inmunoblotting y dot-blot.

Los hibridomas positivos cuyas especificidades fueron las de interés se clonaron por dilución límite y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su empleo. Posteriormente, se inocularon en ratones BALB/c para obtener líquido ascítico y a partir del mismo se aislaron y purificaron los anticuerpos monoclonales.

Producción de líquido ascítico

Para obtener anticuerpos monoclonales en mayor cantidad se crecieron hibridomas en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c. Para ello se inocularon ratones con 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Pristane) para inducir la formación de líquido ascítico. Los hibridomas previamente descongelados y crecidos se inocularon por vía intraperitoneal a razón de $2 \cdot 10^6$ células/ ratón y luego de 15-20 días se extrajo el líquido ascítico por punción peritoneal. De cada líquido ascítico se aislaron los anticuerpos monoclonales por precipitación isoelectrica con SO₄(NH₄)₂ al 50 % con agitación lenta a

4 °C. Se centrifugó a 5500 g durante 30 minutos y el sedimento se lavó con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50 %. Luego de centrifugar se resuspendió el precipitado con agua bidestilada (0.5 volumen inicial).

Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales

Mediante la aplicación de un ELISA de captura se determinó el isotipo de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales purificados.

Se sensibilizaron fosas con 1 μg proteína/ fosa de los antisueros anti-isotipo (μ , $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) obtenidos en cabra (The Binding Site) y luego se incubó con solución de bloqueo. Luego se agregó el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma de interés, y se incubó durante toda la noche a 4°C. La presencia de anticuerpos se reveló empleando suero de conejo anti-Ig de ratón (cadena γ) conjugado a HRP 1/3000 (BIO RAD). Se agregó la solución de sustrato, y luego de detener la reacción con SO_4H_2 4N se leyó DO a 490 nm.

Suero de pacientes alérgicos a leche de vaca

Los pacientes alérgicos a leche de vaca, de los cuales se utilizó el suero, se seleccionaron en base a la presencia de antecedentes personales y familiares, examen físico, signos clínicos asociados a la ingesta de alimentos lácteos (dermatitis, rinitis, trastornos digestivos luego de la ingesta del alimento, etc), IgE total elevada para la edad y presencia de IgE específica para leche de vaca, determinada por EAST. De esta manera se obtuvieron 50 sueros individuales. Como control negativo se utilizó suero de 50 individuos sanos (sin historia compatible con alergia a leche de vaca e IgE total normal para la edad). Como control positivo se empleó un pool de los sueros de los pacientes atópicos a leche de vaca. Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

Determinación de IgE total

Para la determinación de la IgE total sérica se desarrolló un ELISA de captura empleando discos de papel de filtro (Whatman) que se activaron con BrCN. Para esto, se

sumergieron 20 gramos de discos de papel de 5mm de diámetro en una solución de 20 gramos de BrCN en 500 ml de agua destilada. Se llevó a pH=10,5 con NaOH 1M. Por último se realizaron lavados sucesivos con: 0,005M de NaHCO₃, agua destilada, acetona 25%, acetona 50%, acetona 75% y acetona 100%. Los discos de papel se secaron a temperatura ambiente, y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

A los discos de papel se les acopló un anticuerpo anti-IgE humana policlonal (SIGMA). Luego de bloquear y lavar se incubaron las muestras (suero diluido 1/10 en solución de bloqueo) o el estándar de referencia, durante 12 horas a temperatura ambiente. El revelado se efectuó con un anticuerpo anti-IgE monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology). Se agregó la solución de sustrato para fosfatasa alcalina. Se detuvo la reacción con NaOH 20 mM y se midió absorbancia a 405 nm.

La curva de calibración se realizó empleando un estándar comercial de IgE (Behring) chequeada contra un estándar internacional de IgE (Immunoglobulin E Reference Preparation 69/204).

Determinación de IgE específica (EAST)

Para la determinación semicuantitativa de IgE específica en el suero de los pacientes se emplearon los discos de papel activados con CNBr (ver arriba), los cuales se sensibilizaron con los diferentes extractos proteicos conteniendo 1 mg/ml de proteína en buffer 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 8.5 según el método de Ceska (Ceska,1981). Luego de la incubación durante toda la noche a temperatura ambiente, se lavó con el buffer carbonato y se bloquearon con una solución 0,05 M de etanolamina en el mismo buffer, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubó cada disco con 50 µl de suero sin diluir durante 12 horas a temperatura ambiente. La IgE específica se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana (específico de cadena ε) conjugado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology) diluido 1/3000 en solución de bloqueo por incubación durante 12 horas a temperatura ambiente. Se agregó la solución de sustrato para fosfatasa alcalina. Se detuvo la reacción con NaOH 20 mM y se midió absorbancia a 405 nm.



La cuantificación de la IgE específica se realizó construyendo una curva de referencia con un pool de sueros provenientes de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssimus*, por tratarse del alérgeno más frecuente en nuestro medio (Lundkvist, 1975), con IgE total elevada para la edad, IgE específica e intradermoreacción con un extracto del ácaro positiva. Al pool de sueros se le determinó la IgE total, se diluyó a 50 U/ml, y se prepararon 4 diluciones para construir la curva de referencia: 1:1, 1:5, 1:25 y 1:50. Se emplearon papeles sensibilizados con un extracto proteico preparado a partir de estos ácaros. Este extracto fue previamente comparado con un extracto estandarizado internacional (NIBSC), mediante cuantificación de proteínas totales, electroforesis, inmunoblotting y EAST de inhibición, de modo de lograr una composición similar.

Las muestras con una DO menor a la de la dilución 1:50 se clasifican como clase 0, y se considera negativa. Las muestras con DO entre la de las diluciones 1:50 y 1:25 como clase 1; entre la de 1:25 y 1:5 como clase 2; entre 1:5 y 1:1 como clase 3 y mayor a la DO de la dilución 1:1 como clase 4.

Determinación de IgE e IgG específicas para proteínas de soja por ELISA en suero de pacientes alérgicos a leche de vaca

Se realizaron ensayos para detectar y cuantificar la presencia de IgG e IgE específica para leche de vaca y soja en suero de pacientes alérgicos a leche de vaca. Para ello, se sensibilizaron placas con 1 µg de proteína/ fosa de los extractos de leche de vaca o soja. Se incubó con solución de bloqueo. Se agregó 50 µl de cada suero en fosas sensibilizadas con cada uno de los extractos. Para la determinación de IgG se utilizó una dilución del suero 1/50, mientras que para IgE no se diluyó. Se incubó durante 60 minutos a 37°C para el caso de IgG y 20 horas a temperatura ambiente para IgE. Se incubó con los antisueros anti-IgG humana 1/2000 o anti-IgE humana monoclonal 1/3000, ambos conjugados a fosfatasa alcalina durante 2 horas a 37°C y se midió la actividad de la enzima usando solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La reacción se detuvo con NaOH 20mM y se midió la DO a 405 nm. Como control se utilizó suero de pacientes no alérgicos.



Determinación de IgE e IgG específicas por Inmunoblotting

Tiras de nitrocelulosa conteniendo las proteínas de leche de vaca o soja se revelaron con el pool de sueros de pacientes alérgicos a leche de vaca y con suero de pacientes individuales. Como control negativo se utilizaron sueros de pacientes individuales y un pool de sueros con IgE normal para la edad. Para la detección de IgG se incubó cada suero diluido 1/5, 2 horas a 37°C, mientras que para IgE (suero sin diluir) se incubó 20 horas a temperatura ambiente. El revelado se realizó según se indicó anteriormente.

Prueba cutánea (Prick test)

Las pruebas cutáneas fueron realizadas por los médicos especialistas del Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata, mediante la técnica de prick test sobre la cara anterior del antebrazo empleando lancetas de metal, utilizando extractos preparados en el laboratorio.

Se prepararon extractos alérgicos acuosos en agua libre de pirógenos, a una concentración proteica de 1mg/ml en buffer fosfato pH=7,4. Se les adicionó glicerina (50 % v/v) y se filtraron empleando membranas de 0,1 μ de tamaño de poro. Se conservaron a 4°C hasta su utilización. Se emplearon como controles solución fisiológica e histamina (10 mg/ml). El resultado se leyó a los 15-20 min y se registró el diámetro mayor y el perpendicular, del halo y de la roncha producidas. La prueba se consideró positiva cuando el tamaño de la roncha fue mayor que la del control negativo y al menos la mitad del de la histamina. Esta prueba fue realizada sólo en pacientes mayores a 3 años sin antecedentes de anafilaxia.

Alergenicidad de soja y S₃₀ por métodos *in vivo* e *in vitro*

Se seleccionaron pacientes que concurrieron al Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata, con historia compatible con alergia a leche de vaca, de acuerdo a síntomas luego de la exposición a dicho alimento y su desaparición al eliminarla de la dieta. La prueba de reto o desafío alimentario no se realiza en este



medio. Dichos pacientes tenían IgE total elevada de acuerdo a la edad e IgE específica para leche de vaca. Se seleccionaron pacientes controles sin IgE total elevada o con IgE total elevada pero no alérgicos a leche de vaca. La edad media de los pacientes fue de 7,1 años (de 8 meses a 13 años) y la de los controles 6,8 años (de 1 a 14 años). A cada paciente se le realizó un cuestionario (ver ficha), donde constan antecedentes familiares de alergia, antecedentes personales, tipo de reacción alérgica, dieta del paciente, en particular si consumió leche de vaca y leche de soja y aparición o no de síntomas luego de la ingesta de esos alimentos, dieta de la madre en el caso de que el paciente haya recibido lactancia materna.

Como prueba *in vivo* se realizó prueba cutánea. Como pruebas *in vitro* se determinó en suero IgE total por EAST, IgE específica para leche de vaca, soja y S₃₀ por ELISA e IgG específica para los mismos 3 extractos por ELISA.

Etica y consentimiento

Todos los análisis realizados en pacientes fueron aprobados por el Comité de Etica del Hospital San Juan de Dios de La Plata y se realizaron con previo consentimiento del paciente o familiar.

La ficha de historia clínica se muestra a continuación:



Ficha del estudio de reactividad cruzada entre leche de vaca y soja

Reactividad cruzada soja-leche de vaca- PROTOCOLO DE TRABAJO

Número:..... HC nro:.....
 Nombre:..... Edad:..... Fecha:.....
 Dirección:..... Teléfono:..... Servicio:.....

Antecedentes familiares

Asma.....
 Rinitis
 Urticaria.....
 Dermatitis de contacto
 Dermatitis atópica.....
 Alergia a alimentos.....
 (asma, rinitis, urticaria, dermatitis, angioedema, anafilaxis)

Antecedentes personales

Asma.....
 Rinitis.....
 Urticaria.....
 Dermatitis de contacto.....
 Dermatitis atópica.....
 Alergia a alimentos.....

Dieta del paciente

Toma leche de vaca:..... Alergia:..... Desde cuando?.....
 Toma leche de soja:..... Alergia:..... Desde cuando?.....
 Toma otro sustituto lácteo:.....Cuál: Desde cuando?.....
 Período de lactancia:.....

Dieta de la madre

Toma leche de vaca:..... Alergia:.....
 Toma leche de soja:..... Alergia:.....

Testificación cutánea

	Roncha (mm)	Halo (mm)
Leche de vaca.....		
Leche de soja.....		
Leche de oveja.....		
Dermatophagoides.....		
Histamina.....		
Control negativo.....		

Pruebas de laboratorio

1) IgE total.....
 IgE específicas:leche de vaca:.....
 leche de soja:.....
 leche de oveja:.....
 Otras:

Immunoblotting IgE.....

2) IgG específicas: leche de vaca:.....
 leche de soja:.....
 leche de oveja:.....
 Otras:

Immunoblotting IgG.....

RESULTADOS Y DISCUSION



I.- CARACTERIZACION DE LECHE DE DISTINTAS ESPECIES DE MAMÍFEROS	98
I.1- Caracterización proteica y antigénica	98
I.1.a- ELISA de cuantificación de proteínas antigénicas de leche de vaca	98
I.1.b- Cuantificación de proteínas totales (Lowry) y proteínas antigénicas de leche de vaca por ELISA	99
I.1.c- Caracterización proteica por electroforesis Tricina-SDS-PAGE	100
I.1.d- Antigenicidad determinada por Inmunoblotting con suero policlonal y Mabs	101
I.2- Caracterización de la alergenicidad <i>in vitro</i>	103
I.2.a- EAST	103
I.2.b- IgE Inmunoblotting	104
I.3- Discusión	105
II.- CARACTERIZACIÓN DE HIDROLIZADOS COMERCIALES DE PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA	108
II.1- Caracterización proteica y antigénica	108
II.1.a- Cuantificación de proteínas totales (Lowry) y proteínas antigénicas de leche de vaca por ELISA	108
II.1.b- Caracterización proteica por electroforesis Tricina-SDS-PAGE	109
II.1.c- Antigenicidad determinada por Inmunoblotting con suero policlonal y Mabs	110
II.2- Caracterización de la alergenicidad <i>in vitro</i>	112
II.2.a- EAST	112
II.2.b- IgE Inmunoblotting	113

II.3- Discusión	114
III.- CARACTERIZACION DE FORMULAS A BASE DE PROTEINAS DE SOJA	118
III.1- Detección de reactividad cruzada entre proteínas de soja y leche de vaca	118
III.2- Caracterización de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y soja	119
III.2.a- ELISA de inhibición	119
III.2.b- Cromatografía de afinidad	121
III.2.c- Electroforesis SDS-PAGE e Inmunoblotting	123
III.2.d- Electroforesis bidimensional	126
III.3- Identificación de S ₃₀	127
III.3.a- Purificación de S ₃₀	127
III.3.b- Secuenciación de S ₃₀	129
III.3.c- Búsqueda de identidad/similitud de secuencia	132
III.3.d- Digestión proteolítica de S ₃₀	135
III.4- Producción de anticuerpos monoclonales anti S ₃₀	143
III.5- Caracterización alérgica de proteínas de soja en pacientes alérgicos a leche de vaca	144
III.5.a- EAST	144
III.5.b- ELISA	145
III.5.c- Inmunoblotting	146
III.5.d- Alergenicidad de soja y S ₃₀ por métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	147
III.6- Discusión	150

I.-CARACTERIZACIÓN DE LECHE DE DISTINTAS ESPECIES DE MAMÍFEROS

Se caracterizaron extractos proteicos obtenidos a partir de leche de distintas especies: vaca, oveja, cabra, yegua, búfalo y humana. Se analizó el contenido proteico, antigénico y alergénico.

I.1-Caracterización proteica y antigénica

I.1.a-ELISA para la cuantificación de proteínas antigénicas de leche de vaca

Para el desarrollo de este método se ensayaron distintas diluciones del antisuero de conejo específico de proteínas de leche de vaca, desde 1/100000 hasta 1/200000. También se realizaron preincubaciones del antígeno soluble y la dilución del antisuero a distintos tiempos, obteniéndose la mayor detectabilidad con una dilución del antisuero de 1/130000 y 60 minutos de preincubación. El límite de detección estadístico ($t_{\text{Student}} = 0,01$) es de 15 ng/ml. El rango de medida en el cual la curva se adapta a un comportamiento lineal está comprendido entre 100 ng/ml y 0,1 mg/ml. En la figura 1 se muestra la curva patrón obtenida con este ensayo, la cual se empleó para obtener la concentración de proteínas antigénicas de las muestras analizadas.

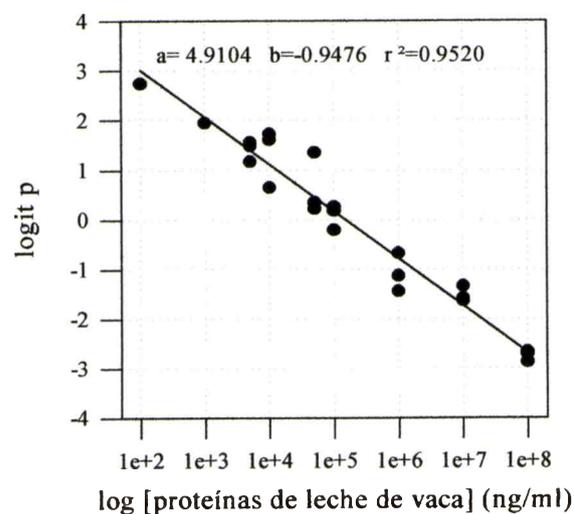


Figura 1: Curva patrón para la determinación de proteínas antigénicas por ELISA.



I.1.b-Cuantificación de proteínas totales (Lowry) y proteínas antigénicas de leche de vaca por ELISA

Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry y la cantidad de proteínas antigénicas en la leche de distintas especies de mamíferos. Los resultados se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1.- Concentración de proteínas totales y proteínas antigénicas (Ag) de los sustitutos, y relación entre ambas magnitudes (porcentual).

Sustituto	[prot totales] # (mg/ml)	[prot Ag] ° (mg/ml)	Prot Ag / prot totales (%)
Leche de vaca	5,09±0,01	4,73±0,01	93,00
Leche de oveja	20,27±0,08	0,60±0,02	2,96
Leche de cabra	18,40±0,09	0,59±0,02	3,20
Leche de búfalo	63,20±0,01	4,60±0,03	7,28
Leche de yegua	15,40±0,03	1,63. 10 ⁻³ ±5. 10 ⁻³	0,023
Leche humana	9.21±0,02	2,86. 10 ⁻³ ±6. 10 ⁻³	0,031

* Obtenida por Lowry. ° Obtenida por ELISA secuencial de inhibición.

Mediante el análisis de las muestras por el ELISA de cuantificación, se detectan componentes de reactividad cruzada entre leche de vaca y otras especies de mamíferos. En el extracto de leche de vaca se detecta una menor cantidad de proteínas antigénicas con respecto a las totales, probablemente debido a la presencia de interferencias en el ensayo de Lowry. En el resto de los extractos, la concentración proteica total resulta mayor que la determinada por ELISA. La leche de búfalo es la que presenta el mayor contenido proteico total. El antisuero muestra mayor reactividad por componentes presentes en la leche de oveja, cabra y búfalo (2,96%; 3,20%; 7,28%, respectivamente), mientras que la reactividad por la de yegua y humana es menor (0,023% y 0,031%, respectivamente). La leche de búfalo es la que presenta la mayor similitud con leche de vaca, mientras que la menor se observa con la leche de yegua.

I.1.c- Caracterización proteica por electroforesis Tricina-SDS-PAGE

Los componentes de la leche de vaca fueron identificados comparando los PM de las especies proteicas separadas por electroforesis con los PM conocidos de las proteínas principales de la leche bovina: BSA, α_{s2} -caseína, α_{s1} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. En la figura 2 se muestran los perfiles proteicos obtenidos.

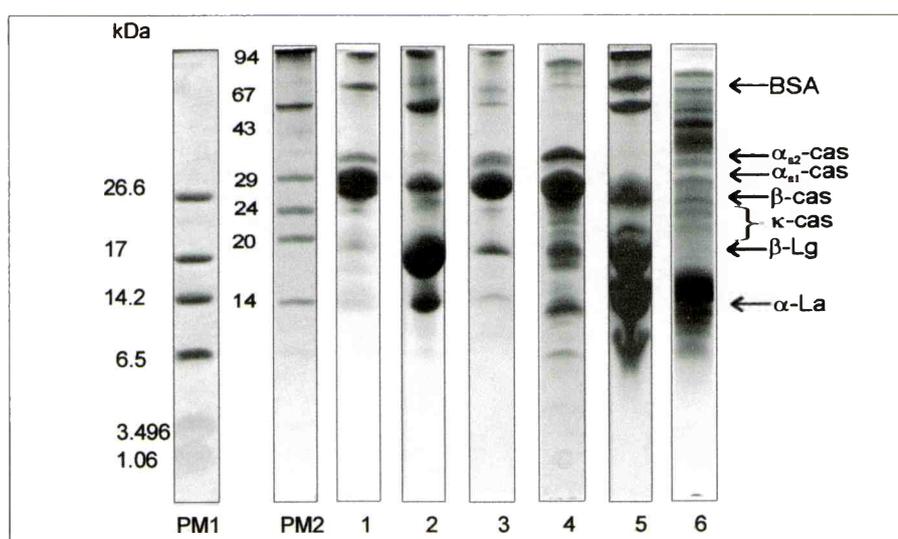


Figura 2: Tricina-SDS-PAGE de leche de mamíferos teñidas con Coomassie-Blue R250. PM1 y PM2= patrones de peso molecular, 1= leche de vaca, 2= leche de oveja, 3= leche de cabra, 4= leche de búfalo, 5= leche de yegua, 6= leche humana.

Los extractos proteicos de leche de oveja, cabra y búfalo muestran un perfil proteico similar al de la leche bovina, siendo las bandas principales las de α -caseína, β -caseína, κ -caseína, BSA, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, así como también agregados de caseína de alto PM. Con la leche de oveja se observa un menor contenido de α -caseína, y una alta cantidad de β -lactoglobulina, a juzgar por la intensidad de cada banda. En cambio, los extractos de leche de yegua y humana muestran un perfil proteico diferente al resto. Con la leche de yegua se observan bandas intensas en las zonas de albúmina, β y κ -caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, y bandas de 94 y 70 kDa,

pero no se detectan bandas en la zona correspondiente a α -caseína. Con la leche humana se observan las bandas correspondientes a lactoferrina (76 kDa); albúmina de suero (67 kDa) y α -lactoalbúmina (14 kDa), bandas tenues en la zona de β -caseína, κ -caseína y agregados de mayor PM, mientras que no se detectan bandas en las zonas de α -caseína y β -lactoglobulina, debido a que la glándula mamaria no las produce. Con los extractos de leche de oveja, búfalo, yegua y humana se observa también una banda de alrededor de 8 kDa.

I.1.d- Antigenicidad determinada por Inmunoblotting con suero policlonal y AcMo

Las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa fueron reveladas con el antisuero de conejo (Figura 3) y los tres AcMo (Figura 4) específicos de caseínas bovinas producidos en nuestro laboratorio: 1D5-I, 2A1-I y 3B5-I, que reconocen preferentemente α -caseína, β -caseína y κ -caseína respectivamente.

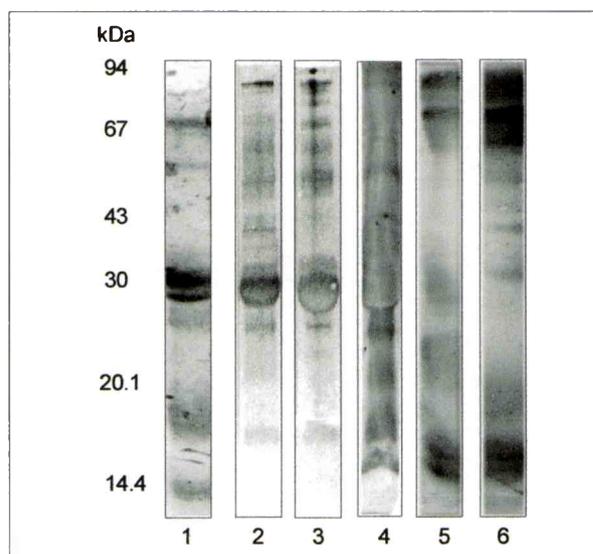


Figura 3: Inmunoblotting de leche de mamíferos revelado con el antisuero de conejo. 1= leche de vaca, 2= leche de oveja, 3= leche de cabra, 4= leche de búfalo, 5= leche de yegua, 6= leche humana.

Se observa que con la leche de oveja, cabra y búfalo todas las bandas detectadas en la electroforesis son reconocidas por el antisuero, con mayor intensidad para



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

DONACION.....



Fecha.....

Inv. B..... Inv..... B. 57093





caseínas, alérgeno principal de la leche de vaca en nuestro medio. Con el extracto de leche de yegua, se detectan bandas de mayor intensidad para α -lactoalbúmina y en zonas de alto PM (mayor de 67 kDa), mientras que son de menor intensidad en la zona de caseínas. Algo similar ocurre al analizar la leche humana, donde la mayor reactividad se observa en la zona de lactoferrina, albúmina y α -lactoalbúmina, y la menor intensidad es para caseína y una banda proteica de 18 kDa. La menor reactividad en la zona de caseínas se observa con los extractos de leche de yegua y humana, en los cuales se detecta la mayor intensidad en zonas de alto y bajo PM.

Al revelar los inmunoblotting con los AcMo (Figura 4) específicos de caseína bovina se observa que reconocen epítipes de reactividad cruzada en monómeros de caseína, agregados de alto PM y componentes de bajo PM derivados de su proteólisis en todas las leches ensayadas. Con leche de oveja, cabra y búfalo, los tres AcMo reconocen las bandas correspondientes a proteínas en la zona de los monómeros de caseína, y una banda de 17 kDa, que podría tratarse de componentes proteolíticos derivados de los monómeros. Con 2A1-I se detectan bandas proteicas adicionales de 27 kDa con la leche de oveja y cabra, y de 20 kDa con la leche de cabra. Con la leche de búfalo los 3 AcMo detectan una proteína de 27 kDa y otra de de 85 kDa, que podría corresponder a agregados de caseína.

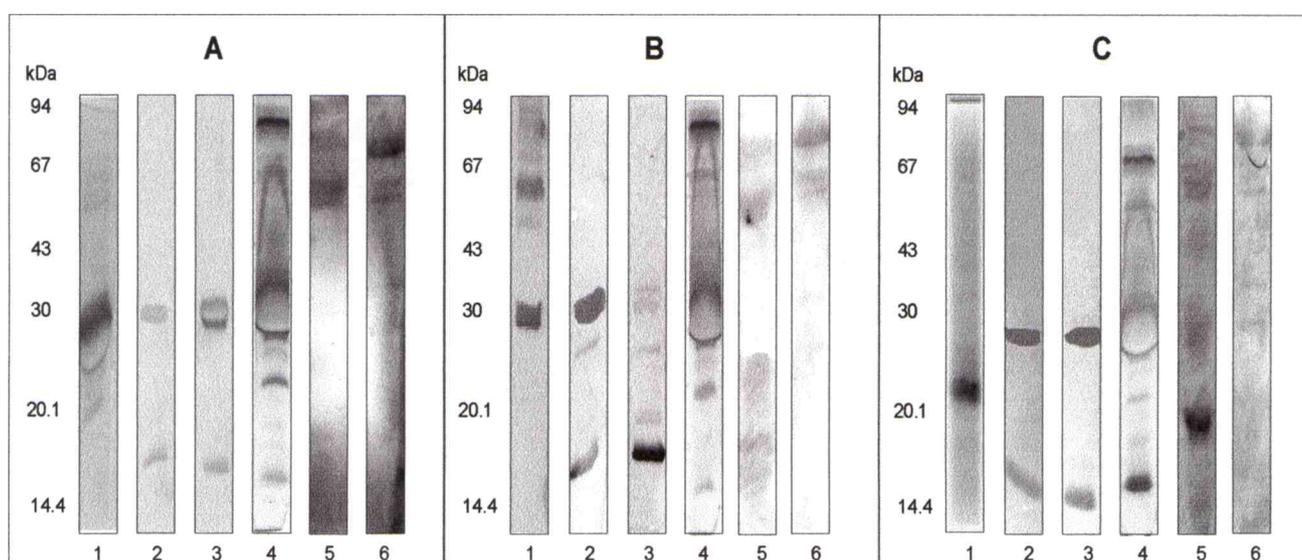


Figura 4: Inmunoblotting de leche de mamíferos revelado con los AcMo anti-caseína. 1= leche de vaca, 2= leche de oveja, 3= leche de cabra, 4= leche de búfalo, 5= leche de yegua, 6= leche humana. A= 1D5, B= 2A1, C= 3B5.

Con el extracto proteico de leche de yegua se revelan las proteínas de 67 y 76 kDa con los 3 AcMo, y además con 3B5-I se observa una banda de 20 kDa y una zona difusa en la zona de caseínas. Con la leche humana, con los tres AcMo, se revelan las bandas correspondientes a albúmina y lactoferrina.

1.2- Caracterización de la alergenicidad *in vitro*

La determinación de la alergenicidad *in vitro* de los distintos sustitutos se basa en la capacidad de unión de los componentes proteicos a la IgE sérica proveniente de pacientes alérgicos a leche de vaca. Se caracterizó la alergenicidad por medio de dos métodos *in vitro*, EAST e inmunoblotting.

1.2.a- EAST

Se analizó la presencia de IgE específica para extractos proteicos de las distintas leches en el suero individual de los 50 pacientes alérgicos a leche de vaca y en un pool de sueros de pacientes, mediante EAST. Como control negativo se utilizaron sueros individuales de sujetos sanos con IgE sérica normal para la edad y con clínica no asociada a intolerancia por ingesta de leche de vaca. La especificidad del ensayo se analizó utilizando sueros de pacientes con IgE sérica elevada alérgicos a alimentos no lácteos (pescado, kiwi, huevo) y sin IgE específica para leche de vaca. Tanto en los sueros de individuos sanos como en el suero de pacientes alérgicos a otros alimentos la reactividad es de clase 0 para todos los extractos ensayados. Los resultados se presentan en la tabla 2 (como ejemplo sólo se muestran resultados de 3 pacientes).

El pool de sueros positivos muestra reactividad con componentes de todas las leches analizadas. Los sueros individuales analizados muestran patrones de reactividad IgE diferentes según los extractos ensayados, indicando la variabilidad en la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos de cada individuo y en la composición proteica de cada extracto.



Tabla 2.- Determinación de IgE específica para leches de mamíferos por EAST.

Extracto	IgE específica (clases)				
	Controles negativos	Pool de sueros positivos	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Vaca	0	4	2	2	1
Oveja	0	3	2	0	2
Cabra	0	3	0	0	0
Búfalo	0	3	3	0	2
Yegua	0	2	2	2	2
Humana	0	2	1	2	2

I.2.b- IgE Inmunoblotting

Con el objeto de identificar los componentes alérgicos de los extractos previamente determinados que tienen capacidad de ser reconocidos por la IgE sérica, se analizó por medio de inmunoblotting la presencia de IgE específica en el pool de sueros de pacientes alérgicos a leche bovina (Figura 5).

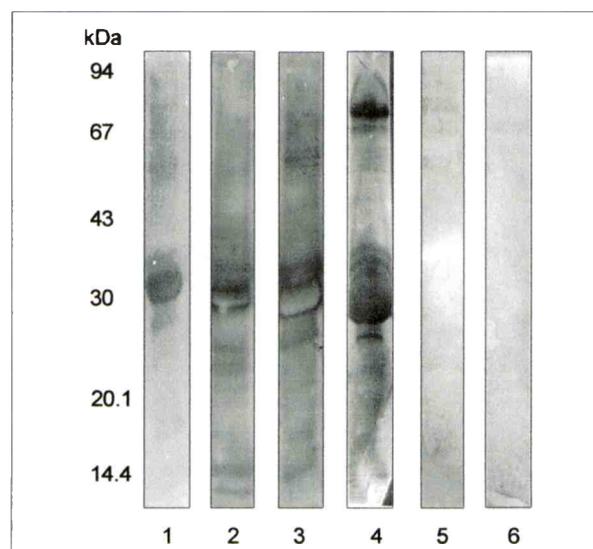


Figura 5: Inmunoblotting de leche de mamíferos revelado con IgE sérica de pacientes alérgicos a leche de vaca. 1= leche de vaca, 2= leche de oveja, 3= leche de cabra, 4= leche de búfalo, 5= leche de yegua, 6= leche humana.

La leche de vaca, oveja y cabra muestran un reconocimiento de las bandas correspondientes a proteínas del suero, caseínas y agregados, siendo más intensa en la zona de caseínas (alergeno principal en nuestro medio). Con la leche de búfalo, la IgE revela las caseínas y agregados. Con la leche de yegua y humana se observan bandas con muy baja intensidad, indicando poco o muy bajo nivel de reconocimiento por parte de la IgE sérica. Con la leche humana, puede observarse una banda de escasa intensidad de 76 kDa, que podría deberse a agregados de caseína o a lactoferrina.

1.3- Discusión

Al comparar la leche de distintos mamíferos con la leche bovina, hemos encontrado similitudes entre algunas de ellas, y ciertas diferencias con otras. La leche de oveja, cabra y búfalo se comportaron de manera similar entre ellas, y fueron las más parecidas a leche de vaca. Mostraron mayor proporción de proteínas antigénicas, siendo la de búfalo la de mayor reactividad cruzada con leche de vaca. Además, mostraron un perfil electroforético similar a la leche de vaca. La mayoría de las bandas proteicas de todas las leches fueron reconocidas por el suero de conejo, indicando la presencia de reactividad cruzada entre las proteínas de leche de vaca con las de estas leches. La mayor intensidad de reactividad cruzada se detectó en la zona de las caseínas. Utilizando anticuerpos monoclonales específicos de caseína bovina, fue posible detectar epitopes de reactividad cruzada entre las caseínas de diferentes especies. Se observó reactividad en la zona de los monómeros de caseína y de agregados de alto PM en las leches de vaca, oveja, cabra y búfalo. Este fenómeno, informado también por otros autores (Restani, 1999a) se puede justificar por la alta homología de secuencia existente entre las moléculas de caseínas de esas leches, que alcanza el 90%. En cambio la homología entre las distintas moléculas de caseínas de una misma especie no supera el 30% (Spuergin, 1997). En la tabla 3 se muestra la homología entre las caseínas α_{s1} y α_{s2} de vaca, oveja y cabra, calculada por el programa GAP of HUSAR (obtenida de Spuergin, 1997).

La IgE del suero de pacientes alérgicos a leche de vaca reconoció a proteínas presentes en los extractos de la leche de oveja, cabra y búfalo. Dado que los pacientes no habían consumido ninguna de esas leches, este resultado indica que la IgE reconoce epitopes similares o iguales de las proteínas de las distintas leches. Restani y col (Restani,



1999a) compararon la reactividad de la IgE sérica de pacientes alérgicos a leche de vaca para leche de vaca, oveja, cabra, búfalo, camello y humana, mediante inmunoblotting. Encontraron que la reactividad con leche de oveja y búfalo era similar a leche de vaca, sin embargo con leche de cabra hubo menor reactividad; aunque otros autores informan una mayor reactividad para leche de cabra (Bellioni-Businco, 1999). Estos investigadores no encontraron ninguna respuesta positiva con leche de camello ni leche humana. El estudio de Spuergin (Spuergin, 1997) mostró que la IgE específica para leche de vaca en el suero de pacientes alérgicos a leche bovina era inhibida por leche de oveja y cabra, lo cual comprueba la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas de estas especies. Por todo esto no se recomienda el consumo de estas leches como sustituto de la leche de vaca, dado que expone al paciente a un riesgo alto de reacción atópica.

Tabla 3- Homología de secuencia entre las caseínas α_{S1} y α_{S2} de vaca, oveja y cabra

Proteína	Especie	α_{S1} -caseína			α_{S2} -caseína		
		vaca	oveja	cabra	vaca	oveja	cabra
α_{S1} -caseína	vaca	---	88,5	86,9	22,5	nc	nc
	oveja		---	97,4	nc	21,3	nc
	cabra			---	nc	nc	19,8
α_{S2} -caseína	vaca				---	88,9	87,9
	oveja					---	98,1
	cabra						---

nc: no calculado

Con la leche de yegua también encontramos reactividad cruzada utilizando antisueros poli y monoclonales, aunque de menor magnitud que para las anteriores. La composición proteica de la leche de yegua tiene mayor similitud con la leche humana, siendo más rica en proteínas de suero que en caseínas. Por EAST e inmunoblotting, el reconocimiento por parte de la IgE fue bajo, resultado similar al obtenido por Businco et al (Businco, 2000). Gall y col (Gall 1996) encontraron un paciente con alergia a leche de yegua pero no a leche de vaca. Esto sugiere, que al menos a nivel de IgE, la reactividad cruzada es baja, por lo que la leche de yegua podría ser un sustituto de elección para la dieta de pacientes alérgicos a leche bovina.

En el caso específico de la leche humana, la detección de reactividad cruzada puede deberse a la presencia de proteínas de leche de vaca en la leche materna, por el pasaje de proteínas de la dieta de la madre (Host, 1990a; Chirido, 1998), y/o a presencia de reactividad cruzada (Bertino, 1996).

La leche humana tiene una concentración proteica de 9g/l. Al contrario a lo observado con la leche de vaca, la leche humana presenta una mayor proporción de proteínas de suero que de caseínas y además la relación entre ellas cambia a lo largo de la lactancia. Al inicio de la misma la relación suero/caseína es de 90/10 y luego, es de 60/40. Las proteínas principales del suero son la α -lactoalbúmina (2,6 g/l; 14 kDa), lactoferrina (1,7 g/l; 76 kDa) (ésta no existe en la leche de vaca) y lisozima (0,08-0,2 g/l; 18 kDa). La glándula mamaria humana no produce β -lactoglobulina ni α -caseína (Chtouron, 1985; Ribadeau-Dumas, 1988), por lo cual estas dos proteínas constituyen alérgenos importantes de la leche de vaca.

Con la leche humana, observamos que el suero de conejo detectó varias proteínas, entre ellas la de 18 kDa. Esta última puede deberse a la presencia de β -lactoglobulina proveniente de la dieta materna o a reactividad cruzada con la lisozima humana. Los AcMo revelan bandas correspondientes a albúmina y lactoferrina. Varios autores informaron la existencia de cruce entre β -lactoglobulina y caseína bovina con lactoferrina, β -caseína y α -lactoalbúmina humanas (Bertino, 1996; Restani, 1999b), utilizando anticuerpos monoclonales específicos de las proteínas bovinas. En cuanto a la IgE, se observó una reactividad muy baja, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Restani y col (Restani, 1999b).

II.- CARACTERIZACIÓN DE HIDROLIZADOS COMERCIALES DE PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

II.1- Caracterización proteica y antigénica

II.1.a- Cuantificación de proteínas totales (Lowry) y proteínas antigénicas de leche de vaca por ELISA

Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry y la cantidad de proteínas antigénicas por medio del ELISA competitivo secuencial con el antisuero de conejo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4 :

Tabla 4.- Proteínas totales (tot) y proteínas antigénicas (Ag) de los hidrolizados de leche de vaca, y relación entre ambas magnitudes (porcentual).

Sustituto	Composición*	[prot tot] (mg/ml)	[prot Ag] (mg/ml)	[prot Ag] / prot tot (%)
NAN HA	S-P	0,83±0,03	0,46±0,01	56,00
Beba HA 1	S-P	1,32±0,02	3,28.10 ⁻³ ±5.10 ⁻³	0,24
Beba HA 2	S-P	1,28±0,05	0,013±0,002	1,01
Humana HA	S-P	0,74±0,02	9,31.10 ⁻³ ±4.10 ⁻³	1,26
KAS 1000	C-P	0,97±0,01	0,18±0,06	18,56
Aptamil HA	CyS-P	1,22±0,01	2,26.10 ⁻³ ±1.10 ⁻³	0,18
Pregestimil	C-E	0,85±0,06	3,42.10 ⁻⁴ ±3.10 ⁻⁴	0,04
Neocate	AA	0,091±0,004	1,1.10 ⁻⁵ ±5.10 ⁻⁵	0.012

* S: proteínas de suero, C: caseínas, P: hidrolizado parcial, E: hidrolizado extensivo, AA: fórmula a base de aminoácidos.

La cuantificación de proteínas antigénicas en los hidrolizados de proteínas de leche de vaca permite detectar la existencia de epitopes residuales e indica el grado de hidrólisis de cada sustituto. La hidrólisis elimina epitopes conformacionales e hidroliza epitopes secuenciales, por ello, en todos los casos se observa que la concentración



proteica total es mayor que la de proteínas antigénicas. Con NAN HA, hidrolizado parcial de suero, la relación entre proteínas antigénicas y totales es la mayor. En cambio en el resto de los hidrolizados parciales de suero, Beba HA1, Beba HA2 y Humana HA, esta proporción es sólo del orden del 1%. En KAS 1000, la concentración antigénica es del 18,56% del total, dado que es un hidrolizado parcial, en cambio, en Pregestimil, que es extensivo, ésta resulta ser muy baja. Aptamil HA, hidrolizado parcial de caseínas y suero, mostró una relación del 0,18%. Neocate al ser una fórmula a base de aminoácidos, mostró el menor nivel de antigenicidad.

II.1.b- Caracterización proteica por electroforesis Tricina-SDS-PAGE

Los extractos proteicos de los distintos sustitutos fueron analizados mediante electroforesis (Figura 6).

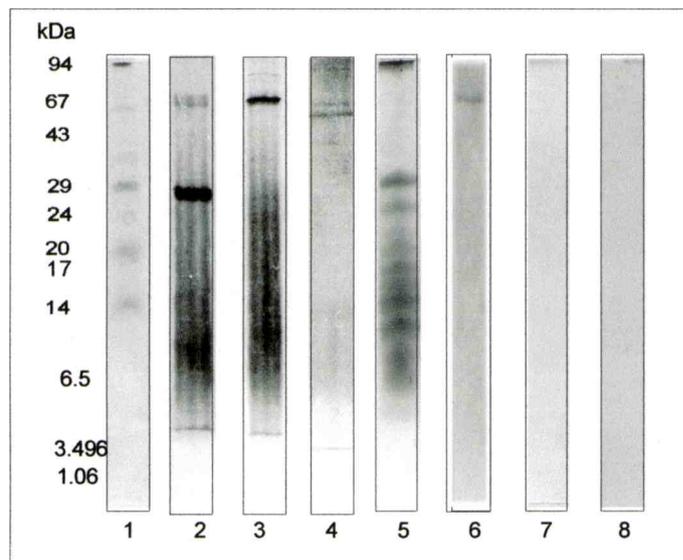


Figura 6: Tricina-SDS-PAGE de hidrolizados de leche de vaca teñidas con plata. 1= NAN HA, 2= BEBA HA1, 3= BEBA HA2, 4= Humana HA, 5= KAS 1000, 6= Aptamil HA, 7= Pregestimil, 8= Neocate.

El extracto de NAN HA muestra bandas cuyos PM corresponden a las proteínas de suero β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, pero también en la zona de PM de los

monómeros de caseína. Estas bandas podrían deberse a dimerización, por puentes disulfuro, de la β -lactoglobulina dando un PM de alrededor de 36 kDa. Para descartar esta posibilidad se realizó la electroforesis en presencia de β -mercaptoetanol, observándose que dicha banda no desapareció (no mostrado). Este resultado indicaría que son restos de caseína. En las muestras de Beba HA1 y 2 se detectan bandas de 67 kDa, probablemente de BSA y una zona difusa entre 24 y 6 kDa, que correspondería a péptidos resultantes del tratamiento hidrolítico. En Beba HA1, además, se observa una banda intensa en la zona de caseína. En el restante hidrolizado de suero, Humana HA, la tinción fue más débil, detectándose una banda tenue de 67 kDa y una zona difusa que alcanza a 4 kDa. En cuanto a los hidrolizados de caseína, KAS 1000 es el único que mostró bandas proteicas. Se observan bandas de α -, β - y κ -caseína y una zona difusa de menor PM, que serían péptidos residuales provenientes de la hidrólisis de las caseínas. En los extractos de Aptamil, Pregestimil y Neocate no se detectan bandas.

II.1.c- Antigenicidad determinada por Immunoblotting con suero policlonal y AcMo

La antigenicidad de los sustitutos se analizó mediante inmunoblotting, revelando con el suero de conejo (Figura 7) y AcMo (Figura 8).

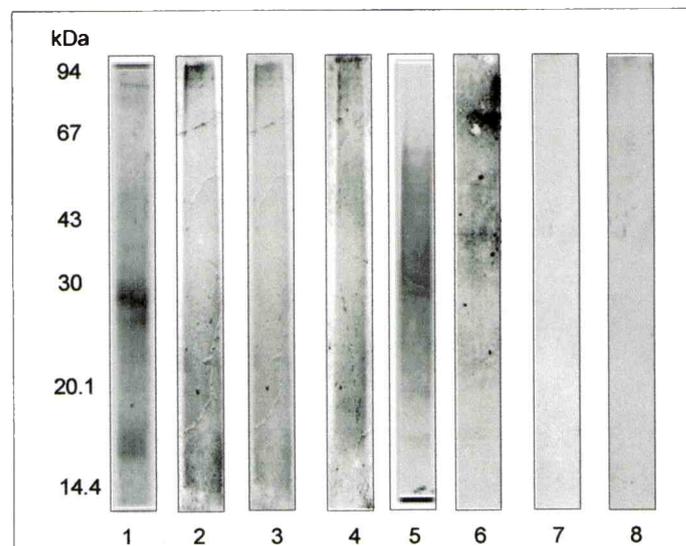


Figura 7: Inmunoblotting de hidrolizados de leche de vaca revelado con el suero de conejo. 1= NAN HA, 2= BEBA HA1, 3= BEBA HA2, 4= Humana HA, 5= KAS 1000, 6= Aptamil HA, 7= Pregestimil, 8= Neocate.

En los 4 hidrolizados de proteínas de suero se observa reconocimiento por parte del antisuero. Con NAN HA se observan bandas individuales de caseína y proteínas de suero, mientras que en los restantes tres, hay una zona de reactividad difusa (PM menor a 30 kDa) correspondiente a péptidos resultantes de la hidrólisis. Entre los hidrolizados de caseína, sólo con KAS 1000 se detectaron bandas, observándose una zona difusa comprendida entre 67 y 20 kDa, con mayor intensidad en la zona de los monómeros de caseína, que resulta de la presencia de péptidos derivados del tratamiento hidrolítico que conservan epitopes intactos. Con Aptamil HA se observa reactividad para componentes de alto PM, que serían restos de proteínas sin hidrolizar.

En cuanto al análisis de la unión de los AcMo, sólo se observan bandas visibles con NAN HA y KAS 1000, mientras que con el resto no hubo tinción (no mostrados). Con NAN HA, los 3 AcMo se unen a bandas correspondientes a caseína y una banda de 19 kDa, con diferente intensidad relativa entre ambas. El revelado con los AcMo de componentes en este hidrolizado de suero confirma la presencia de contaminación con caseína. Con KAS 1000, los 3 AcMo revelan una zona de tinción difusa, que va desde la parte superior del gel hasta aproximadamente 25 kDa indicando la presencia de componentes residuales de la hidrólisis de caseína.

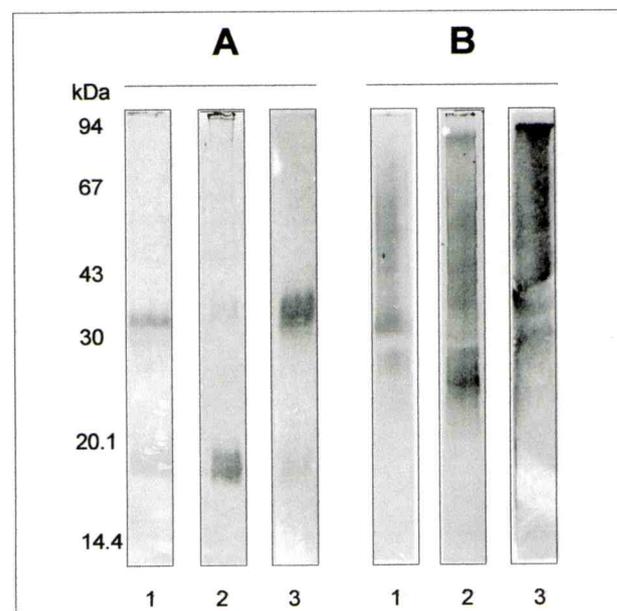


Figura 8: Inmunoblotting de los sustitutos lácteos NAN HA (A) y KAS 1000 (B), revelados con AcMo anti-caseína. 1 = 1D5, 2 = 2A1, 3 = 3B5.

II.2- Caracterización de la alergenicidad *in vitro*

II.2.a- EAST

Se analizó la unión de la IgE sérica de un pool de sueros y de los sueros individuales a extractos de los distintos hidrolizados. En la tabla 5 se muestra el resultado obtenido con suero de 3 pacientes (representativos de todos los estudiados), el pool de sueros positivos y el pool de sueros negativos.

Se observa que con los sueros controles negativos, la reactividad es de clase 0. El pool de sueros positivos muestra reactividad con todos los hidrolizados analizados, clase 2 o mayor, mientras que con Neocate, es de clase 0. Con Pregestimil se observa reactividad por parte del pool de sueros positivos, indicando la existencia de epitopes residuales, a pesar de que no hay detección de proteínas por medio del SDS-PAGE e inmunoblotting. En el caso de los sueros individuales, se observa una gran variabilidad de reactividad, de acuerdo al extracto proteico empleado y también al suero individual analizado. La mayor proporción de sueros mostraron resultado positivo (clase 2 o mayor) con NAN HA, Beba HA2, KAS 1000 y Aptamil HA.

Tabla 5.- Determinación de IgE-específica para los distintos sustitutos por EAST. El resultado se expresa en clases.

	IgE específica (clases)				
	Pool de sueros negativos	Pool de sueros positivos	Suero 1	Suero 2	Suero 3
NAN HA	0	3	2	1	2
BEBA HA 1	0	3	2	1	0
BEBA HA 2	0	3	2	2	0
Humana HA	0	3	0	0	0
KAS 1000	0	3	1	2	3
Aptamil HA	0	3	2	2	0
Pregestimil	0	2	0	0	1
Neocate	0	0	0	0	0



II.2.b-IgE Inmunoblotting

Para analizar la capacidad individual de unión a la IgE los componentes proteicos de los sustitutos separados mediante electroforesis fueron enfrentados a la IgE sérica del pool de sueros positivos (Figura 9).

Al igual que el revelado con AcMo, sólo se observan bandas visibles con NAN HA y KAS 1000. Al revelar el inmunoblotting con un pool de suero de pacientes alérgicos a leche de vaca, se observa que la IgE presente se une a la banda correspondiente a caseína y otra de 19 kDa en NAN HA y a una zona difusa en KAS 1000.

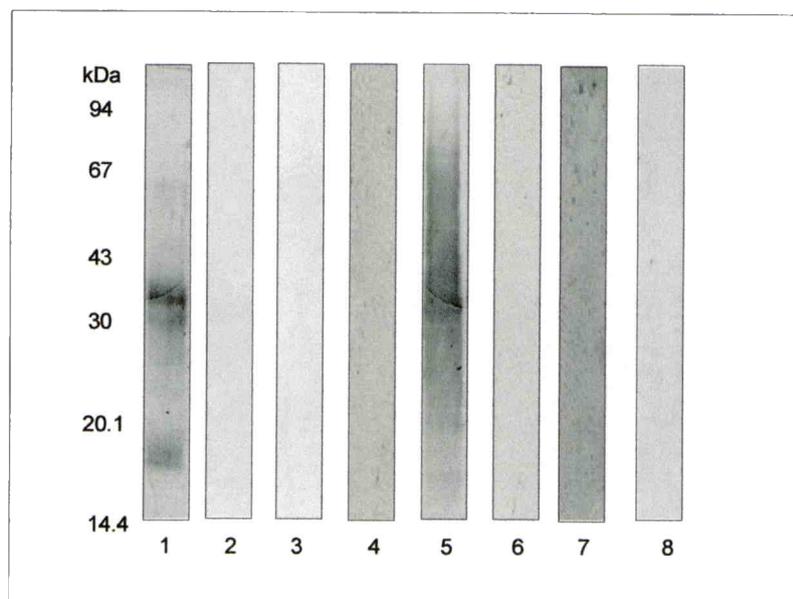


Figura 9: Inmunoblotting de hidrolizados de leche de vaca revelado con IgE sérica de pacientes alérgicos a leche de vaca. 1= NAN HA, 2= BEBA HA1, 3= BEBA HA2, 4= Humana HA, 5= KAS 1000, 6= Aptamil HA, 7= Pregestimil, 8= Neocate.

II.3- Discusión

La composición de los hidrolizados depende de la fuente proteica utilizada, de la/s enzima/s utilizada/s para la hidrólisis, la extensión del tratamiento hidrolítico y de la existencia o no de un proceso final de ultrafiltración. Una forma útil de estudiar la alergenicidad de una nueva fórmula láctea introducida en el mercado, es identificar los alérgenos por medio de métodos *in vitro*, tales como electroforesis, inmunoblotting y EAST. El análisis de la reactividad por parte del antisuero de conejo es de utilidad para detectar la presencia de proteínas intactas o péptidos que conservan epitopes. Con los AcMo se puede demostrar la existencia de epitopes derivados de las caseínas y contaminación con caseína de los hidrolizados de suero. El estudio de la unión de la IgE sérica permite determinar la existencia de epitopes alérgicos residuales.

La composición proteica y antigénica de los hidrolizados analizados fue muy variable. Como era de esperar, los hidrolizados parciales mostraron mayor nivel de proteínas antigénicas que los extensivos, pero entre los parciales hubo una gran diferencia. Restani y col (Restani, 1995) encontraron el mismo resultado mediante precipitación con TCA de los distintos hidrolizados para concentrarlos, y además observaron que los hidrolizados extensivos contenían menor precipitado, en general concentrados en pocas bandas proteicas.

NAN HA fue el hidrolizado que mostró la mayor relación entre proteínas antigénicas y totales. En la electroforesis se pudo detectar proteínas intactas, y no sólo de suero (como cabría esperar dado que la fuente proteica es suero) sino también caseínas. En orden de antigenicidad decreciente sigue KAS 1000, donde el 18,56% de las proteínas totales son antigénicas. La electroforesis de este extracto mostró también bandas correspondientes a caseínas y una zona de reactividad difusa. El inmunoblotting reveló la presencia de componentes de alto PM, que no se observaron por electroforesis (tinción con plata). Con respecto al resto de los hidrolizados parciales, Beba HA 1 y 2 resultaron similares en cuanto al perfil electroforético, sin embargo Beba HA2 mostró un orden de magnitud más de proteínas antigénicas (1,20 versus 0,24). Beba HA1, 2 y Humana HA fueron reconocidas por el antisuero, pero no por los AcMo, indicando que el suero policlonal está revelando componentes provenientes de proteínas de suero, principalmente BSA. Sin embargo, existen otros trabajos, donde sí detectan

componentes reactivos con distintos AcMo anti caseína (Chiancone, 1995). En Aptamil HA y Pregestimil no se observaron bandas por electroforesis ni por inmunoblotting. Sin embargo se detectaron componentes antigénicos por medio del ELISA de inhibición, eso podría deberse a que el PM de dichos componentes sería menor al detectado por electroforesis o a que sus epitopes se pierden con este método de separación. La antigenicidad de Neocate fue despreciable, como era de esperar dado que no posee péptidos.

De acuerdo con lo informado por otros autores (Gortler, 1995; Restani, 1996), detectamos la presencia de caseínas residuales en hidrolizados obtenidos a partir de suero, indicando que la separación tecnológica de las caseínas no es satisfactoria.

Al analizar la actividad alérgica *in vitro*, se utilizó un pool de sueros cuya IgE, por EAST, se unió a todos los hidrolizados estudiados, mientras que por inmunoblotting solamente se unió a bandas de proteínas intactas presentes en los extractos de NAN HA y KAS 1000. Restani (Restani, 1996) encontró también reactividad de la IgE con proteínas intactas y, en mucha menor medida, con péptidos menores. La reactividad de sueros individuales (por EAST) fue diferente, siendo los hidrolizados más reconocidos NAN HA, Beba HA2, KAS 1000 y Aptamil HA. Estos resultados en conjunto, indican que los hidrolizados, aun aquellos en los que no se detectó la presencia de proteínas intactas por SDS-PAGE, contienen péptidos con al menos un epitope capaz de unirse a la IgE sérica de los pacientes.

Son necesarios estudios *in vivo*, como por ejemplo pruebas cutáneas o de desafío, para determinar su posibilidad de producir el entrecruzamiento de la IgE presente en la superficie de las células efectoras e inducir su activación para una caracterización completa de su alergenidad. En un estudio clínico, se demostró que Beba HA (llamada Good Start en USA) es altamente alérgica, produciendo reacciones anafilácticas en chicos ya sensibilizados a leche de vaca. Este sustituto también fue capaz de sensibilizar a chicos predispuestos a atopía que han sido alimentados con esta fórmula durante los primeros días de vida, y además en chicos amamantados cuyas madres consumían Beba HA (Businco, 1994). Este trabajo y otros similares han hecho que en USA se retire la designación de hipoalérgica a esta fórmula ya que una reducción de la alergenidad no elimina la posibilidad de la instauración de reacciones alérgicas en el individuo alérgico que las ingiere.

La presencia de una cantidad significativa de proteínas intactas presentes en los hidrolizados parciales (Chiancone, 1995; Oldaeus, 1991; Ragno, 1993, Docena, 2002) hace que su uso como sustituto sea altamente riesgoso para el paciente. Su utilización es controversial como prevención de la sensibilización con leche bovina en chicos altamente predispuestos a atopía. Existen trabajos donde se observó un efecto beneficioso en la prevención de atopía por parte de los hidrolizados parciales, sugiriendo que se podrían inducir mecanismos específicos de tolerancia (Chandra, 1991; Vandenplas, 1992; Willems, 1993), y por ello estos autores prefieren el uso de los hidrolizados parciales como prevención, por su gusto más aceptable y el costo menor respecto a los hidrolizados extensivos, que parecen más seguros. Sin embargo otros autores (Oldaeus, 1997, Odelram, 1996; Mallet, 1992) no observaron una diferencia significativa en la prevención cuando la compararon con la fórmula a base de leche de vaca sin hidrolizar, y por ello desaconsejan el uso de hidrolizados parciales, y sugieren que el término "hipoalergénico" no debería aparecer en el etiquetado (Odelram, 1996; Businco, 1993).

El agregado de un paso de ultrafiltración en la preparación del hidrolizado parcial elimina proteínas residuales intactas, y aun péptidos de alto PM, con lo cual resulta muy eficiente en la reducción de la antigenicidad de un hidrolizado parcial (Gortler, 1995). En general, el PM de los péptidos de las fórmulas ultrafiltradas es menor a 10 kDa. Un estudio realizado con una de estas fórmulas (Profylac), mostró que un bajo porcentaje de sueros (13%) de pacientes alérgicos a leche de vaca arrojó un resultado positivo por RAST. Por inmunoblotting, se observó una banda débil de 5 kDa (Oldaeus, 1991). En pruebas de desafío, 94% de los niños no mostraron reacciones adversas, mientras que en el 6% restante las reacciones fueron dudosas (síntomas poco significativos) y luego toleraron sin problemas la ingesta de esta fórmula en forma diaria (Halken, 1993b).

En estudios donde se realizó un seguimiento hasta los 5 años de edad (Oldaeus, 1997), los hidrolizados extensivos resultaron ser efectivos en la reducción de la incidencia de enfermedades alérgicas comparada con leche bovina. La mayor diferencia en la incidencia de atopía entre las distintas fórmulas ocurre entre los 3-6 meses de edad, indicando que esa etapa es la más importante para evitar alimentos altamente alérgicos (Oldaeus, 1997; Vandenplas, 1995)

En los hidrolizados extensivos, la baja cantidad de proteínas intactas o polipéptidos de alto PM, hace que sean generalmente tolerados por la mayoría de los niños. Pero aun esa baja cantidad de proteínas podría ser suficiente para sensibilizar o desencadenar reacciones en niños muy sensibles. También los péptidos de bajo PM pueden formar agregados, que pueden ser antigénicos y alergénicos. De hecho, existen informes de reacciones adversas tanto con los hidrolizados parciales (Businco, 1994; Tarim, 1994) como con los extensivos (Saylor, 1991; Hill, 1995; De Boissieu, 1997).

Todos los hidrolizados estudiados retienen parte de la alergenicidad de las proteínas intactas, aunque hay bastante diferencia entre ellos. Dos de los hidrolizados (NAN HA y KAS 1000) muestran elevada reactividad inmunoquímica comparados con el resto. A pesar de que con esta metodología sólo se caracteriza la alergenicidad *in vitro*, que en muchos casos puede diferir de lo observado *in vivo*, la información que brinda es importante para caracterizar a la formulación y compararla con otros hidrolizados, además de indicar la existencia de componentes nativos residuales, péptidos derivados de la hidrólisis y proteínas contaminantes. Este tipo de estudio resulta útil para identificar, para cada paciente individual, aquellos posibles sustitutos. Una vez elegido el más indicado, es conveniente realizar la primera administración bajo supervisión médica.

Niños con reacciones adversas a hidrolizados extensivos, en general, tampoco toleran otros alimentos, como soja, huevo, trigo, maní, carne y arroz. Estos casos se denominan intolerancia a múltiples proteínas alimentarias. El desarrollo de una fórmula nutricionalmente completa basada en aminoácidos, Neocate, ha significado un gran avance en el tratamiento de niños con esta intolerancia múltiple (Hill, 1995; Isolauri, 1995; de Boissieu, 1997). Esta fórmula produce un buen aumento de peso en chicos que tenían retardo en el crecimiento debido a esta patología.

III.- CARACTERIZACIÓN DE FORMULAS A BASE DE PROTEINAS DE SOJA

III.1- Detección de reactividad cruzada entre proteínas de soja y leche de vaca

Se estudió la capacidad de inhibición de la unión de nuestro antisuero por parte de leches de soja comerciales y leches de soja preparadas en nuestro laboratorio a partir de porotos de soja, mediante ELISA de inhibición. Los resultados pueden observarse en la Tabla 6.

Tabla 6.- ELISA de inhibición de la unión del suero de conejo a leche de vaca por parte de extractos de leche de soja

Inhibidor	[prot totales] (mg/ml)	Ax*	Inhibición# (%)
Am (sin inhibidor)	---	2,811±0,001	0
Leche de vaca	2,0±0,1	0,095±0,001	97
Leche de soja CIDCA	9,3±0,3	0,198±0,001	93
Leche de soja ADES	4,1±0,2	0,824±0,002	71
Leche de soja ALPRO	2,5±0,2	0,544±0,001	81
Leche de soja Nursoy	0,7±0,1	0,296±0,003	89
Leche de soja preparada	10,0±0,1	0,902±0,001	68

Am: Absorbancia del control sin inhibidor. Ax*: Absorbancia promedio de las muestras problema. # Inhibición: $(Am-Ax/Am).100$.

Para este ensayo se utilizó un extracto de leche de vaca como control positivo, con el cual se obtiene una inhibición total (97%). Todas las leches de soja analizadas son capaces de producir una inhibición de la unión del antisuero a las proteínas de leche de vaca. Las muestras de leche de soja de origen comercial produjeron una inhibición de la unión de los anticuerpos presentes en el antisuero de entre 71 y 93%. Esta inhibición puede deberse a la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y de soja o a la



presencia de proteínas de leche de vaca en las leches de soja comerciales, debido a una contaminación en la industria durante su elaboración.

Para analizar estas 2 posibilidades, preparamos leche de soja a partir de porotos de soja comerciales, cuidando de no contaminar el extracto con proteínas de origen bovino. Con el extracto correspondiente se detecta una inhibición del orden de 68%. Este resultado indica la presencia de reactividad cruzada entre proteínas de soja y leche de vaca. El porcentaje de inhibición menor hallado con la leche de soja preparada en nuestro laboratorio podría estar indicando además la contaminación con proteínas de leche de vaca de las leches de soja comerciales o diferente alteración en la estructura proteica debidas al tipo de tratamiento térmico utilizado.

También preparamos leche de soja con 4 variedades de soja diferentes: Asgrow 4656, Asgrow 4004, Don Mario 43 y Caminera 32. Todas ellas muestran el mismo orden de inhibición que la leche preparada a partir de los porotos comerciales. En consecuencia, entre estas variedades no se observa diferencia entre la cantidad de componentes inmunorreactivos presentes en la leche de soja.

III.2.-Caracterización de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y soja

III.2.a- ELISA de inhibición

Mediante el ELISA de inhibición, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 10, se procedió a caracterizar la reactividad cruzada indicada anteriormente, inhibiendo la unión del antisuero a leche de vaca y soja.

Como control de especificidad se prepararon extractos de otras proteínas alimentarias: trigo, avena, cebada, centeno, amaranto, girasol, maní y ovalbúmina. En ninguno de los casos la inhibición supera el 10%, lo cual confirma la especificidad del ensayo.

La unión del antisuero a leche de vaca es inhibida totalmente con una concentración de proteínas de leche de vaca en la mezcla de preincubación de 1 mg/ml, mientras que el 50% de inhibición es alcanzado con una concentración de 3 µg/ml. Cuando se emplea un extracto de proteínas de soja como competidor se observa un



efecto dosis-respuesta de la inhibición de la unión a proteínas de leche de vaca. Este resultado sugiere que el antisuero contiene anticuerpos que reaccionan con componentes presentes en la leche de soja. Con el extracto de soja no se logra inhibir completamente la unión de los anticuerpos a proteínas de leche de vaca. La concentración de proteínas de soja necesaria para producir el 50% de inhibición es de 18 mg/ml, una cantidad 6000 veces mayor que la de proteínas de leche de vaca (Figura 10A). Estos resultados concuerdan con los títulos obtenidos por ELISA indirecto que, usando leche de vaca como antígeno inmovilizado es de 1/300.000, mientras que para soja resulta ser de 1/1000.

En el ensayo de inhibición de la unión del antisuero a proteínas de soja, se logra la inhibición total con ambos extractos, a concentraciones de 10 mg/ml de leche de vaca y 0,9 mg/ml de soja. El 50% de inhibición se alcanza con una concentración del extracto de soja 20 veces menor que del de leche de vaca (Figura 10B).

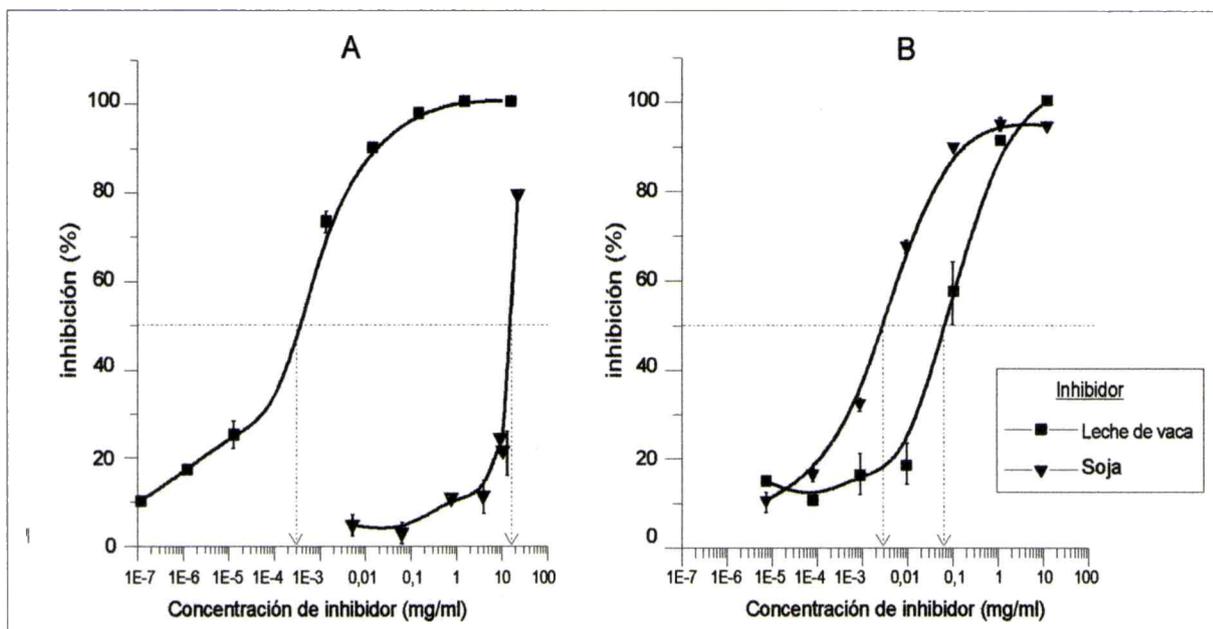


Figura 10: ELISA de inhibición de la unión del antisuero a proteínas de leche de vaca (A) y soja (B).

III.2.b- Cromatografía de afinidad

Se realizó una cromatografía de afinidad con el fin de purificar los anticuerpos específicos para soja presentes en el antisuero de conejo, y así detectar su especificidad por las proteínas de leche de vaca. Para ello, se sensibilizó Sepharosa activada con CNBr con un extracto total de proteínas de soja, y se incubó con una dilución del antisuero. Los anticuerpos que no fueron retenidos por el antígeno unido en la Sepharosa se analizaron por ELISA indirecto sensibilizando con leche de vaca o soja, e incubando con el suero de conejo pre o post-cromatografía. Utilizando leche de vaca como antígeno inmovilizado no se observa modificación de la DO en los antisueros pre y post-cromatografía, mientras que al emplear proteínas de soja como antígeno hubo una marcada disminución en la DO del antisuero post-cromatografía. Este resultado indica que quedaron retenidos a la columna de afinidad los anticuerpos de cruce capaces de reconocer componentes de soja.

Por último, se eluyeron los anticuerpos que habían sido retenidos en la columna. Dichos anticuerpos se utilizaron en ensayos de ELISA indirecto e inmunoblotting con distintas proteínas de leche de vaca puras.

La purificación de monómeros de caseínas se realizó mediante cromatografía de fase reversa, como se describe en Materiales y Métodos. Se colectaron las distintas fracciones y el contenido proteico se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE, realizando la tinción con plata. En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido y la electroforesis de las fracciones.

El orden de elución de los monómeros de caseína está de acuerdo a su hidrofobicidad creciente: $\kappa < \alpha < \beta$. La fracción eluida a los 51 minutos muestra una única banda, cuyo PM corresponde a κ -caseína, mientras que la de 52 minutos contiene además α -caseína. En las fracciones comprendidas entre los tiempos 55 y 57 minutos se detecta una sola banda correspondiente a α -caseína. En la fracción de 58 minutos, aparece β -caseína y en la de 63 minutos β impurificada con κ -caseína. La fracción comprendida entre 64 y 67 minutos presenta solamente β -caseína.

Por ELISA indirecto, se analizó la unión de los anticuerpos presentes en el eluato a los siguientes extractos proteicos (Figura 12): leche de vaca, caseína, α -caseína

(purificada por HPLC), β -caseína (purificada por HPLC), β -lactoglobulina (comercial) y BSA (comercial).

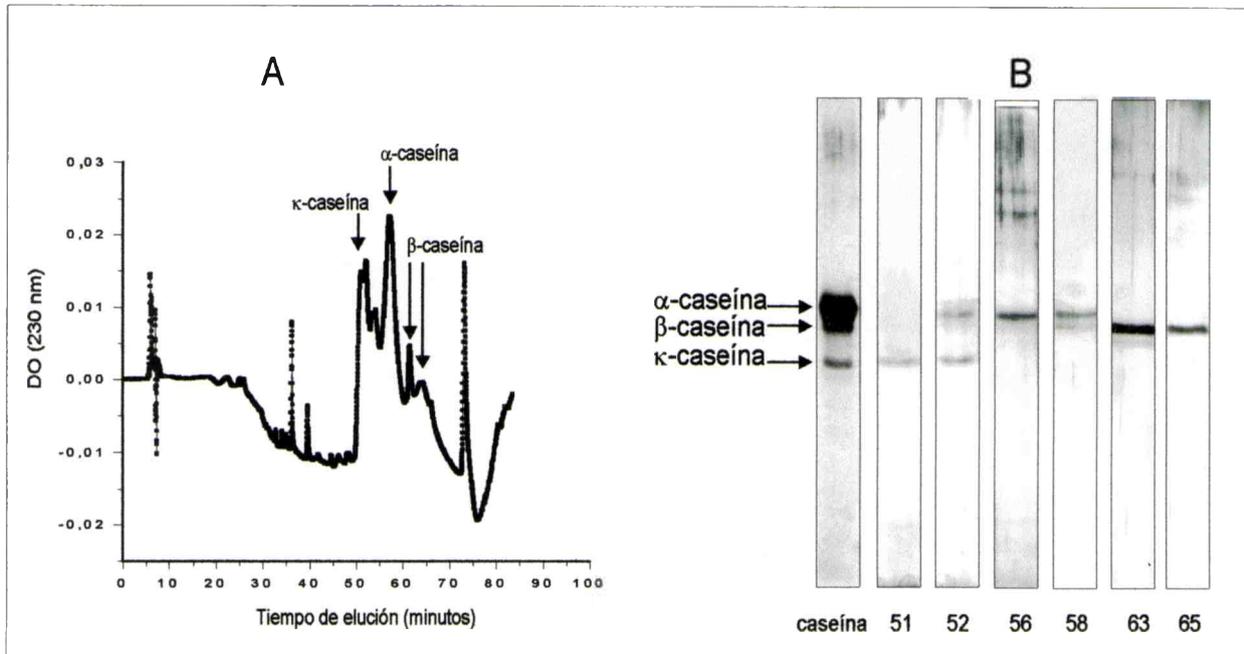


Figura 11: Purificación de caseínas. A= Cromatografía de fase reversa de caseína. B= SDS-PAGE de la muestra de caseína y algunas de las fracciones, de las cuales se indica el tiempo de elución. La tinción fue realizada con plata.

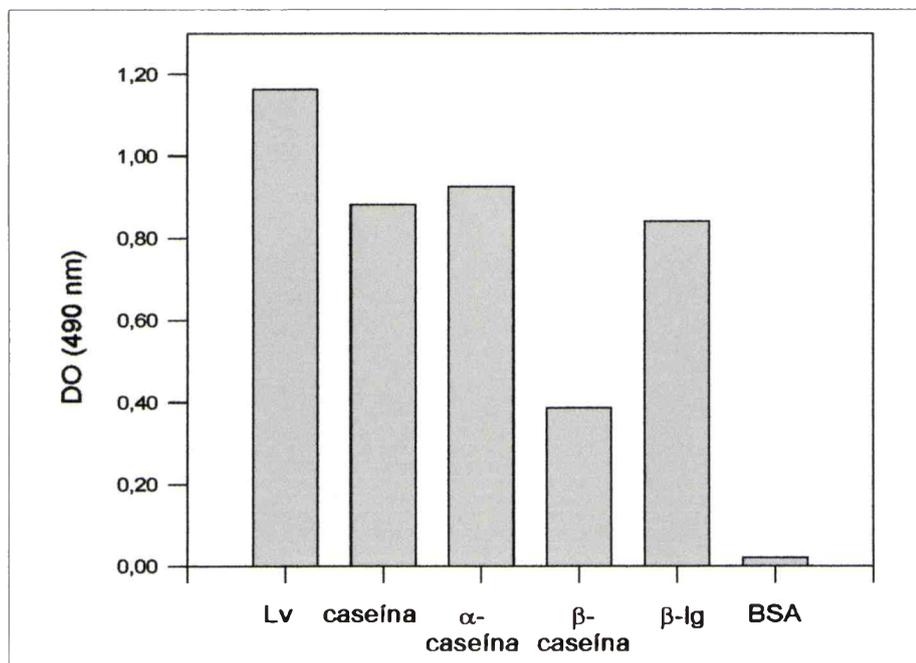


Figura 12: Determinación de la especificidad de los anticuerpos eluidos de la cromatografía de afinidad, mediante ELISA indirecto.

Los anticuerpos eluidos reconocen leche de vaca, confirmando que son anticuerpos de reactividad cruzada dado que se unen a soja y leche de vaca. La reactividad con caseína es inferior a la observada con el extracto total de leche de vaca, indicando que dichos anticuerpos también reconocen proteínas de suero en la leche bovina. El reconocimiento es superior por α -caseína que por β -caseína. Entre las proteínas de suero disponibles para analizar, se observa la unión a β -lactoglobulina pero, en cambio, no se detecta reactividad con BSA. Por inmunoblotting, se comparó la reactividad del antisuero y el eluato a leche de soja y de vaca (Figura 13). La reactividad contra soja es similar con ambos anticuerpos, observándose una banda de 30 kDa. Con leche de vaca, se observa que el eluato revela bandas de k-caseína y otra banda de alrededor de 70 kDa, que podría ser de agregados de caseína.

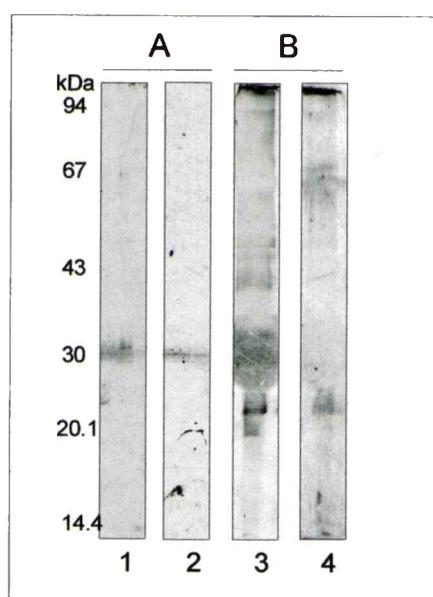


Figura 13: Inmunoblotting de soja (A) y leche de vaca (B) revelados con el antisuero (1 y 3) y el eluato de la cromatografía de afinidad (2 y 4).

III.2.c- Electroforesis SDS-PAGE e Inmunoblotting

Los distintos extractos de leche de soja se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 14).

Con Nursoy (calle 1) se observan dos bandas intensas con PM alrededor de 30 kDa y una zona de tinción difusa de menor PM, debida a componentes hidrolíticos. En cambio, todas las otras leches de soja muestran patrones semejantes entre sí, aunque de intensidad variable entre las distintas leches, con una alta cantidad de bandas entre 14 kDa y más de 90 kDa. Este patrón es el característico de las principales proteínas de reserva de soja, que corresponden a las proteínas de la globulina 7S (las subunidades α' (70kDa), α (68 kDa) y β (50 kDa)); de la globulina 11S (el dímero A-B (55 kDa), polipéptido A (35 kDa) y polipéptido B (20 kDa)) y de la fracción soluble 2S. En las leches de soja comerciales (calles 2 a 4) se observan todas las bandas proteicas principales con intensidad similar en cada una de ellas. En la leche de soja preparada en el laboratorio (calle 5) las bandas más intensas corresponden al dímero A-B, subunidad β y A, mientras que en las otras leches de soja preparadas a partir de porotos (calles 6 a 9) es más intensa la banda correspondiente a α' .

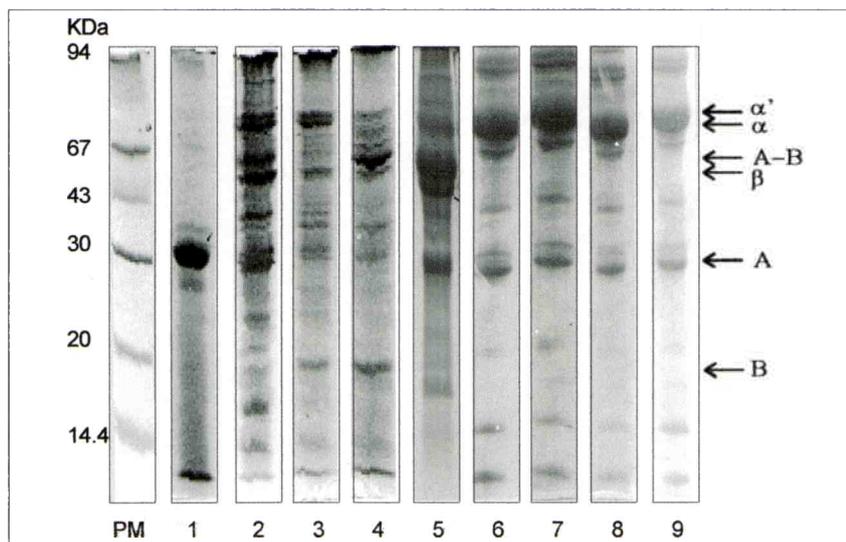


Figura 14: SDS-PAGE de extractos de leches de soja. La tinción fue realizada con Coomassie Blue R-250. PM=patrón de pesos moleculares, 1= Nursoy, 2= CIDCA, 3= ADES, 4= ALPRO, 5= leche de soja preparada en el laboratorio, 6= Asgrow 4656, 7= Asgrow 4004, 8= Don Mario 43, 9= Caminera 32.

Las proteínas presentes en los extractos de leche de soja transferidas a nitrocelulosa se revelaron con el antisuero. En todos los extractos estudiados se observa una banda predominante de 30 kDa y otras bandas de menor intensidad a pesos



moleculares mayores (Figura 15). También, al revelar el inmunoblotting con los tres AcMo anti-caseína, 1D5-I, 2A1-I y 3B5-I se observa la aparición de una banda de 30kDa. Estos resultados muestran que la proteína de soja que cruza con leche de vaca tendría un PM de 30 kDa, por lo que la denominamos S₃₀.

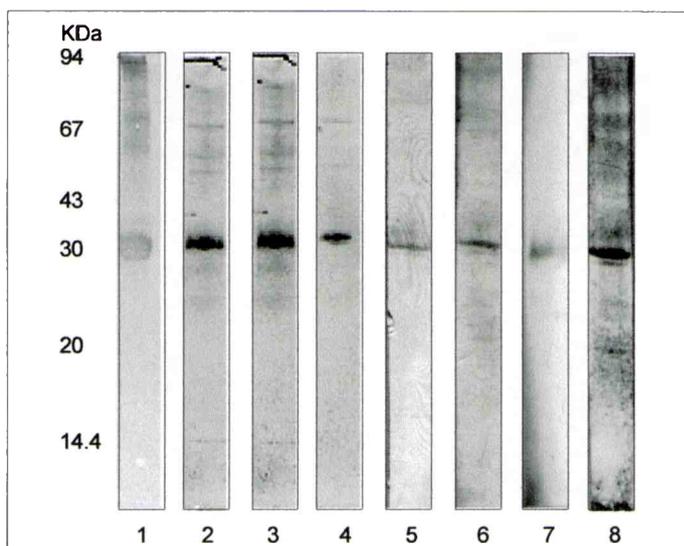


Figura 15: Inmunoblotting de extractos de leches de soja, revelado con:

-antisuero: 1 = Nursoy, 2= CIDCA, 3= ADES, 4= ALPRO, 5= leche de soja preparada en el laboratorio

-leche de soja preparada con los AcMo anti-caseína: 6= 1D5-I, 7= 2A1-I, 8= 3B5-I.

Además el antisuero se utilizó para detectar la presencia de componentes de cruce en fracciones provenientes de suero y precipitado ácido de proteínas de soja. En ambos extractos se reveló la presencia del componente de 30 kDa, lo que no permite determinar su origen (Figura 16).

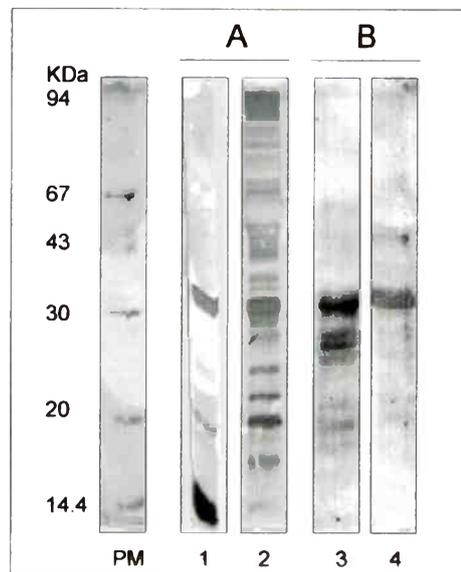


Figura 16: SDS-PAGE (A) e inmunoblotting (B) revelado con el antisuero. 1 y 3: suero de soja; 2 y 4: precipitado ácido de soja.

III.2.d- Electroforesis bidimensional

Se realizó una electroforesis bidimensional de un extracto de leche de soja, tal como se describe en Materiales y Métodos (Figura 17)

Puede observarse que de la proteína de 30 kDa se separan componentes de 20 kDa, sin desaparecer totalmente la banda original de 30 kDa. Los componentes de PM menor a 20 kDa no alcanzan a detectarse, por ello no pudo conocerse cual o cuáles otros componentes se desprenden del componente de 30 kDa al someterlo a condiciones reductoras. Por otro lado, de proteínas de alto PM de 50 y 85 kDa, se separan también bandas proteicas de 30 y 20 kDa.

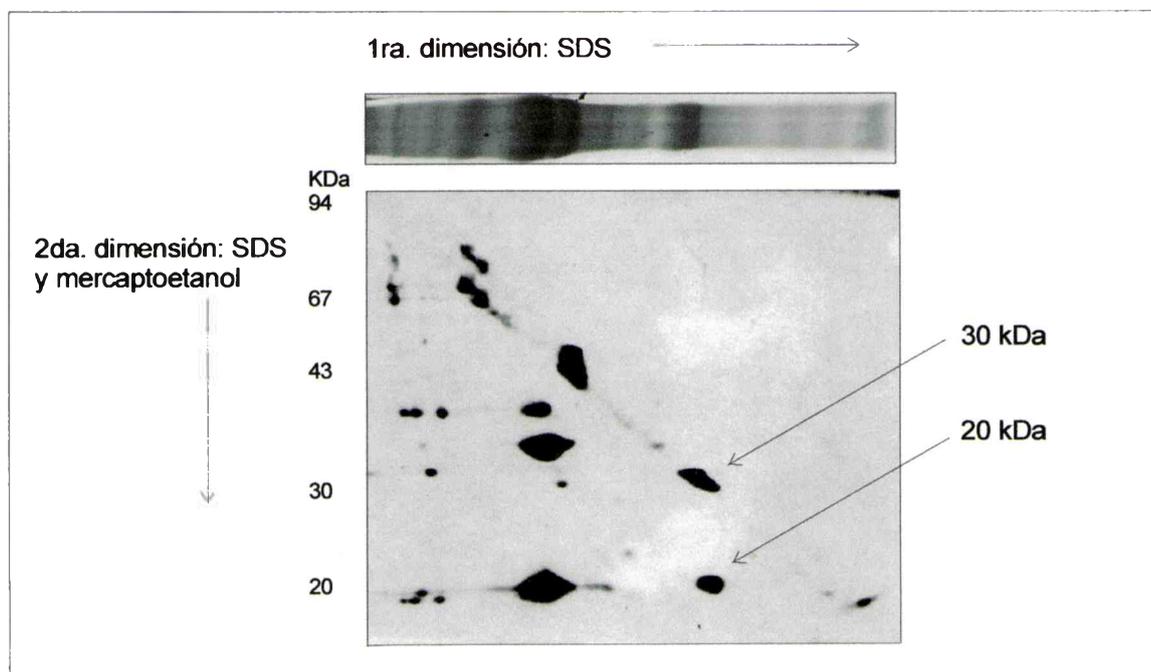


Figura 17: Electroforesis bidimensional de leche de soja. La primera dimensión se realizó en presencia de SDS, y la segunda con SDS y 2-mercaptoetanol. En la parte superior se observa una de las calles de la leche de soja de la primera dimensión. La tinción se realizó con plata.

III.3- Identificación de S_{30}

III.3.a- Purificación de S_{30}

La purificación del componente S_{30} se realizó por electroelución, a partir de un extracto de leche de soja. La proteína electroeluida fue analizada por ELISA y por inmunoblotting con el suero de conejo y los AcMo. En la figura 18 se observa que una única banda con PM de 30 kDa se detecta con los distintos anticuerpos.

Por medio de un ELISA de inhibición esta proteína, en una concentración de 0,0075 mg/ml es capaz de inhibir en un 70% la unión del antisuero a proteínas de leche de vaca, mientras que para lograr la misma inhibición se requieren 3 mg/ml del extracto de soja y $6 \cdot 10^{-6}$ mg/ml de leche bovina.

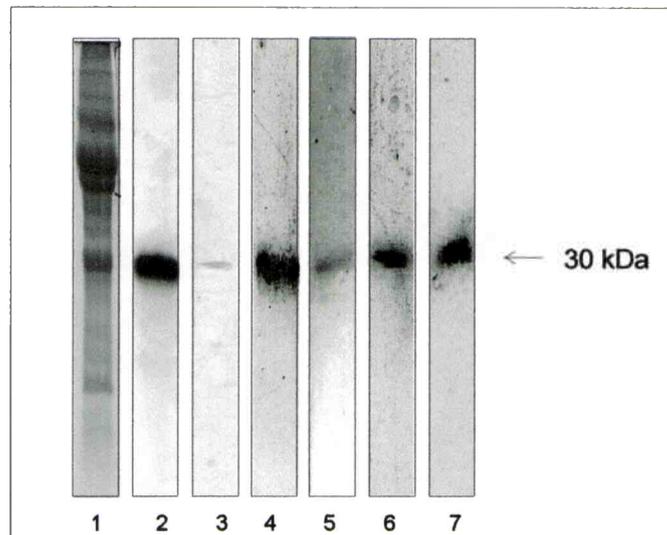


Figura 18: SDS-PAGE e inmunoblotting de extractos de soja.

SDS-PAGE: 1= leche de soja, 2= proteína de 30 kDa obtenida por electroelución, 3= proteína de 30 kDa recuperada a partir del RP-HPLC.

Inmunoblotting de la proteína electroeluida revelado con: 4= antisuero, 5= 1D5-I, 6= 2A1-I, 7= 3B5-I.

La pureza del extracto obtenido fue analizada por RP-HPLC (Figura 19).

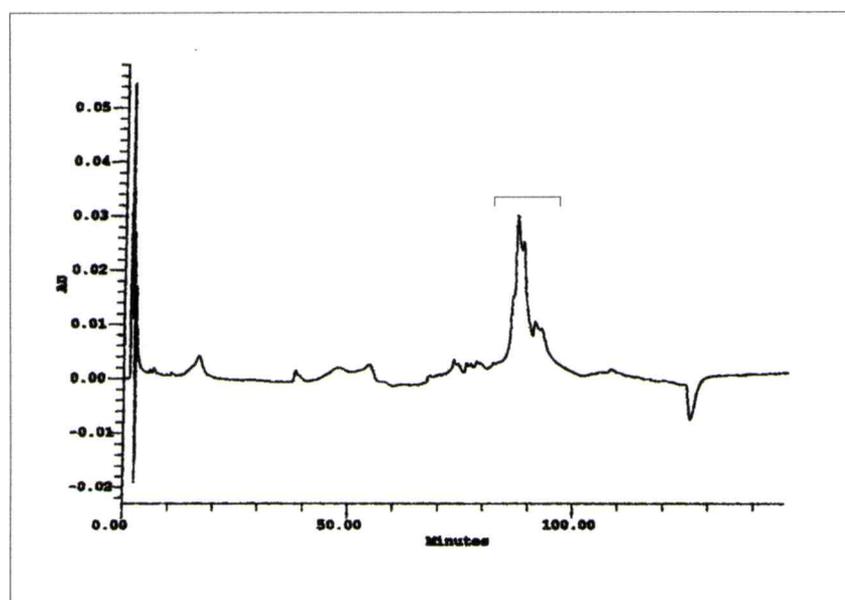


Figura 19: RP-HPLC de S_{30} obtenida por electroelución.



En el cromatograma se observa un único pico, el cual fue colectado y analizado mediante SDS-PAGE (ver figura 18), donde se observa una única banda de 30 kDa. Por isoelectroenfoque del extracto aislado y revelado con el suero de conejo (Figura 20), se establece que S_{30} posee un punto isoeléctrico de 5,2.

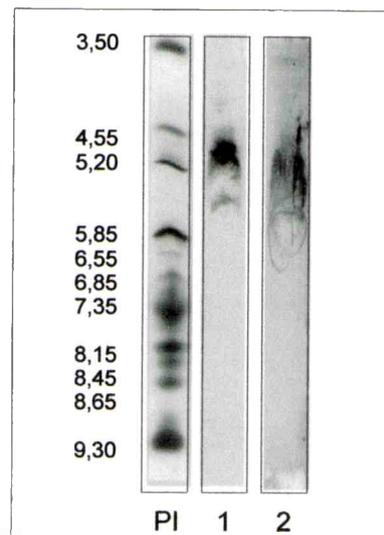


Figura 20: Isoelectroenfoque de S_{30} . PI: patrones de punto isoeléctrico, 1= proteína de 30 kDa revelado con plata, Inmunoblotting de S_{30} revelado con el suero de conejo.

III.3.b- Secuenciación de S_{30}

La proteína de 30 kDa se identificó mediante la determinación de su secuencia primaria según el método de Edman. La secuenciación de la proteína transferida a membrana de PVDF a partir del extremo N-terminal no fue posible. Se descartó la posibilidad de tratarse de una escasa cantidad de muestra, cuantificando la cantidad de proteína presente en la membrana por medio de la determinación de la composición de aminoácidos. La cantidad de proteína es de 5 pmoles, lo cual sería suficiente para la secuenciación sino hubiera bloqueo del N-terminal. Para resolver el inconveniente de que dicho componente estuviera bloqueado en su extremo N-terminal, seguidamente se procedió a realizar una digestión proteolítica, mediante el método de digestión "in gel" desarrollado por Rosenfeld (Rosenfeld, 1992) y mejorado por Hellman (Hellman, 1995).

El extracto peptídico obtenido se separó mediante HPLC de fase reversa C18 (Figura 21).

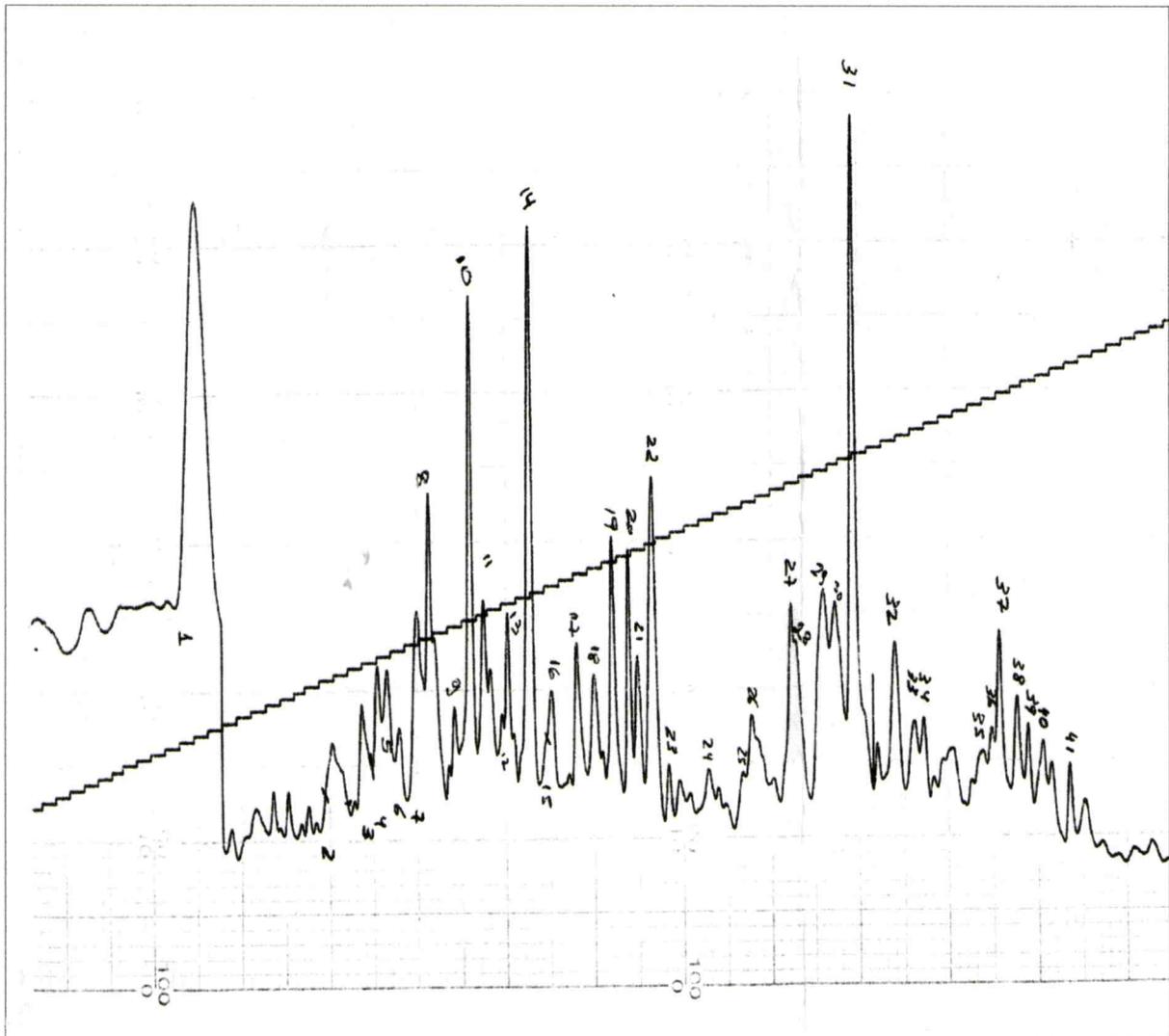


Figura 21: RP-HPLC del hidrolizado de S_{30} con tripsina, para su posterior secuenciación.

Se colectaron 47 picos y se secuenciaron los de mayor DO (210 nm), el 31 y el 14. En el primero (pico 31) se encontraron 2 péptidos. La identificación de cada componente surge de la comparación de las secuencias de los mismos con las existentes en bases de datos. Uno de ellos (a) correspondiente al segmento 79-100 de la glicinina A5 y el otro (b) al segmento 188-201 de la glicinina B3. El segundo pico corresponde al segmento 55-71 de B3 (Figura 22).

Para analizar qué componente es el comprometido en la reactividad cruzada, se realizaron electroforesis en condiciones reductoras. La electroforesis se realizó mediante Tricina-SDS-PAGE, para poder detectar la glicinina A5, cuyo bajo PM impide detectarla por el SDS-PAGE convencional. En la figura 23, se observa la electroforesis del extracto de S_{30} con 2-mercaptoetanol, comparado con el extracto original. Se detectó la aparición de 2 bandas, de PM 20 y 11 kDa. La intensidad de la banda de 30 kDa disminuyó, pero no desapareció completamente. Las proteínas separadas en condiciones reductoras, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se reveló con el suero de conejo y AcMo. Se observó que ambos tipos de anticuerpos reconocieron la banda de 20kDa, correspondiente a B3, mientras que en la zona de 11 kDa no se observó reactividad.

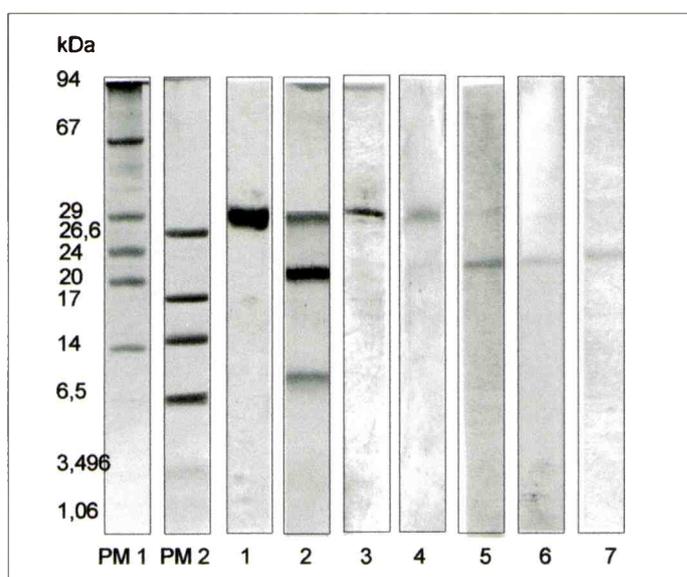


Figura 23: Tricina-SDS-PAGE e inmunoblotting de S_{30} con o sin 2-mercaptoetanol ($S_{30}/2$ -ME).

SDS-PAGE: 1= S_{30} , 2= $S_{30}/2$ -ME. Inmunoblotting revelado con el antisuero: 3= S_{30} , 4= $S_{30}/2$ -ME. Inmunoblotting de $S_{30}/2$ -ME revelado con los AcMo: 5= 1D5-I, 6= 2A1-I, 7= 3B5-I.

III.3.c- Búsqueda de identidad/similitud de secuencia entre glicinina B3 y proteínas de leche de vaca

Una vez conocida la proteína de soja que cruza con proteínas de leche de vaca, se procedió a buscar identidad/similitud de secuencia con las proteínas principales de la

leche de vaca. De este modo se intentó detectar posibles epitopes secuenciales similares entre las proteínas de ambos orígenes. Se comparó la secuencia de la glicinina B3 con las proteínas mayoritarias de leche de vaca: las 3 caseínas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. En la tabla 7 y Figura 24 se muestran los resultados obtenidos:

Se observa que en la glicinina B3 existen regiones (de entre 8 a 32 aminoácidos) con identidad y/o similitud con varias de las proteínas de leche bovina analizadas, tanto caseínas como del suero. Entre las proteínas de suero, sólo se encontraron resultados positivos con β -lactoglobulina. En cambio al analizar la comparación con caseínas se detecta identidad/similitud con las 4 caseínas. La mayor identidad/similitud con B3 se encuentra con α_{s1} y con κ -caseína, que superan el 60%, para una longitud de 11-12 aminoácidos. Esto podría indicar la existencia de epitopes de cruce secuenciales. Sin embargo, al realizar el mismo análisis con la glicinina A5, la cual no es reconocida por el antisuero, se encontraron resultados similares. Varias regiones con similitud superior al 60% con distintas proteínas de leche bovina.

Tabla 7- comparación de la secuencia de la glicinina B3 con proteínas de leche de vaca.

aa en B3	proteína de leche de vaca	aa en prot. de leche de vaca (n° de aa solapados)	identidad* (%)	similitud* (%)
391-399	Prec ^{&} de β -lactoglobulina	124-132 (9)	44,4	44,4
394-404	α_{s1} -caseína	17-27 (11)	54,5	63,6
409-420	prec κ -caseína	8-19 (12)	50	66,7
442-449	κ -caseína	18-25 (8)	37,5	37,5
474-487	β -caseína	165-178 (14)	42,9	42,9
487-518	α_{s2} -caseína	29-60 (32)	15,6	37,5

*Identidad: % de aa iguales. *Similitud: % de aa similares en cuanto a su composición química.

[&]: precursor



Comparación de secuencias entre la glicina B3 y proteínas de leche de vaca

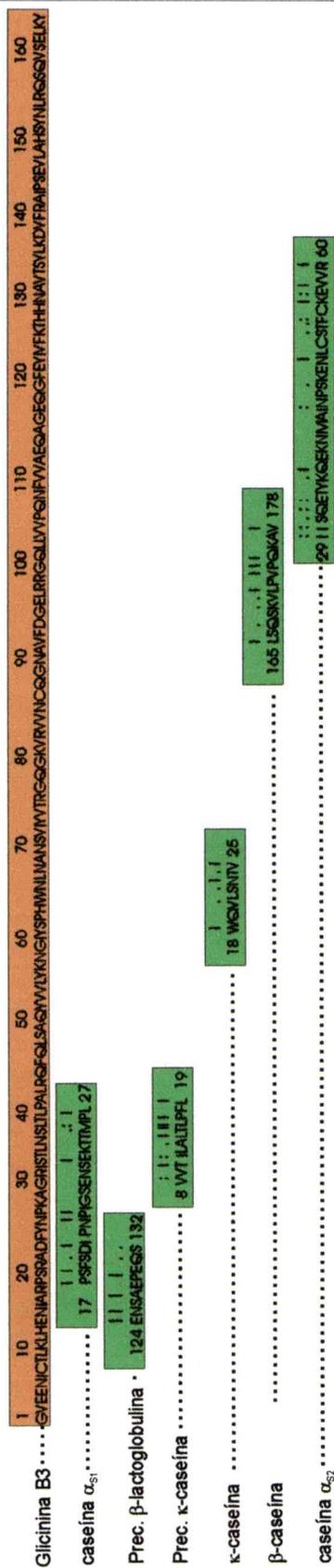


Figura 24: Identidad y similitud de secuencia entre la glicina B3 y proteínas de leche de vaca.
|= aminoácido idéntico
: y = aminoácido similar en cuanto a composición química

III.3.d- Digestión proteolítica de S₃₀

Para analizar la naturaleza estructural del/los epitope/s de la glicinina B3 responsables de la reactividad cruzada con proteínas de leche de vaca se decidió realizar proteólisis de S₃₀ con diferentes enzimas proteolíticas y caracterizar aquellos péptidos que sean reconocidos por el suero de conejo anti-leche de vaca.

En base a un estudio de la secuencia del polipéptido B3 se eligieron las siguientes enzimas proteolíticas.

-AspN: hidroliza el enlace peptídico que contiene al aminoácido aspartato, dejándolo a este como N-terminal del péptido, aunque en muchas ocasiones también hidroliza el enlace que contiene glutamato.

-LysC: hidroliza el enlace peptídico que contiene al aminoácido lisina, dejándolo a este como C-terminal del péptido.

-Tripsina: hidroliza el enlace peptídico luego de los aminoácidos lisina y arginina, dejándolos a estos como C-terminal del péptido.

Se eligió AspN, ya que digiere a B3 en 3 sitios, liberando 4 péptidos. De las proteasas disponibles es la que proporciona los péptidos más grandes. Luego se eligió LysC que produce 8 péptidos. Y por último se eligió tripsina por su capacidad de digerirla en péptidos más pequeños. En la Figura 25 se indican los sitios de corte de las distintas proteasas utilizadas. En las tablas 8, 9 y 10 se muestran los péptidos resultantes y sus PM.

La antigenicidad de la mezcla peptídica fue analizada mediante ELISA indirecto (Figura 26). Se observa que los tratamientos realizados logran disminuir la unión del antisuero, pero no eliminarla totalmente, lo cual indica que hubo una disminución de los epitopes inmunoreactivos.



Hidrólisis de la glicinina B3 con proteasas

AspN [D]



LysC [K]



Tripsina [K y R]



Figura 25: Sitios de hidrólisis de las proteasas AspN, LysC y tripsina sobre la glicinina B3.

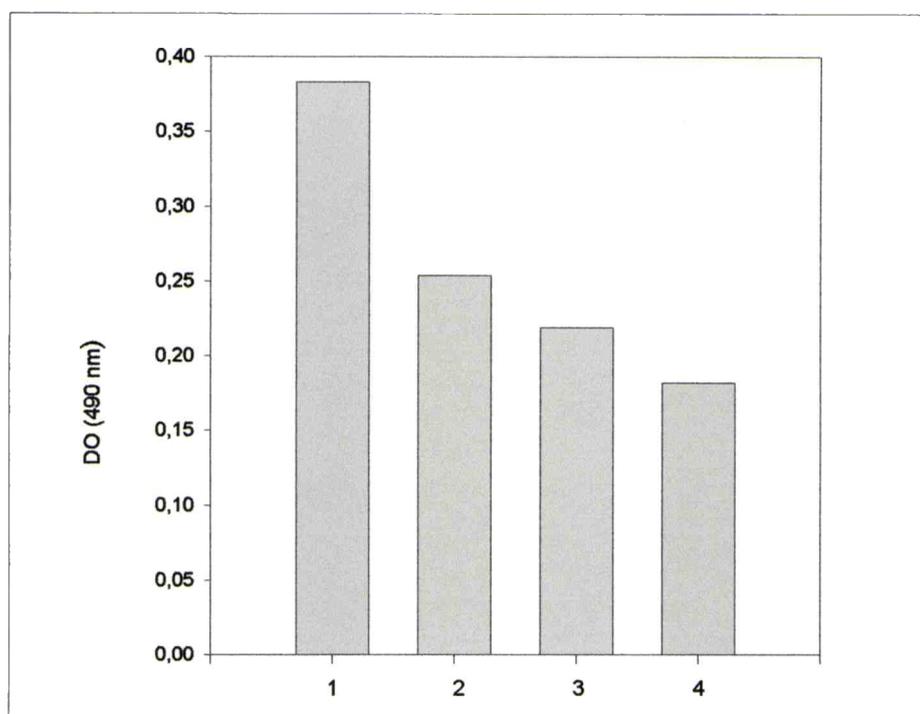


Figura 26: ELISA indirecto de los distintos hidrolizados con el antisuero. 1= sin proteasa, 2= tripsina, 3= AspN, 4= LysC.

Luego de la hidrólisis se realizó la separación de los péptidos y recolección de los mismos por FPLC de exclusión molecular. Para calibrar la columna se utilizaron los siguientes patrones de PM: β -lactoglobulina (Sigma), α -lactoalbúmina (Sigma), ciancobalamina (ICN), gastrina I (fragmento 14-17) (ICN), glicil-glicil-glicina (ICN). En la tabla 11 se muestran los pesos moleculares y los volúmenes de elución (V_e) de los patrones.

Tabla 11.- Datos de la calibración de la cromatografía de exclusión molecular.

Patrón	PM (Da)	Volumen de elución (ml)
β -lactoglobulina	18000	24,4
α -lactoalbúmina	14400	28,1
ciancobalamina	1355	50,5
gastrina I	595,7	74,6
glicil-glicil-glicina	189,7	78,2

El volumen muerto (V_m), determinado con Blue Dextrán fue de 22,7 ml. En la figura 27 se muestra el cromatograma obtenido con los patrones y la curva de calibración, determinada graficando $(V_e - V_m)/V_m$ versus PM.

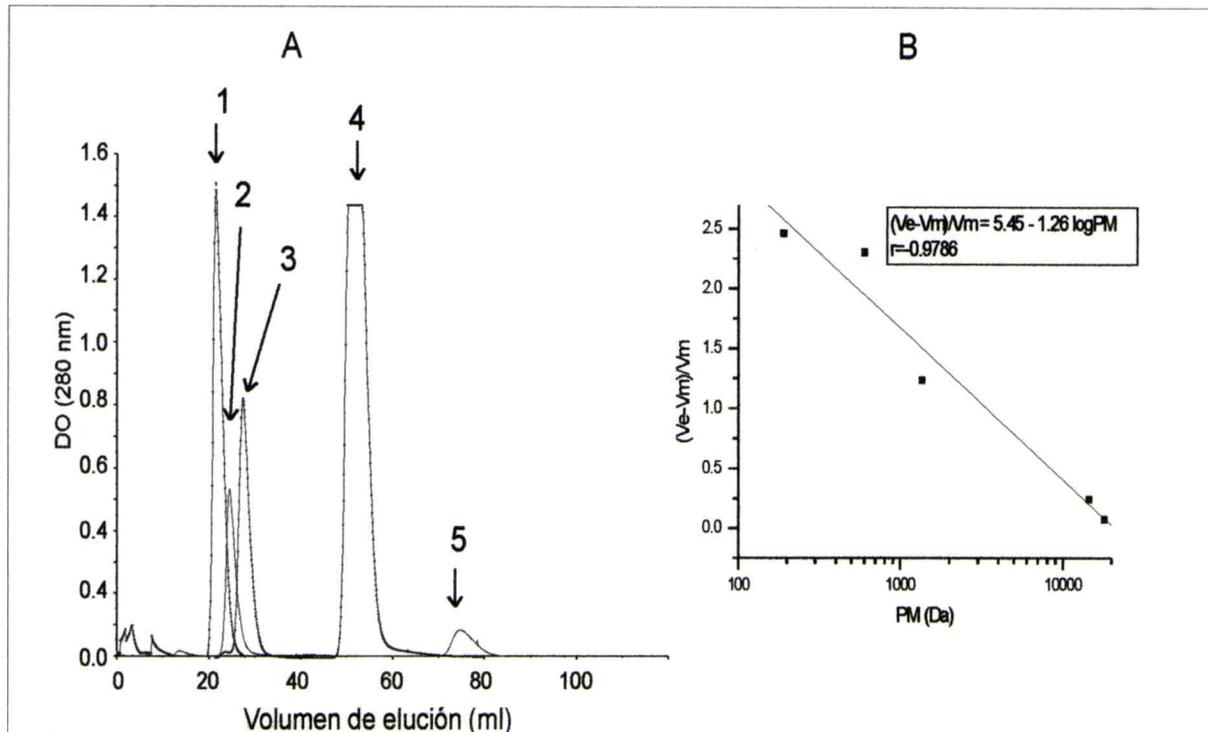


Figura 27: FPLC de exclusión molecular de los patrones de PM. A: Cromatograma correspondiente a la elución de los patrones. B: Curva de calibración para el cálculo del PM de las fracciones eluidas.

Los picos recolectados fueron analizados mediante ELISA indirecto revelando con el suero de conejo. En la figura 28 se observan los cromatogramas y las fracciones que son reconocidas por el antisuero. En todos los cromatogramas se observa un pico que eluye con el volumen de elución, que correspondería a restos de proteína sin hidrolizar.

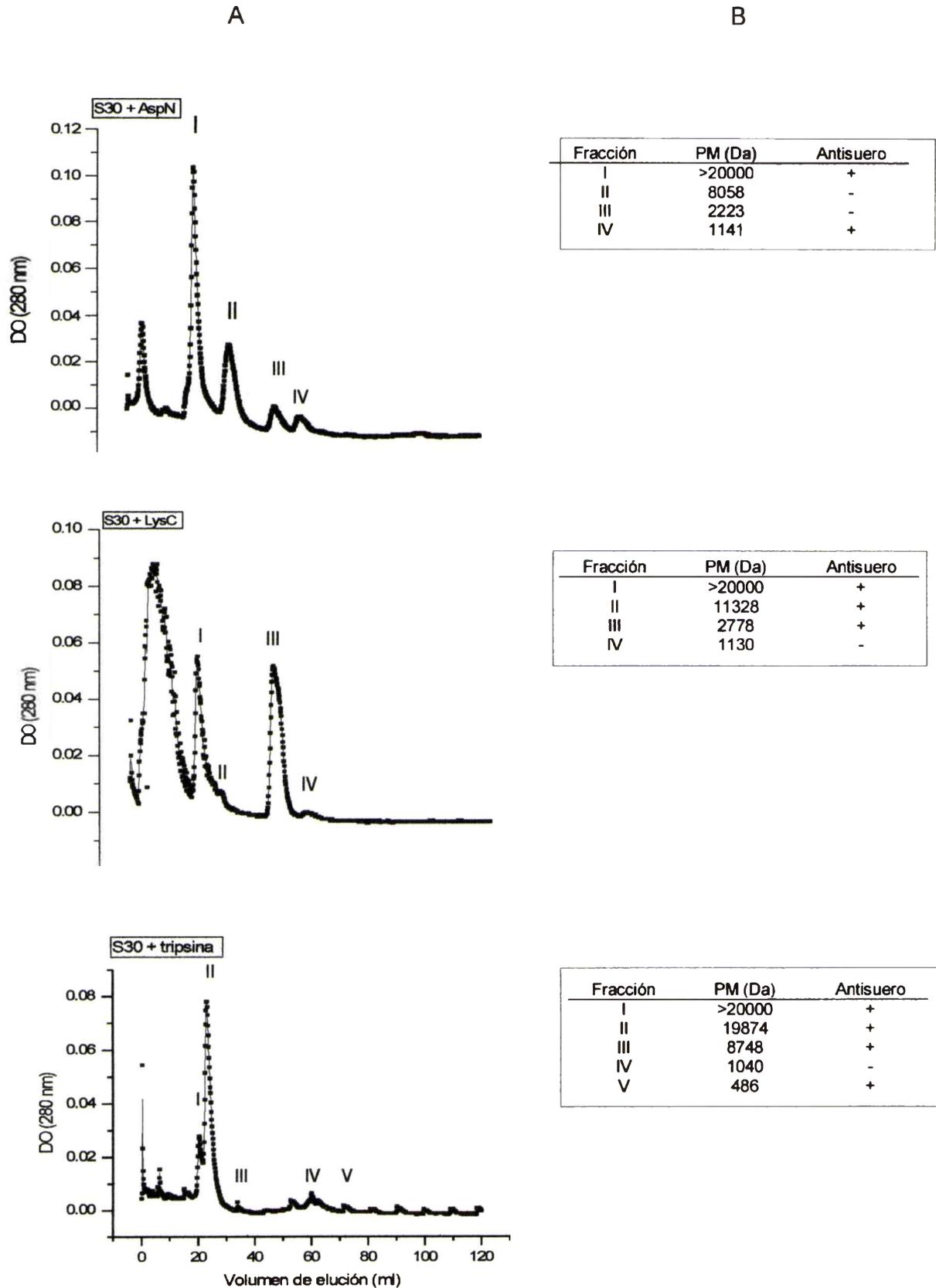


Figura 28: Separación por FPLC de los hidrolizados de S₃₀ con las proteasas AspN, LysC y tripsina y ELISA indirecto.

A: perfil cromatográfico y picos seleccionados

B: PM correspondiente a los componentes de cada fracción y resultados del ELISA indirecto revelado con el antisuero. +: DO mayor a 1,5; -: DO menor a 0,2 .

En el cromatograma correspondiente a la digestión de S₃₀ con Asp-N se observan tres fracciones II, III y IV, cuyos pesos moleculares son 8058, 2223 y 1141, de los cuales el único que es reconocido por el suero de conejo fue el IV. En la tabla 8 se muestra la secuencia de y los PM de los péptidos teóricos resultantes de la digestión de la glicinina B3 con AspN. Comparando los PM de las fracciones del FPLC con los péptidos teóricos, se observa que los péptidos con PM cercano al de la fracción IV son (tabla 8): 4-12, 13-21 y 137-144. Además se descartan como posibles los péptidos con PM correspondiente a los de las fracciones II y III, que serían los 22-92 de 7971 Da y 120-136 de 2050 Da (figura 29).

Tabla 8.- Secuencia y tamaño de los péptidos teóricos generados por la acción de la AspN* sobre la glicinina B3.

PM (Da)	Posición	Secuencia peptídica
1070.5663	4-12	ENICTLKLH
1013.5486	13-21	ENIARPSRA
7971.1819	22-92	DFYNPKAGRISTLNSLTLP//CQGNVAVF
1938.1283	95-111	ELRRGQLLVVPQNFVVA
2050.0756	120-136	EYIVFKTHHNAVTSYLK
904.4887	137-144	DVFRAIPS
1730.8820	145-159	EVLAHSYNLRQSQVS
552.3028	160-163	ELKY

* Se tomó como sitios de hidrólisis el aminoácido aspartato, y también el glutamato.

En la hidrólisis con LysC se separaron cuatro fracciones. El pico con PM cercano a 11kDa, podría contener péptidos derivados de la digestión parcial de B3, además de poder contener a A5, pero este último no produciría un resultado positivo en el ELISA. La fracción de PM 2778 es detectada por el suero de conejo, mientras que la de 1130 no. En base a la comparación con la digestión teórica del polipéptido B3 (tabla 9), surgen como candidatos los péptidos 57-80 y 137-162 por tener un PM cercano a 2778 Da, y se descartan el 1-10 y 126-136, cuyo PM es cercano a 1130 Da.

Tabla 9.- Secuencia y tamaño de los péptidos teóricos generados por la acción de la LysC sobre la glicinina B3.

PM (Da)	Posición	Secuencia peptídica
1105.5558	1-10	GVEENICTLK
2028.0409	11-27	LHENIARPSRADFYNP
3250.8310	28-56	AGRISTLNSLTLPALRQFQL SAQYVVLYK
2688.3641	57-80	NGIYSPHWNLNANSVIYVTR GQGK
5022.6046	81-125	VRVVCQGNVDFGELRR//QGFYIVFK
1270.6538	126-136	THHNAVTSYLK
2986.5744	137-162	DVFRAIPSEVLAHSYNLRQS QVSELK

Al analizar la hidrólisis con tripsina, el único péptido reconocido tiene un PM de 486 Da, las fracciones II y III corresponden a digestiones parciales. El único péptido teórico con PM similar es el 137-140 (Tabla 10).

A partir del análisis de los datos obtenidos con las tres proteasas utilizadas, surge que la región candidata a contener un epítopo secuencial de inmunoreactividad cruzada sería la de los aminoácidos 137-162, y se descarta como posible las regiones 4-12 y 120-136.

Tabla 10.- Secuencia y tamaño de los péptidos teóricos generados por la acción de la tripsina sobre la glicinina B3.

PM (Da)	Posición	Secuencia peptídica
1105.5558	1-10	GVEENICTLK
1192.6545	11-20	LHENIARPSR
854.4043	21-27	ADFYNPK
1398.8315	31-43	ISTLNSLTLPALR
1586.8577	44-56	QFQLSAQYVVLYK
2318.1676	57-76	NGIYSPHWNLNANSVIYVTR
1620.7798	83-97	VVNCQGNVDFGELR
3009.5720	99-125	GQLLVVPQNFVVAEQAGEQGFYIVFK
1270.6538	126-136	THHNAVTSYLK
536.2827	137-140	DVFR
1569.8383	141-154	AIPSEVLAHSYNLR
918.4891	155-162	QSQVSELK

Hidrólisis de la glicina B3 con proteasas. Comparación entre las fracciones del FPLC y péptidos teóricos.

AspN [D]

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
 GVEENICTLKHENIARPSRADFYNPKAGRISTLNSITLPAIRGFQLSAGWVYKNGYSPHNLNANSVYTRGGGKRVWVNCGGNAVFDGELRRGQLLWPGNFWAEGAGEGGFVYFKTHHNAVTSYLDVFRAPSEVLAHSYNLRQSGVSELKY

LysC [K]

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
 GVEENICTLKHENIARPSRADFYNPKAGRISTLNSITLPAIRGFQLSAGWVYKNGYSPHNLNANSVYTRGGGKRVWVNCGGNAVFDGELRRGQLLWPGNFWAEGAGEGGFVYFKTHHNAVTSYLDVFRAPSEVLAHSYNLRQSGVSELKY

Tripsina [K y R]

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
 GVEENICTLKHENIARPSRADFYNPKAGRISTLNSITLPAIRGFQLSAGWVYKNGYSPHNLNANSVYTRGGGKRVWVNCGGNAVFDGELRRGQLLWPGNFWAEGAGEGGFVYFKTHHNAVTSYLDVFRAPSEVLAHSYNLRQSGVSELKY

Figura 29: Comparación en base al PM de los péptidos teóricos generados por la acción de las proteasas AspN, LysC y tripsina sobre la glicina B3, con las fracciones obtenidas por FPLC.

■ : fracciones reconocidas por el suero de conejo ■ : fracciones NO reconocidas por el suero de conejo.

III.4- Producción de anticuerpos monoclonales específicos para S₃₀

Se realizó un plan de inmunización de ratones con S₃₀. El título de los sueros se siguió mediante un ELISA indirecto. Para la fusión se utilizó el ratón con mayor título de anticuerpos específicos. El screening de las fosas para identificar a los hibridomas secretores de anticuerpos específicos, se realizó por ELISA indirecto e inmunoblotting (Figura 30). Se seleccionaron así 2 de los 6 hibridomas obtenidos que eran productores de anticuerpos monoclonales específicos para S₃₀: So-2C1-I y So-5G8-I.

Por ELISA de captura con los correspondientes anticuerpos anti-isotipo murino, se pudo establecer que los dos anticuerpos seleccionados son IgG₁.

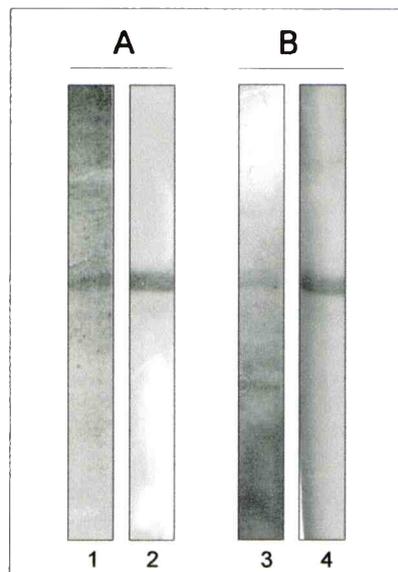


Figura 30: Inmunoblotting de soja (1 y 3) y S₃₀ (2 y 4) revelados con los AcMo anti-S₃₀ 2C1-I (A) y 5G8-I (B).

Ambos anticuerpos tienen la capacidad de reconocer proteínas de leche bovina por ELISA indirecto (datos no mostrados). Se realizó un ELISA de inhibición (Figura 31) de la unión de los AcMo a S₃₀ como antígeno inmovilizado en la placa, por medio de S₃₀ y leche de vaca en fase fluida. Por medio de este ensayo se observa que los anticuerpos preincubados con S₃₀ no son inhibidos de reaccionar con S₃₀ unido a la placa. Mientras que las proteínas de leche de vaca son capaces de inhibir completamente a ambos anticuerpos en dicho ensayo. Posiblemente estos anticuerpos estén reconociendo en S₃₀

epitopes que son expuestos en fase sólida y que en solución podrían estar en el interior de la estructura proteica, o de lo contrario, pueden tener diferencias en la afinidad.

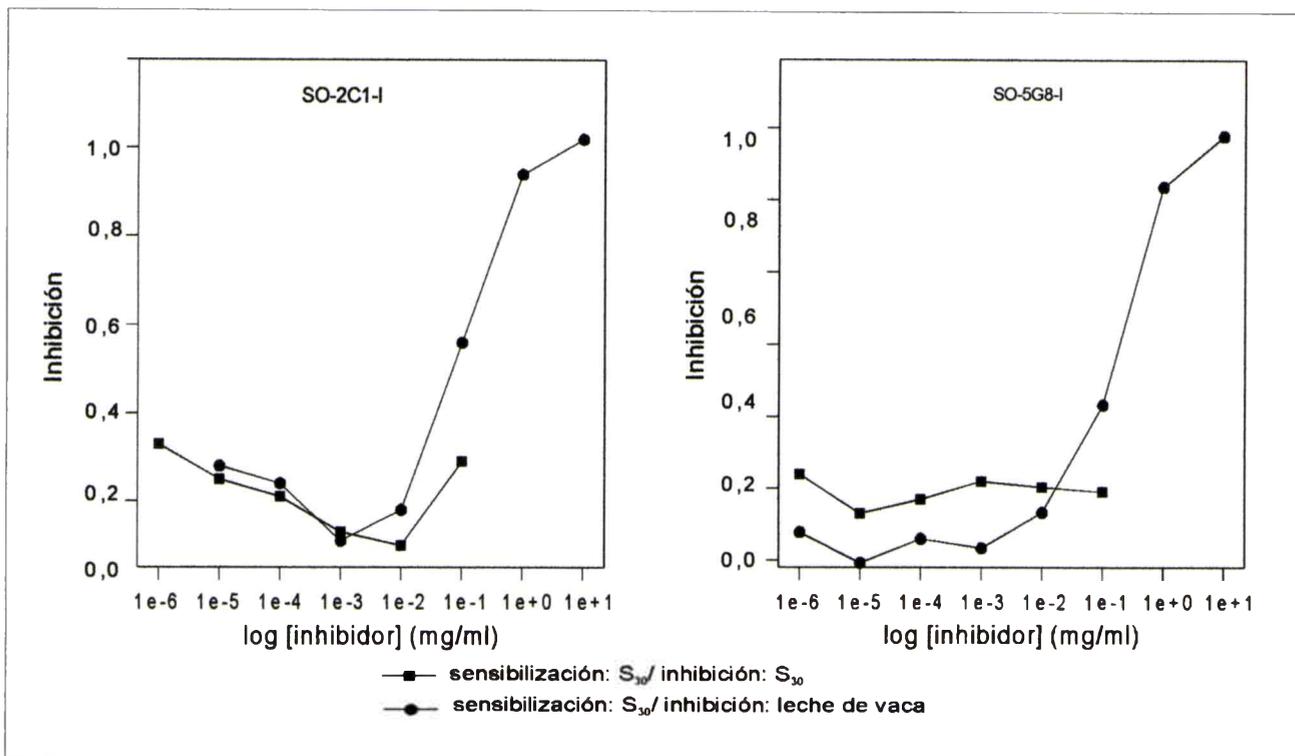


Figura 31: Inhibición de la unión de los AcMo 2C1-I y 5G8-I a S₃₀, utilizando como inhibidor S₃₀ y leche de vaca.

III.5- Caracterización *in vitro* de la alergenicidad de proteínas de soja en pacientes alérgicos a leche de vaca

Se analizó la presencia de IgE específica para componentes de soja en el suero de pacientes alérgicos a leche de vaca, previamente empleados en el análisis de la alergenicidad *in vitro* de la leche de vaca, mediante tres métodos inmunoenzimáticos: EAST, ELISA e inmunoblotting.

III.5.a- EAST

Se analizó la presencia de IgE específica contra extractos de leche de vaca y leche de soja en el suero de pacientes alérgicos a leche de vaca y en el pool de sueros de esos mismos pacientes (control positivo), mediante EAST. Se utilizaron como control negativo suero de 50 pacientes sanos. En la tabla 12 se presentan los resultados en clases



correspondientes a los controles positivo, negativo y 9 sueros de pacientes alérgicos a leche de vaca.

Tabla 12- EAST para la determinación de IgE específica para leches de vaca y soja.

Suero	IgE específica por EAST (en clases)	
	leche de vaca	Soja
Control negativo	0	0
Control positivo	4	3
Suero 1	2	2
Suero 2	2	2
Suero 3	2	2
Suero 4	3	2
Suero 5	4	3
Suero 6	2	2
Suero 7	4	4
Suero 8	4	4
Suero 9	4	3

Como control negativo se utilizaron sueros de 50 individuos sanos (todos mostraron un resultado equivalente). Como control positivo se utilizó un pool de suero de pacientes alérgicos a leche de vaca.

Se detecta IgE específica para soja en todos los sueros analizados y en el control positivo, mientras que en el suero de todos los individuos sanos la reactividad es de clase 0 para ambos extractos. La reactividad para soja fue siempre clase 2 o mayor, aunque en algunos casos menor que para leche bovina.

III.5.b- ELISA

Se analizó en el suero de pacientes alérgicos a leche de vaca la presencia de IgE e IgG específicas para leche de vaca y soja, mediante ELISA indirecto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.



Se observa que las DO correspondientes a la determinación de IgE específica para leche de vaca y soja en todos los sueros de pacientes ensayados son mayores que las obtenidas con los sueros control negativo. En cambio, no se observan diferencias al medir la IgG específica para leche de vaca y soja entre los sueros de los pacientes alérgicos y los sueros control negativo.

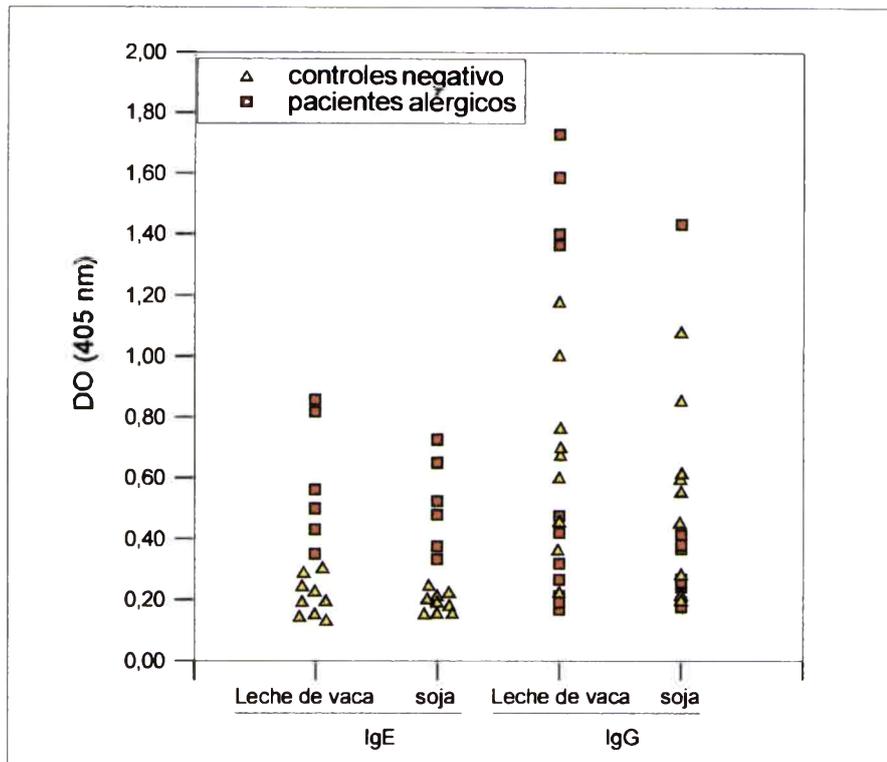


Figura 32: Detección de IgE e IgG específicas para leche de vaca y soja, mediante ELISA indirecto.

III.5.c- Inmunoblotting

La especificidad de reconocimiento de la IgE e IgG de los sueros detectados por EAST y ELISA fue analizada mediante inmunoblotting. Los resultados se muestran en la Figura 33.

En el inmunoblotting del extracto de leche bovina se observa un patrón de reactividad IgG equivalente al comparar los resultados obtenidos con los pool de sueros negativo y positivos. Principalmente se detectan bandas en la región de agregados de alto PM (micelas de caseína). Por otra parte, se encuentra IgE específica tanto para

micelas de caseínas, como para los monómeros (α , β u κ -caseína) en los sueros de los pacientes, mientras que no se detecta reconocimiento por parte del control negativo. Al analizar la reactividad IgG contra proteínas de soja por inmunoblotting se observan patrones de reconocimiento similares entre el pool de sueros control negativo y de los pacientes alérgicos a leche de vaca. Las proteínas de soja reconocidas por la IgG tienen PM relativos en las zonas de 30; 40; 42,3 y 47 kDa. Por otra parte es reconocida por la IgE sérica de pacientes alérgicos a leche de vaca sólo una proteína de soja de 30 kDa. En el control negativo, no se detecta la presencia de IgE específica para proteínas de soja.

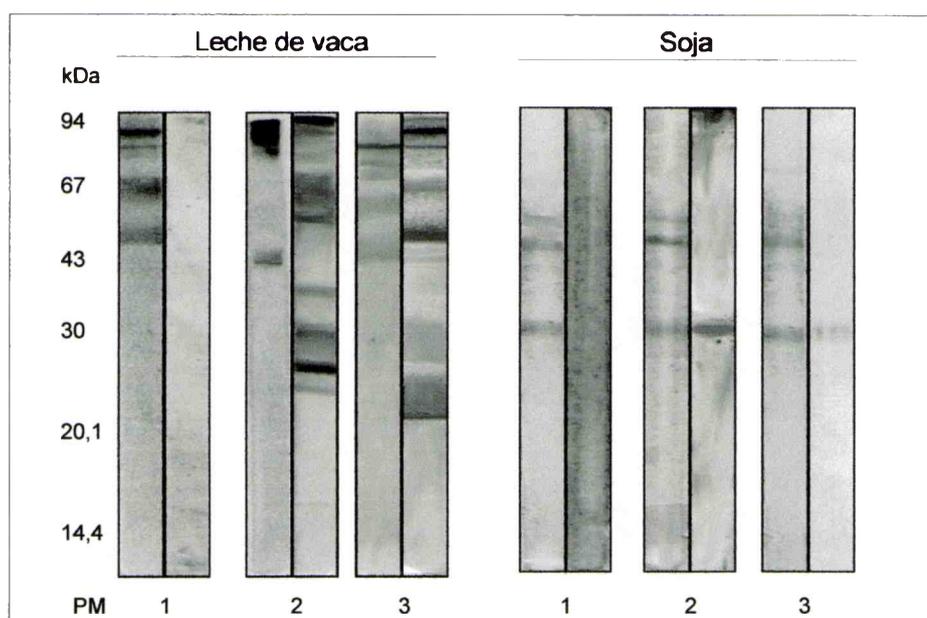


Figura 33: Detección de IgE (derecha) e IgG (izquierda) específicas para leches de vaca y soja, mediante inmunoblotting. 1= control negativo (pool de suero de pacientes sanos); 2 y 3= pool de suero de pacientes alérgicos a leche de vaca.

III.5.d- Alergenicidad de soja y S_{30} por métodos *in vivo* e *in vitro*

Se realizó un estudio en pacientes que concurrían al Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios para su asistencia. El estudio comprendió 23 pacientes alérgicos a leche de vaca y 37 controles sanos, comparables de acuerdo a edad y sexo (Tabla 13).

Tabla 13.- Edad, IgE total y resultado de pruebas cutáneas de pacientes del estudio de alergenidad de soja y S₃₀

Paciente	Edad (años)	IgE total (UI/ml)	Prueba cutánea		
			Leche de vaca	soja	S ₃₀
Pacientes alérgicos a leche de vaca, que consumieron leche de soja					
1	5	360	+	-	-
2	4	1155	-	+	+
3	11	390	-	-	-
4	5	122	-	-	+
5	5	140	-	-	+
6	8	58	-	-	+
7	13	86	-	+	+
8	6	908	-	+	-
9	8 meses	82	ND	ND	ND
10	11	805	+	-	-
11	10	736	-	-	-
12	8	410	-	-	-
13	11	95	-	-	+
14	5	248	+	-	+
15	11	88	-	+	-
16	9	606	+	-	-
17	7	329	-	-	-
18	10	489	+	+	+
Pacientes alérgicos a leche de vaca, que NO consumieron leche de soja					
1	7	3263	-	-	+
2	5	857	+	+	+
3	2	175	ND	ND	ND
4	9	30	+	+	+
5	3	87	+	+	+
Controles					
1	1	80	ND	ND	ND
2	7	984	-	-	+
3	5	655	+	-	-
4	9	831	-	-	-
5	13	280	-	-	-
6	5	310	-	-	-
7	9	540	-	-	-

Los pacientes se encuentran divididos en 3 grupos: alérgicos a leche de vaca que consumieron soja, alérgicos a leche de vaca que NO consumieron soja y controles (pacientes alérgicos, con IgE total elevada, alérgicos a alimentos diferentes de la leche de vaca). Sólo se muestra el resultado de 7 controles representativos. ND: no determinado, debido a que la edad era menor de 3 años.



La edad media en los pacientes fue de 7,1 años (de 8 meses a 13 años) y la de los controles 6,8 años (de 1 a 14 años). Todos los pacientes seleccionados tenían IgE total elevada de acuerdo a su edad. Los controles eran pacientes con IgE total sérica elevada, pero sin IgE específica para leche de vaca. De los 23 pacientes alérgicos, 18 habían consumido leche de soja como sustituto y 5 no. En estos últimos, durante el período de lactancia materna, la dieta de la madre era libre de proteínas de soja.

Las pruebas cutáneas resultan positivas para leche de vaca sólo en algunos de los pacientes alérgicos a leche de vaca (8/23). El mismo número de pacientes muestra resultados positivos con el extracto de soja (8/23), mientras que 12/23 con S_{30} . Entre los pacientes cuyo tratamiento incluyó alimentos a base de proteínas de soja, no encontramos correlación entre la positividad de las pruebas cutáneas para los 3 extractos analizados, sin embargo, entre los que no fueron alimentados con soja, se observó que los pacientes con pruebas positivas para leche bovina, también resultaron positivas para soja y S_{30} . Las pruebas con el extracto puro de S_{30} mostraron una mayor cantidad de resultados positivos, resultando positiva en 4/5 pacientes alérgicos que no habían consumido soja anteriormente, resultando una prueba más sensible que la prueba cutánea con el extracto completo de soja.

Por medio del ELISA se observó que el nivel de IgG para los distintos extractos era del mismo orden en pacientes alérgicos y controles. Tampoco se observó diferencia en el reconocimiento de la IgG por medio del inmunoblotting (datos no mostrados). En el análisis de IgE específica por ELISA (Figura 34), la mayoría de los valores de DO (excepto un caso) para los alérgicos es mayor que el cut-off. Sensibilizando la fase sólida con S_{30} , se obtuvieron valores de DO mayores que con leche de vaca o soja.

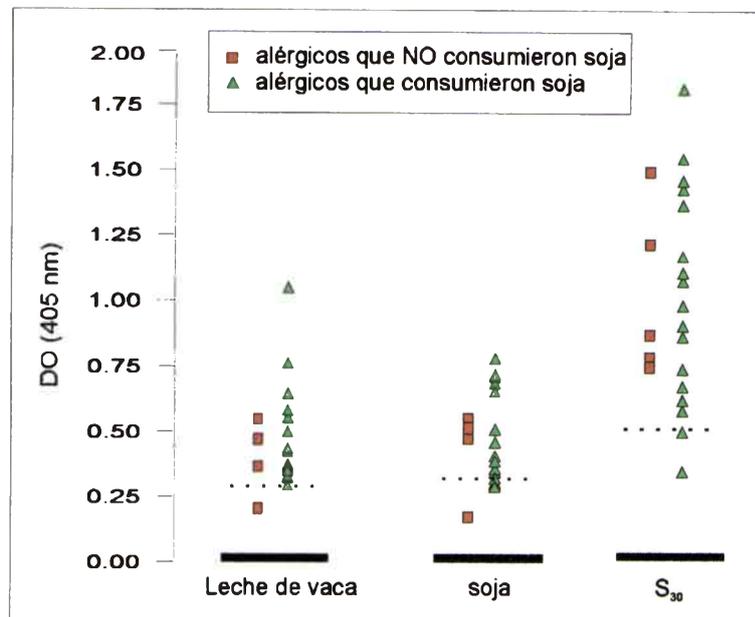


Figura 34: Determinación de IgE específica para leche de vaca, leche de soja y S₃₀ por ELISA en el suero de los pacientes que se incluyeron en el estudio.

III.6- Discusión

En nuestro laboratorio hemos detectado la existencia de reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca (origen animal) y proteínas de soja (origen vegetal). Este es el primer informe que muestra la detección de reactividad cruzada entre proteínas de ambos sistemas (Rozenfeld, 2002).

Mediante la preparación de leche de soja a partir de porotos, se descartó la existencia posible de contaminación con leche de vaca de las fórmulas a base de proteínas de soja comerciales, lo cual corrobora la existencia de anticuerpos del suero de conejo específico de leche de vaca que también reconocen proteínas de soja. Esa población de anticuerpos de cruce es pequeña, dada la diferencia en el título del antisuero para leche de vaca (1/300000) y soja (1/1000). Además en el ELISA de inhibición, se necesitó una concentración de proteínas de soja 6000 veces mayor que de leche de vaca para lograr el 50% de inhibición del antisuero a proteínas de leche de vaca.

En el primer ensayo de inhibición (Figura 10A) la cantidad de proteínas de leche de vaca necesaria para lograr el 50% de inhibición fue menor que la de proteínas de



soja. Esto se debe a que la leche de vaca contiene todos los antígenos necesarios para inhibir las interacciones posibles entre los anticuerpos y el antígeno homólogo. En cambio, el extracto de soja contiene una menor cantidad de componentes capaces de reaccionar con los anticuerpos. O sea, solamente una pequeña población de anticuerpos son capaces de reconocer componentes presentes en el extracto de soja, y por ello fue necesaria una cantidad mayor de este extracto para lograr la misma inhibición. Por otra parte, en el segundo ensayo (Figura 10B), se están evaluando sólo aquellos anticuerpos capaces de reconocer los componentes de soja. Aquellas reacciones antígeno-anticuerpo no relacionadas con los anticuerpos de cruce no están siendo detectadas, puede ser por ello que la cantidad de proteínas de leche de vaca necesaria para lograr el 50% de inhibición fue mayor que la cantidad de proteínas de soja. También puede deberse a diferencias de avidéz del antisuero según el antígeno esté en fase sólida o líquida.

Por medio de inmunoblotting, encontramos que la proteína de soja que cruza tiene un PM de 30 kDa, y que se encuentra tanto en los aislados de suero como de precipitado ácido de leche de soja. Anticuerpos monoclonales anti-caseína desarrollados en nuestro laboratorio, reconocen también la proteína de 30 kDa.

La identificación de la proteína de cruce se realizó mediante secuenciación, arrojando como resultado que está formada por 2 polipéptidos, las glicininas A5 (10 kDa) y B3 (18 kDa). En el poroto de soja las glicininas se encuentran formando hexámeros, donde cada subunidad está formada por 2 cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro, llamadas cadena A (por tener pl ácido) y B (por tener pl básico). El PM de A se encuentra entre 30 y 40kDa y el de B alrededor de 20kDa. Hay una excepción, la subunidad A5A4B3 formada por 3 polipéptidos, donde A5 tiene un PM menor (10 kDa), y es el que se encuentra unido a B3 mediante el puente disulfuro, mientras que A4 está unido por uniones hidrofóbicas. La proteína de 30 kDa por nosotros aislada que muestra inmunoreactividad cruzada con caseínas de leche de vaca es, entonces, el dímero A5B3.

Tanto el suero policlonal de conejo como los AcMo reconocen sólo la glicinina B3, siendo entonces este último el componente que muestra inmunoreactividad cruzada. Las globulinas 11S de soja son proteínas no glicosiladas, por lo tanto el epítoto que estaría siendo reconocido por los anticuerpos de cruce del antisuero de conejo no

involucraría el reconocimiento de hidratos de carbono. Además sólo la κ -caseína contiene hidratos de carbono.

Dicha población de anticuerpos, aislada mediante inmunoafinidad del suero de conejo, sería específica para diversas proteínas de leche de vaca, entre las cuales están las 3 caseínas, sobre todo α y κ , y la β -lactoglobulina. Por comparación entre las secuencias primarias, se encontró la mayor similitud con estas mismas 3 proteínas de leche de vaca. Esas zonas de alta similitud son partes diferentes de la molécula de la glicinina B3, o sea, no se encontró que exista una única zona que sea similar a todas las proteínas de leche de vaca. Esto concuerda con el hecho de que 3 anticuerpos monoclonales anti-caseína distintos reconocen a la misma proteína del extracto de soja. La subunidad A5A4B3 presenta alta similitud de secuencia primaria (83,7%) con la subunidad A3B4. Sin embargo, sus componentes no fueron detectados mediante los distintos análisis de reactividad cruzada realizados, probablemente, debido a alguna pequeña diferencia de secuencia primaria o de su conformación espacial.

Mediante la hidrólisis de la glicinina B3 se intentó realizar un estudio de epitopes secuenciales inmunorreactivos. A partir de este estudio surge la zona C-terminal de la glicinina B3 como candidata a contener un epitope secuencial de reactividad cruzada. La confirmación de este dato debería realizarse mediante la secuenciación de las fracciones aisladas por FPLC o mediante la síntesis de péptidos solapados que abarquen toda la molécula.

Se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales específicos de la glicinina A5B3. La unión de ambos anticuerpos monoclonales fue inhibida por un extracto de leche de vaca. Esto indicaría que estos anticuerpos reconocen epitopes de cruce de la glicinina.

La presencia de un componente de cruce presente en la leche de soja podría resultar de importancia clínica en pacientes alérgicos a leche bovina que utilizan este alimento como sustituto dietario para su alergia, aunque la concentración de ese componente sea baja. La alergia a soja está aumentando debido a la mayor utilización de fórmulas a base de soja como sustituto de la leche de vaca y a la mayor inclusión de proteínas de soja en alimentos procesados. Fuera de la población de riesgo de alergia a leche de vaca la ingestión de proteínas de soja se ha incrementado notablemente en los últimos años por su inclusión como aditivo gracias a las propiedades funcionales que presentan estas proteínas. Otro de los inconvenientes a tener en cuenta es que el

etiquetado de muchos productos alimenticios es deficiente en cuanto a la información sobre sus componentes. Por lo tanto al desconocerse la existencia de estas proteínas en su composición estarían exponiéndose a este tipo de alérgenos, hecho que puede resultar grave en individuos sensibilizados.

Han sido descritas reactividades cruzadas entre distintos alérgenos alimentarios o entre alérgenos de alimentos y de otros orígenes. En algunos casos los alérgenos alimentarios están filogenéticamente relacionados (legumbres, pescados, crustáceos, frutas) (Halmepuro, 1987), pero en otros, no hay relación o esa relación es muy lejana. Un ejemplo muy común de este último caso son las reacciones cruzadas entre alimentos y pólenes ((Ebner, 1996; Calkhoven, 1987). La relevancia clínica de esta reactividad cruzada depende del alimento en cuestión. El cruce observado *in vitro* entre crustáceos trae consecuencias clínicas, dado que personas alérgicas a camarón tienen reacciones adversas luego de consumir langosta y centolla (Daul, 1987). En cambio, la reactividad para legumbres detectada *in vitro* en pacientes alérgicos a maní no produce síntomas clínicos (Bernhisel-Broadbent, 1989). Por lo tanto, la inmunoreactividad observada *in vitro* por parte de la IgE no siempre se correlaciona con la clínica, por lo que debe confirmarse mediante un reto alimentario.

Las implicancias clínicas de la reactividad cruzada observada en nuestro estudio deberían estudiarse mediante pruebas de desafío con leche de soja o un aislado de S₃₀ en pacientes alérgicos a leche de vaca, diagnosticados también por la prueba de desafío a doble ciego. En nuestro medio este análisis no se lleva a cabo porque se requiere mucho tiempo de la familia y el personal médico durante el test, y además es muy difícil realizar el seguimiento de dichos pacientes.

Se detectó la presencia de anticuerpos séricos IgE e IgG específicos para proteínas de soja en suero de pacientes alérgicos a leche bovina. El nivel de IgE específica para soja, determinado por ELISA y EAST, fue del mismo orden que para leche bovina, y en ambos casos, mayor al de los sueros control negativo. En cuanto al nivel de IgG, no se observó diferencias con respecto al control negativo. La especificidad de los dos isotipos de inmunoglobulinas determinada por inmunoblotting es diferente, tanto para proteínas de leche bovina como de soja. Mientras que la IgG reconoce micelas de caseína de leche bovina, la IgE también reconoce los monómeros de caseína; y en cuanto a las proteínas de soja, se observó que la IgG reconoce un mayor espectro de proteínas de soja, y la IgE

principalmente una proteína de 30 kDa. Estos resultados concuerdan con otros estudios anteriores (Chandra, 1991, Rugo, 1992, Dean, 1993), donde encontraron por RAST IgE específica para proteínas de soja en pacientes que fueron alimentados sólo con leche de vaca. Esto podría tener dos explicaciones posibles: coexistencia de alergia a soja y leche de vaca o reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y soja. Rugo y Dean (Rugo, 1992, Dean, 1993) encontraron que fórmulas a base de soja lograron inhibir la unión de IgE a proteínas de leche de vaca, con lo cual suponen la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas de ambos orígenes.

Se realizó un estudio con el fin de analizar la alergenicidad de soja y S₃₀ mediante análisis inmunoenzimáticos *in vitro* (IgE específica) y pruebas cutáneas. Por medio de este estudio, se detectó la presencia de IgE específica para soja y S₃₀ en pacientes alérgicos a leche de vaca, aún en aquellos que nunca habían estado en contacto con soja. En alguno de los casos se observaron resultados positivos por prueba cutánea, indicando que la IgE unida a la superficie de los mastocitos es capaz de reconocer S₃₀. Estos resultados estarían indicando que a nivel de IgE también existiría reactividad cruzada entre leche de vaca y soja, y que S₃₀ estaría implicada en esta inmunorreactividad.

Han aparecido en la bibliografía internacional varios trabajos indicando una alta alergenicidad de fórmulas a base de soja, de entre el 3-47 % (Gerrard, 1973; Kuitunen, 1975; Jakobsson, 1979; Freier, 1988; Bishop, 1990). En todos estos estudios el diagnóstico se basa en informes de los padres o en la clínica. En esos años aún no estaba establecido la necesidad de realizar el diagnóstico de alergia alimentaria mediante la prueba de desafío. Por ello, en general estaba sobrevaluada la incidencia de alergia a soja en pacientes alérgicos a leche de vaca.

Son pocos los trabajos (Sampson, 1988a; Giampietro, 1992; Bruno, 1997) donde el diagnóstico se hizo mediante el reto alimentario a doble ciego, y encontraron que sólo entre 1-5% de niños con sospecha de alergia alimentaria eran alérgicos a soja. Por lo tanto concluyen que la alergia a soja no es tan común como se creía anteriormente. Existe un solo estudio en bibliografía (Bock, 1990) donde analizaron la incidencia de alergia a soja en niños alérgicos a leche bovina, realizando la prueba de desafío con leche de vaca y soja. Bock y col observaron que 7% de niños alérgicos a leche de vaca tenían síntomas al hacer la prueba de desafío con soja.

CONCLUSIONES



A partir de los resultados hallados mediante este trabajo de tesis, podemos concluir lo siguiente:

- Las proteínas presentes en leche de oveja, cabra y búfalo mostraron reactividad cruzada con las de leche bovina. Esta reacción fue más importante a nivel de las caseínas, principal alérgeno de la leche de vaca. Dichas proteínas también fueron capaces de unir la IgE sérica de pacientes alérgicos a leche de vaca que nunca habían consumido leche proveniente de otro mamífero.
- Las proteínas de la leche de yegua y humana mostraron una baja reactividad cruzada con leche de vaca, y el reconocimiento por parte de la IgE sérica es despreciable.
- Los hidrolizados parciales de proteínas de leche de vaca mostraron mayor nivel de proteínas intactas y polipéptidos residuales que los hidrolizados extensivos. Y además, se detectó contaminación con caseína en hidrolizados parciales a base de suero.
- En todos los hidrolizados de proteínas de leche bovina que fueron analizados, tanto los parciales como extensivos, se observó la existencia de epitopes alérgicos.
- Se detectó la existencia de reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca (origen animal) y proteínas de soja (origen vegetal). Este es el primer reporte que muestra la detección de reactividad cruzada entre proteínas de ambos sistemas.
- Demostramos que la proteína de cruce proveniente de la leche de soja corresponde a una glicinina que posee una MM de 30 kDa (S_{30}), y un pI de 5,2. Mediante su secuenciación se determinó que S_{30} es la glicinina A5B3. Por análisis electroforéticos en condiciones reductoras, se observó que B3 es el polipéptido que presenta el/los epitopes de cruce.
- Además mostramos que el polipéptido B3 es reconocido por tres anticuerpos monoclonales específicos de distintas caseínas. Por lo tanto, las caseínas de la leche de vaca estarían comprometidas en dicha reactividad cruzada. Los anticuerpos del antisuero de conejo específicos de S_{30} , aislados por cromatografía de inmunoafinidad, reconocieron a las caseínas bovinas y también β -lactoglobulina.
- Mediante proteólisis de S_{30} con tres proteasas de diferente especificidad, se mostró que el extremo C-terminal del polipéptido B3 contendría un epitope de cruce.

- Se determinó que suero de pacientes alérgicos a leche de vaca contenían IgE específica para soja, en particular para la glicinina A5B3
- También demostramos que en el suero de pacientes que no consumieron soja como sustituto lácteo se detectó IgE específica para la glicinina A5B3, indicando la existencia de reactividad cruzada a nivel de la IgE sérica. La mayoría de estos pacientes son positivos a las pruebas cutáneas positivas con dicha proteína, indicando que los mastocitos presentes en la piel tienen IgE específica para dicha proteína.

BIBLIOGRAFIA



- Aberg N, Hesselman B, Aberg B, Eriksson B. 1995. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy*, 25: 815-819.
- Alexandrescu AT, Evans PA, Pitkeathly M, Baum J, Dobson CM. 1993. Structure and dynamics of the acid-denatures molten globule state of α -lactalbumin: a two-dimensional NMR study. *Biochemistry (Easton)*, 32: 1707-1718.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-738.
- Alm JS, Swartz J, Lilia G, Scheynius A, Pershagen G. 1999. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet*, 353: 1485-1488.
- Almawi WY, Hess DA, Rieder MJ. 1998. Multiplicity of glucocorticoid action in inhibiting allograft rejection. *Cell Trasplant*, 7: 511-523.
- Anonymous. 1989. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: Hypoallergenic infants formulas. *Pediatrics*, 83: 1068-1069.
- Atkinson HA, Miller K. 1994. Assessment [correction of Aesessment] of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology*, 91: 281-288.
- Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. 1998. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol*, 115: 257-269.
- Bagley CJ, Lopez AF, Vadas MA. 1997. New frontiers for IL-5. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 725-728.
- Bai TR. 1997. Adrenergic agonists and antagonists. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases*. vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd, 568-583.
- Barnes PJ. 1997. Glucocorticosteroids. En: *Allergy and allergic diseases*. vol 1. Kay AB, ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 619-641.
- Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu JY, Juo SH, Nizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG, Beaty DH. 1999. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 485-491.
- Behrendt H, Friedrichs K, Kramer U. 1995. The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases. En: *Progress in Allergy and Clinical Immunology*. Johansson S, ed. Berne: Hogrefe & Huber, 83-89.
- Bell RG. 1996. IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol*, 74: 337-345.
- Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L. 1999. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 103, 1191-1194.
- Bernard, Creminon C, Yvon M, Wal JM. 1998. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 235-244.
- Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. 1989. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 8:435-40.
- Bertino E, Prandi GM, Fabris C, Cavaletto M, Di Martino S, Cardaropoli S, Calderone V, Conti A. 1996. Human milk proteins may interfere in ELISA measurements of bovine β -lactoglobulin in human milk. *Acta Paediatr*, 85: 543-549.
- Bibi H, Shoseyov D, Feigenbaum D, Nir P, Shiachi R, Scharff S, Peled R. 2002. Comparison of positive allergy skin tests among asthmatic children from rural and urban areas living within small geographic area. *Annals of Allergy*, 88: 416-420.
- Bishop JM, Hill DJ, Hoskin CS. 1990. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediatr*, 116: 862-867.
- Bjorkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy*, 29: 342-346.
- Bleumink E, Young E. 1968. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int Arch Allergy*, 34: 521-543.
- Bochner BS, Lichtenstein LM. 1991. Anaphylaxis. *N Engl J Med*, 324: 1785-1790
- Bock SA. 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Pediatrics*, 79: 683-688.
- Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD. 1988. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol*, 82: 986-997.
- Bock SA, Atkins FM. 1990. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr*, 4: 561-567.

- Bock SA. 1996. Food challenges in the diagnosis of food hypersensitivity. *Nestlé Nutr Workshop Ser*, 34: 105-117.
- Bottcher M, Jenmalm MC, Garofalo RP, Bjorksten B. 2000. Cytokines in breast milk from allergic and non-allergic mothers. *Pediatr Res*, 47: 157-162.
- Bresson JL, Pang KY, Walker WA. 1984. Microvillus membrane differentiation: quantitative difference in cholera toxin binding to the intestinal surface of newborn and adult rabbits. *Pediatr Res*, 18: 984-987.
- Broide DH, Sriramarao P. 2001. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev*, 179: 163-172.
- Bruijnzeel-Koomen CAFM, Ortolani C, Aas K, Bindsvlev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D, Wuthrich B. 1995. Adverse reactions to food. Position paper. *Allergy*, 50: 623-636.
- Bruin-Weller MS, Knol EF, Bruijnzeel-Koomen CAFM. 1999: Atopy patch testing-a diagnostic tool? *Allergy* 54, 784-791.
- Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. 1993. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med*, 177: 605-11.
- Bruno G, Giampietro PG, Del Guercio Md, Gallia P, Giovannini L, Lovati C, Paolucci P, Quaglio L, Zoratto E, Businco L. 1997. Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 8, 190-193.
- Burgio GR, Lanzavecchia A, Plebani A, Jayakar S, Ugazio AG. 1980. Ontogeny of secretory immunity: levels of secretory IgA and natural antibodies in saliva. *Pediatr Res*, 14: 1111-1114.
- Burks AW, Brooks JR, Sampson HA. 1988. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol* 81, 1135-1142.
- Burks AW, James JM, Hiegel A, Wilson G, Wheeler JG, Jones SM, Zuerlein N. 1998. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *J. Pediatr* 132, 132-136.
- Bush RK, Schroeckenstein D, Meiner-Davis S, Balmes J, Rempel D. 1988. Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol*, 82: 251-255.
- Businco L, Cantani A, Longhi A, Giampietro PG. 1989. Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfa-Ré, Nestle) in infants with cow's milk allergy. *Ann Allergy* 62, 333-335.
- Businco L, Dreborg S, Einarsson R, Giampietro PG, Host A, Keller KM, Strobel S, Wahn U. 1993. Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. An ESPACI position paper. *Pediatr Allergy Immunol.* 4, 101-111.
- Businco L, Lucenti P, Arcese G, Ziruolo G, Cantani A. 1994. Immunogenicity of a so-called hypoallergenic formula in at-risk babies: two case reports. *Clin. Exp. Allergy* 24, 42-45.
- Businco L, Falconieri P, Giampietro P, Bellioni B. 1995. Food allergy and asthma. *Pediatr Pulmonol Suppl*, 11: 59-60.
- Businco L, Bruno G. 1997. Prophylaxis of cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 8, 11-15.
- Businco L, Giampietro PG, Lucenti P, Lucaroni F, Pini C, Di Felice G, Iacovacci P, Curadi C, Orlandi M. 2000. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 1031-1034.
- Calkhoven PG, Aalbers M, Koshte VL, Pos O, Oei HD, Aalberse RC. 1987. Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures. *Allergy*, 42: 382-90.
- Cantani A, Lucenti P. 1997. Natural history of soy allergy and/or intolerance in children, and clinical use of soy-protein formulas. *Pediatr Allergy Immunol.* 8, 59-74.
- Cantani A. 1999. The growing genetic links and the early onset of atopic diseases in children stress the unique role of the atopic march: a meta analysis. *Invest Allergol Clin Immunol*, 9: 314-320.
- Catsimpoolas N, Leuthner E. 1969. Immunochemical methods for detection and quantitation of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Anal Biochem*, 31: 437-47.
- Ceska M. 1981. Radioimmunoassay of IgE using paper disks. In: *Methods in enzymology*, vol 73, 646-667.
- Chandra RK, Puri S, Hamed A. 1989a. Influence of maternal diet during lactation and use of formula feeds on development of atopic eczema in high risk infants. *Br Med J*, 299: 228-230.
- Chandra RK, Singh G, Shridhara B. 1989b. Effect of feeding whey hydrolysate, soy and conventional cow milk formulas on incidence of atopic disease in high risk infants. *Ann Allergy* 63, 102-106.

- Chandra RK, Hamed A. 1991. Cumulative incidence of atopic disorders in high risk infants fed whey hydrolysate, soya and conventional cow milk formulas. *Ann Allergy*, 67: 129-132.
- Charlesworth EN. 1997. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy*, 52: 31-43.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe JL, Hafler DA, Weiner HL. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237-1240.
- Chen Y, Inobe JL, Weiner HL. 1995. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *J Immunol*, 155: 910-916.
- Chen H, Paul WE. 1997. Cultured NK^{1.1+} CD4⁺ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti CD-3 or CD1. *J. Immunol*, 159: 2240-9.
- Chiancone E, Gattoni M, Giampietro PG, Ragno V, Businco L. 1995. Detection of undegraded beta-lactoglobulins and evaluation of the molecular weight of peptides in hydrolysate cow's milk formulae. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol* 5, 228-231.
- Chirido FG, Rumbo M, Añón MC, Fossati CA. 1998. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol*, 33: 1186-1192.
- Chtouron A, Brignon G, Ribadeau-Dumas B. 1985. Quantification of β -casein in human milk. *J Dairy Res*, 52: 239-248.
- Church MK, Okayama Y, Bradding P. 1994. The role of the mast cell in acute and chronic allergic inflammation. *Ann NY Acad Sci*, 725: 13-21.
- Conrad DH, Campbell KA, Bartlett WC, Squire CM, Dierks SE. 1994. Structure and function of the low affinity IgE receptor. *Adv Exp Med Biol*, 347: 17-30.
- Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. 1989. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet*, 1: 1292-1295.
- Coombs RRA, Gell PGH. 1975. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease (Capítulo 25). En: *Clinical Aspects of Immunology*. Third Edition. Editores Gell PGH, Coombs RRA y Lanchman PJ. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra. 761-781.
- Costa JJ, Demetri GD, Harist TJ, Dvorak AM, Hayes DF, Merica EA, Menchaca DM, Gringeri AJ, Schwartz LB, Galli SJ. 1996. Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med.*, 183: 2681-2686
- Croner S. 1992. Prediction and detection of allergy development: influence of genetic and environmental factors. *J Pediatr*, 212: s58-s63.
- Dalgleish DG, Horne DS, Law JR. 1989. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 991: 383.
- Dalgleish DG. 1992. The enzymatic coagulation of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins*. P F Fox ed. Elsevier Applied Science, London, 579.
- Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. 1996. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*, 383: 247-250.
- Daul CB, Morgan JE, Waring NP, Cants ML, Hughes J, Lehrer SB. 1987. Immunologic evaluation of shrimp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol*, 80: 716-22.
- Dean TP, Adler BR, Ruge F, Warner JO. 1993. In vitro allergenicity of cow's milk substitutes. *Clin Exp Allergy* 23, 205-210.
- De Boissieu D, Matarazzo P, Dupont C. 1997. Allergy to extensively hydrolyzed cow milk proteins in infants: identification and treatment with an amino acid based formula. *J Pediatr*. 131:744-747.
- Delespesse G, Sarfati M, Wu CY, Fournier S, Letellier M. 1992. The low-affinity receptor for IgE. *Immunol Rev*, 125:77-97.
- Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, de Vries J, Romagnani S. 1988. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol*, 140: 4193-4198.
- Dembo M, Goldstein B, Sobotka AK, Lichtenstein LM. 1979. Degranulation of human basophils: quantitative analysis of histamine release and desensitization, due to a bivalent penicilloyl hapten. *J Immunol*, 123: 1864-1872.
- Demeure CE, Yang LP, Desjardins C, Raynauld P, Delespesse G. 1997. Prostaglandin E₂ primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol*, 27: 3526-3531.

- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A. 1996. Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol*, 98: 114-123.
- Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, 51: 412-416.
- Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, Fossati CA. 2002. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 2002, 57 (2): 83-91.
- Du Buske LM. 1996. Clinical comparison of histamine H1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol*, 98: S307-318.
- Easthman EJ, Lichauco T, Grady MI, Walker WA. 1978. Antigenicity of infants formulas: role of immature intestine on protein permeability. *J Pediatr*, 93: 561-564.
- Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Hoffmann K, Krebitz M, Kraft D, Scheiner O. 1996. Identification of allergens in apple, pear, celery, carrot and potato: cross-reactivity with pollen allergens. *Monogr Allergy*, 32: 73-77.
- Edwards BS, Curry MS, Tsuji H, Brown D, Larson RS, Sklar LA. 2000. Expression of P-selectin at low site density promotes selective attachment of eosinophils over neutrophils. *J Immunol*, 165: 404-410.
- Eigenmann PA, Sicherer SH, Borkowski TA, Cohen BD, Sampson HA. 1998. Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics*, 101:e8.
- Ellis MH, Short JA, Heiner DC. 1991. Anaphylaxis after ingestion of a recently introduced hydrolyzed whey protein formula. *J Pediatr*, 118: 74-77.
- Ellul-Milcaleff R, Al-Ali S. 1984. The spectrum of bronchial asthma in Kuwait. *Clin Allergy*, 14: 509-517.
- Erb KJ. 1999. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today*, 20: 317-322.
- Falth-Magnusson K, Kjellman NI. 1992. Allergy prevention by maternal elimination diet during late pregnancy. A 5-year follow-up of a randomized study. *J Allergy Clin Immunol*, 89: 709-713.
- Feiterna-Sperling C, Rammes S, Kewitz G, Versmold H, Niggemann B. 1997. A case of cow's milk allergy in the neonatal period-evidence for intrauterine sensitization? *Pediatr Allergy Immunol*. 8, 153-155
- Fergusson DM, Horwood LJ, Shannon FT. 1990 Early solid feeding and recurrent eczema: a 10-year longitudinal study. *Pediatrics*, 86: 541-546.
- Folster-Holst R, Mioses HW, Yang L, Fritsch W, Wiessenbach J, Christophers E. 1998. Linkage between atopy and the IgE high-affinity receptor gene at 11q13 in atopic dermatitis families. *Hum Genet*, 102: 236-239.
- Food and Drug administration. 1992. Statement of policy: foods derived from new plant varieties. *Fed Regist*, 57: 22984-23004.
- Fox JA, Hotaling TE, Struble C, Ruppel J, Bates DJ, Schoenhoff MB. 1996. Tissue distribution and complex formation with IgE of an anti-IgE antibody after intravenous administration in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 279: 1000-1008.
- Freier S, Eran M, Suranyi Y. 1988. Antigen presentation. *Nestlé Nutr Workshop Ser*, 17: 89-98.
- Fritsché R, Pahud JJ, Pecquet S, Pfeifer A. 1997. Induction of systemic immunological tolerance to β -lactoglobulin by oral administration of a whey protein hydrolysate. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 266-273.
- Galfré, GA; Milstein, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: *Methods Enzymol*. 73: 3-46.
- Gall H, Kalveram CM, Sick H, Sterry W. 1996. Allergy to the heat-labile proteins alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in mare's milk. *J Allergy Clin Immunol*, 97: 1304-1307.
- Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 11: 53-59.
- Galli SJ. 2000. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*, 7: 32-39.
- Garside P, Steel M, Worthey EA, Satoskar A, Alexander J, Bluethmann H, Liew FY, Mowat AM. 1995. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J Immunol*, 154: 5649-5655.
- Gassner-Bachmann M, Wuthrich B. 2000. Farmer's children suffer rarely from hay fever and asthma. *Dtsch Med Wochenschr*, 125: 923-931.
- Gerrard JW, Lubos MC, Hardy LW, Holmlund BA, Webster D. 1967. Milk allergy: clinical picture and familial incidence. *Can Med Ass J*, 97: 780-785.

- Gerrard JW, Mackenzie JWA, Goluboff N, Garson JZ, Maningis CS. 1973. Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paediatr Scand*, 234 (suppl): 1-21.
- Giampietro PG, Ragno W, Daniele S, Barbieri C, Cantani A, Businco L. 1992. Soy hypersensitivity in children with food allergy. *Ann Allergy*, 69: 143-146.
- Gleich GJ, Adolphson CR, Leifeman KM. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med*, 44: 85-101.
- Gortler I, Urbanek R, Forster J. 1995. Characterization of antigens and allergens in hypo-allergenic infant formulae. *Eur. J. Pediatr.* 154, 289-294.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q. 2001. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma. *FASEB J*, 15: 940-949.
- Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. 1994. Amino-terminal polymorphisms of the human β₂-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*, 33: 9414-9419.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, 184: 19-29.
- Grulee CG, Sanford HN. 1936. The influence of breast and artificial feeding on infantile eczema. *J Pediatr*, 9: 223.
- Haagerup A, Bjerke T, Schietz PO, Dahl R, Binderup HG, Kruse TA. 2001. No linkage and association of atopy to chromosome 16 including the interleukin-4 receptor gene. *Allergy* 56, 775-779.
- Halken S, Host A, Hansen LG, Osterballe O. 1993a. Preventive effect of feeding high-risk infants a casein hydrolysate formula or an ultrafiltrated whey hydrolysate formula. A prospective, randomized, comparative clinical study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 4, 173-181.
- Halken S, Host A, Hansen LG, Osterballe O. 1993b. Safety of a new, ultrafiltered whey hydrolysate formula in children with cow milk allergy: a clinical investigation. *Pediatr. Allergy Immunol.* 4, 53-59.
- Halken S, Jacobsen HP, Host A, Holmenlund D. 1995. The effect of hypo-allergenic formulas in infants at risk of allergic disease. *Eur J Clin Nutr*, 49 Suppl 1: S77-83.
- Halmepuro L, Salvaggio JE, Lehrer SB. 1987. Crawfish and lobster allergens: identification and structural similarities with other crustacea. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 84: 165-172.
- Hanson DG, Vaz NM, Maia LCS, Hornbrook MM, Lynch JM, Roy CA. 1977. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 55: 526-532.
- Hanson L. 1999. Human milk and host defence: immediate and long term effects. *Acta Paediatr Suppl*, 88: 42-46.
- Hattevig G, Kjellman B, Johansson SGO, Bjorksten B. 1984. Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins in atopic and healthy children. *Clin Allergy*, 14: 551-559.
- Hattevig G, Kjellman B, Sigurs N, Bjorksten B, Kjellman N-IM. 1989. Effect of maternal avoidance of eggs, cow's milk and fish during lactation upon allergic manifestations in infants. *Clin Exp Allergy*, 19: 27-32.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1099-1103.
- Hellman U, Wernstedt C, Gómez J, Heldin CH. Improvement of an "in gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. 1995. *Anal. Biochem.* 224: 451-455.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408: 740-745.
- Herian AM, Taylor SL, Bush RK. 1990. Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 92: 193-198.
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. 1997. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*, 337: 1720-1725.
- Hill L, Stuart H. 1929. Soybean food preparation for feeding infants with milk idiosyncrasy. *JAMA*, 93: 985-987.
- Hill DJ, Firer MA, Shelton MJ, Hosking CS. 1986. Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunological findings. *J Pediatr*, 109: 272-276.

- Hill D, Cameron DJS, Francis DEM, Gonzalez-Andaya AM, Hosking CS. 1995. Challenge confirmation of late-onset reactions to extensively hydrolyzed formulas in infants with multiple food protein intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 96, 386-394.
- Hill DJ, Hosking CS. 1996. Cow milk allergy in infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy*, 26: 243-246.
- Hizawa N, Freidhoff LR, Chiu Y-F, Ehrlich E, Luehr CA, Anderson JL, Duffy DL, Dunston GM, Weber JL, Huang SK, Barnes KC, Marsh DG, Beaty . 1998. Genetic regulation of *Dermatophagoides pteronyssimus* (Derp)-specific IgE responsiveness: a genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through two asthmatic sibs. *J Allergy Clin Immunol*, 102: 436-442.
- Hoffmann KM, Sampson HA. 1997. Serum specific-IgE antibodies to peptides detected in a casein hydrolysate formula. *Pediatr Allergy Immunol*, 8: 185-189.
- Hogg C, Bush A. 1997. Childhood asthma--all that wheezes is not inflammation. *Clin Exp Allergy*, 27: 991-994.
- Holgate S. 1993. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax*, 48: 103-109.
- Holt C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv Protein Chem*, 43: 63-151.
- Hosking CS, Heine RG, Hill DJ. 2000. The Melbourne milk allergy study--two decades of clinical research. *ACI International* 12, 198-205.
- Host A, Husby S, Osterballe O. 1988. A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. Incidence, pathogenic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. *Acta Paediatr Scand*, 77: 663-670.
- Host A, Husby S, Hansen LG, Osterballe O. 1990a. Bovine b-lactoglobulin in human milk from atopic and non atopic mothers. Relationship to maternal intake of homogenized and unhomogenized milk. *Clin Exp Allergy*, 20: 383-387.
- Host A, Halken S. 1990b. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first three years of life. *Allergy*, 45: 587-596.
- Host A, Husby S, Gjersing B, Larsen JN, Lowenstein H. 1992. Prospective estimation of IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants with cow milk allergy. Levels of antibodies to whole milk proteins, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow milk allergy. *Allergy*, 47: 219-229.
- Host A. 1994. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol*, 5 Suppl: 5-36.
- Husby S. 1988. Dietary antigens: uptake and humoral immunity in man. *APMIS Suppl*, 1: 1-40.
- Husby S, Mestecky J, Moldoveanu Z, Holland S, Elson CO. 1994. Oral tolerance in humans. *J Immunol* 152, 4663-4670.
- Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T, Halsh JH, Taylor IL. 1985. Gastric acid secretory function in pre-term infants. *J Pediatr*, 106: 467-471.
- International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet*, 351: 1225-1232.
- Ishizaka K, Ishizaka T. 1968. Human reaginic antibodies and immunoglobulin E. *J. Allergy*, 42: 330-362.
- Ishizaka K, Tomioka H, Ishizaka T. 1970. Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes. *J Immunol*, 105: 1459-1467.
- Ishizaka T, Helm B, Hakimi Niebyl J, Ishizaka K, Gould H. 1986. Biological properties of a recombinant human immunoglobulin ϵ -chain fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 8323-8327.
- Isolauri E, Suomalainen H, Kaila M, Jalonen T, Soppi E, Virtanen E, Arvilommi H. 1992. Local immune response in patients with cow milk allergy: follow-up of patients retaining allergy or becoming tolerant. *J Pediatr*, 120: 9-15.
- Isolauri E, Sutas Y, Makinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. 1995. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr*, 127: 550-557.
- Israel EJ, Walker WA. 1988. Host defense development in gut and related disorders. *Pediatr Clin North Am*, 35: 1-15.
- Jakobsson I, Lindberg T. 1979. A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants. *Acta Paediatr Scand*, 68: 835-839.
- Jansen J, Kardinaal A, Huijbers G, Vlieg-Berstra J, Martens B, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. 1994. *J Allergy Clin Immunol*, 93: 446-456.

- Jeep S, Pilz B, Baisch A, Kleine-Tebbe J, Ohnemus U, Kunkel G. 2001. Immunoblot studies in birch pollen-allergic patients with and without fruit hypersensitivity: part I: antibody pattern for birch pollen extract. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2001;11(4):255-263.
- Jinquan T, Quan S, Feili G, Larsen CG, Thestrup-Pedersen K. 1999. Eotaxin activates T cells to chemotaxis and adhesion only if induced to express CCR3 by IL-2 together with IL-4. *J Immunol*, 162: 4285-4292.
- Jinquan T, Jing C, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Quan S, Hansen JB, Dissing S, Mailing HJ, Skov PS, et al. 2000. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J immunol*, 165: 1548-1556.
- Johansson SGO, Bennich H. 1967. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, 13: 381-394.
- Johansson SGO, Dannaeus A, Lilja G. 1984. The relevance of anti-food antibodies for the diagnosis of food allergy. *Ann Allergy*, 53: 665-672.
- Jost R, Monti JC, Pahud JJ. 1987. Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food technol*, 41: 118-121.
- Kabesch M, von Mutius E. 2000. Adverse health effects of environmental tobacco smoke exposure in childhood. *ACI Int*, 12: 146-152.
- Kajiwara K, Niki R, Urakawa H, Hiragi Y, Donkai N, Nagura M. 1988. Micellar structure of β -casein observed by small-angle X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta*, 955: 128-134.
- Kajosaari M, Saarinen UM. 1983. Prophylaxis of atopic disease by six months total solid food elimination. *Acta Paediatr Scand*, 72: 411-414.
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. 1996. Stat 6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity*, 4: 313-319.
- Kelly KJ, Lazenby AJ, Rowe PC, Yardley JH, Perman JA, Sampson HA. 1995. Eosinophilic esophagitis attributed to gastroesophageal reflux: improvement with an amino-acid based formula. *Gastroenterology*, 109: 1503-1512.
- Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy*, 30: 201-208.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. 1995. Allergen nomenclature. *Allergy*, 50: 765-774.
- King CL, Kianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AA, Oettgen HC. 1997. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, 158: 294-300.
- Kitagawa S, Zhang S, Harari Y, Castro GA 1995. Relative allergenicity of cow's milk and cow's milk-based formulas in an animal model. *Am J Med Sci*, 310: 183-187.
- Kitamura Y. 1989. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol*, 7: 59-76.
- Kivity S, Dunner K, Marian Y. 1994. The pattern of food hypersensitivity in patients with onset after 10 years of age. *Clin Exp Allergy*, 24: 19-22.
- Kjellman N-IM. 1977. Atopic disease in seven-year-old children. *Acta Paediatr Scand*, 66: 465-471.
- Kleinman RE, Bahna S, Powell GF, Sampson HA. 1991. Use of infants formulas in infants with cow milk allergy. A review and recommendations. *Pediatr Allergy Immunol*, 2: 145-155.
- Kohno Y, Honma K, Saito K, Shimojo N, Tsunoo H, Kaminogawa S, Niimi H. 1994. Preferential recognition of primary protein structures of alpha-casein by IgG and IgE antibodies of patients with milk allergy. *Ann Allergy* 73, 419-422.
- Kuitunen P, Visakorpi JK, Savilahti E, Pelkonen P. 1975. Malabsorption syndrome with cow's milk intolerance: clinical findings and course in 54 cases. *Arch Dis Child*, 50: 351-356.
- Kulczycki A Jr., Metzger H. 1974. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. *J Exp Med*, 140: 1676-1695.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. 1999. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 103: 206-214.
- Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. 2000. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*, 106:50-58.

- Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD. 1997. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 99: 1767-1773.
- Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey Sobotka A, Bleecker ER, Lichtenstein LM. 1991. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator and permeability changes. *Am Rev Respir Dis*, 144: 51-58.
- Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. 1994. Anergic T cells as suppressor cells *in vitro*. *Science*, 264: 1587-1589.
- Lorenz M, Jung S, Radbruch A. 1995. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science*; 267: 1825-1828.
- Loveless MH. 1950. Allergy for corn and its derivatives: experiments with a mask ingestion test for its diagnosis. *J Allergy*, 21: 500-509.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall LJ. 1951. Protein measurement with the foling phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lundkvist U. 1975. Ed. Evans R III, Symposia Specialists, Miami, Florida 33161 USA. 85.
- MacGlashan DW, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, Mckenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. 1997. Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during *in vivo* treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol*, 158: 1438-1445.
- Magnolfi CF, Zani G, Lacava L, Patria MF, Bardare M. 1996. Soy allergy in atopic children. *Ann Allergy*, 69: 143-146.
- Mallet E, Henocq A. 1992. Long term prevention of allergic diseases by using protein hydrolysate formula in at-risk infants. *J Pediatr*, 121: S95-100.
- Marini A, Agosti M, Motta G, et al. 1996. Effects of a dietary and environmental prevention programme on the incidence of allergic symptoms in high atopic risk infants: three years' follow-up. *Acta Paediatrica*, 85 (Suppl 414): 1-22.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. 1994. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*, 264: 1152-1156.
- Martinez GA, Dodd DA, Samartgedes JA. 1981. Milk feeding patterns in the United States during the first 12 months of life. *Paediatrics*, 68: 863-868.
- Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP. 1998. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Care Med*, 158: 1739-1744.
- Matsudaira P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted to polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, 262: 10035-10038.
- Matsumuda T, Nakashima I, Kato Y, Nakamura R. 1987. Antibody response to haptenic sugar antigen: Immunodominancy of protein-bound lactose formed by amino-carbonyl reaction. *Molecular Immunol*, 24: 421-425.
- May CD. 1976. Objective clinical and laboratory studies of immediate hypersensitivity reactions to food in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*, 58: 500-515.
- Maynard F, Jost R, Wal JM. 1997. Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine α-lactalbumin. *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 478-488.
- McDonnell JM, et al. 2001. The structure of the IgE Cε2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcεRIα. *Nature Struct Biol*, 8: 437-441.
- McMenamin C, Schon HM, Oliver J, Girn B, Holt PG. 1991. Regulation of IgE responses to inhaled antigens: cellular mechanisms underlying allergic sensitization versus tolerance induction. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94: 78-82.
- McMenamin C, McKersey M, Kuhnlein P, Hunig T, Holt PG. 1995. Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol*, 154: 4390-4394.
- Melamed D, Friedman A. 1993. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol*, 23: 935-942.
- Menardo J, Bousquet J, Rodiere M, Astruc J, Michel FB. 1985. Skin test reactivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol*, 74: 646-651.
- Merrett TG. 1997. Quantification of IgE both as total immunoglobulin and as allergen-specific antibody. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases*. vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1012-1034.
- Metzger H. 1992. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol*, 149: 1477-1487.

- Miller A, Lider O, Weiner HL. 1991. Antigen-driven by-stander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med*, 174: 791-798.
- Minford AMB, Macdonald A, Littlewood JM. 1982. Food intolerance and food allergy in children: a review of 68 cases. *Arch Dis Child*, 57: 742-747.
- Miskelly FG, Burr ML, Vaughan-Williams E, Fehily AM, Butland BK, Merrett TG. 1988. Infant feeding and allergy. *Arch Dis Child* 63:388-393.
- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, et al. 1998. Ile50Val variant of IL-4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet*, 19: 119-120.
- Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, Schou C, Faux JA, Young RP, James AL, Ryan G, le Souef P, Musk AW, et al. 1994. Genetic linkage of T-cell receptor α/δ complex to specific IgE responses. *Lancet*, 343: 1597-1600.
- Monaco HL, Zanotti G, Spadon P, Bolognesi M, Sawyer L, Eliopoulos EE. 1987. Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 197: 695-706.
- Mori A, Kaminuma O, Suko M, Inoue S, Ohmura T, Oshino A, Asakura Y, Miyasawa K, Yokota T, Okumura Y, Ito K, Okudaira H. 1997. Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood*, 89: 2891-2900.
- Moroz LA, Yang WH. 1980. Kunitz soybean trypsin inhibitor, a specific inhibitor of food anaphylaxis. *New Engl J Med*, 302: 1126-1131.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. 2000. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J Immunol*, 164: 5935-5943.
- Nawa Y, Kiyota M, Korenaga M, Kotani M. 1985. Defective protective capacity of W/W^v mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunol*, 7: 429-438.
- Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock SA, Leung DYM. 1997. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 744-751.
- Niggemann B, Reibel S, Roehr CC, Felger D, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U. 2001. Predictors of positive food challenge outcome in non-IgE-mediated reactions to food in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 108, 1053-1058.
- Nissim A, Eshhar Z. 1992. The human mast cell receptor binding site maps to the third constant domain of IgE. *Mol Immunol*, 29: 1065-1072.
- Noferi A, Fuschillo S, Iorio C. 1995. Rilevanza epidemiologica e clinica delle arachidi quali causa di allergia. *Osservazioni personali. Notiz Allergol*, 14: 113-117.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H. 1998. Evidence for linkage between the development of asthma in childhood and the T-cell receptor beta chain gene in Japanese. *Genomics*, 47: 121-124.
- Norgaard A, Bindslev-Jensen C. 1992. Egg and milk allergy in adults. *Allergy*, 47: 503-509.
- Novak N, Bieber T, Katoh N. 2001. Engagement of FcεRI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J Immunol*, 167: 797-804.
- Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Lance M, Pettersson A, Prescott J, Robertson A, Schlenker E, Summerhill E, Wiladsen R, Parry R. 1998. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The collaborative study on the genetics of asthma. 1998. *Hum Mol Genet*, 7: 1393-1398.
- Odelram H, Vanto T, Jacobsen L, Kjellman N-IM. 1996. Whey hydrolysate compared with cow's milk-based formula for weaning at about 6 months of age in high allergy-risk infants: effects on atopic disease and sensitization. *Allergy* 51, 192-195.
- Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K, Kitamura K. 1995. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotech Biochem* 59, 831-833.
- O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8: 275-283.
- Oldaeus G, Björkstén B, Einarsson R, Kjellman N-IM. 1991. Antigenicity and allergenicity of cow's milk hydrolysates intended for infant feeding. *Pediatr Allergy Immunol*, 2: 156-160.

- Oldaeus G, Anjou K, Bjorksten B, Moran JR, Kjellman, N-IM. 1997. Extensively and partially hydrolysed infant formulas for allergy prophylaxis. *Arch. Dis. Child.* 77, 4-10.
- Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. 1989. Comparison of results of skin prick tests (with fresh and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 83: 683-690.
- Otani H, Takahashi F, Tokita F. 1986. Antigenic reactivities of fragments obtained by cyanogen bromide cleavage of bovine α_{s1} -casein toward antiserum to intact α_{s1} -casein. *Agric Biol Chem*, 50: 607-613.
- Otani H, Mine Y, Hosono A. 1987. Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. V. Antigenic activities of some peptides derived from residues 1-93. *Milchwissenschaft*, 42: 505-508.
- Otani H, Dong XY, Hara T, Kobayashi M, Kayahara H, Hosono A. 1989. Human serum antibodies to cow milk proteins in infants and children having clinically allergic symptoms. *Milchwissenschaft*, 44/3: 131-134.
- Palmer LJ, Daniels SE, Rye PJ, Gibson NA, Tay GK, Cookson WO, Goldblatt J, Burton PR, le Souef PN. 1998. Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 1825-1830.
- Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North ACT, Findlay JBC, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ. 1986. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 423: 383-385.
- Paul WE, Seder RA, Plaut M. 1993. Lymphokine and cytokine production by Fc epsilon RI+ cells. *Adv Immunol*, 53: 1-29.
- Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. 1997. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilon RI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest*, 99: 1492-1499.
- Pecquet S, Bovetto L, Maynard F, Fritsché R. 2000. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine β -lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 514-521.
- Peebles RS, Hartert TV. 1997. In vivo diagnostic procedures: skin testing, nasal provocation, and bronchial provocation. *Methods*, 13: 14-24.
- Peterson B, Saxon A. 1996. Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 4: 263-268.
- Piccinni M-P, Giudizi M-G, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, et al. 1995. Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 clones. *J Immunol*, 155: 128-133.
- Plebani A, Albertini A, Scotta S, Ugazio AG. 1990. IgE antibodies to hydrolysates of cow milk proteins in children with cow milk allergy. *Ann. Allergy* 64, 279-280.
- Plebani A, Ugazio, AG, Meini A, Guarnaccia S, Gardenghi R, Losio V, Ghielmi S, Poiesi C, Albertini A. 1992. Molecular weight-related antigenicity of peptides contained in cow's milk protein hydrolysates. *Pharmacol Res*, 26 (S2): 120-123.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnola P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282 :2085-2088
- Prausnitz C, Kustner H. 1921. Studien uber die ueberamp findlichkeit. *Zentralbl Bakt*, 86: 160.
- Quinti I, Paganelli R, Scala E, Guerra E, Aiuti F. 1989. Humoral response to food antigens. *Allergy*, 44: 59-64.
- Ragno V, Giampietro PG, Bruno G, Businco L. 1993. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. *Eur J Pediatr*, 152: 760-762.
- Ramirez F, Fowell DJ, Pukavec M, Simmonds S, Mason D. 1996. Glucocorticoids promote the cytokine response by CD4+ T cells *in vitro*. *J Immunol*, 156: 2406-2412.
- Reddy IM, Kella NKD, Kinsella JE. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J Agric Food Chem*, 36: 737-741.
- Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, Galli CL. 1995. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clin. Exp. Allergy* 25, 651-658.
- Restani P, Plebani A, Velona T, Cavagni G, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, Galli CL. 1996. Use of immunoblotting and monoclonal antibodies to evaluate the residual antigenic activity of milk protein hydrolysed formulae. *Clin. Exp. Allergy* 26, 1182-1187.

- Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, Poiesi C, Velona T, Ugazio AG, Galli CL. 1999a. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin. Exp. Allergy* 29, 997-1004.
- Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Velona T, Cavagni G, Poiesi C, Ugazio AG, Galli CL. 1999b. Evaluation of the presence of bovine proteins in human milk as a possible cause of allergic symptoms in breast-fed children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84, 353-360.
- Ribadeau-Dumas B. 1988. Structure and variability of milk proteins. In: Barth CA, Schlimme E, editors. *Milk proteins, nutritional, clinical, functional and technological aspects*. Darmstadt: Steinkopff, 112-123.
- Richard M, Grecis RK, Humphreys NE, Renaud JC, Van Snick J. 2000. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 767-772.
- Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Screuer M. 2000. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*, 30: 194-200.
- Robertson DM, Paganelli R, Dinwiddle R, Levinsky RJ. 1982. Milk antigen absorption in the preterm and term neonate. *Arch Dis Child*, 57: 369-372.
- Romagnani S, Parronchi O, Delios MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, Manetti R, Sampognaro S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF. 1997. An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 153-156.
- Rosen J, Sekow J, Mendelson L, Grodofsky M, Factor J, Sampson HA. 1994. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies... is it necessary? *J Allergy Clin Immunol*, 93: 1068-1070.
- Rosenfeld J, Capdeville J, Guillemont JC, Ferrara P. 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 203: 173-179.
- Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klennert M, Borish L. 1995. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin. Exp. Allergy*, 25 Suppl 2: 74-78.
- Rottem M, Barbieri S, Kinet JP, Metcalfe DD. 1992. Kinetics of the appearance of Fc epsilon R1-bearing cells in interleukin-3-dependent mouse bone marrow cultures: correlation with histamine content and mast cell maturation. *Blood*, 79: 972-980.
- Rozenfeld P, Docena GH, Añón MC, Fossati CA. 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol*, 130: 49-58.
- Rugo E, Wahl R, Wahn U. 1992. How allergenic are hypoallergenic infant formulae? *Clin Exp Allergy*, 22: 635-639.
- Ruhrah J. 1909. The soybean in infant feeding: preliminary report. *Arch Pediatr*, 26: 496-501.
- Rylander E, Pershagen G, Eriksson M, Nordvall L. 1993. Parental smoking and other risk factors for wheezing bronchitis in children. *Eur J Epidemiol*, 9: 517-526.
- Saloga J, Renz H, Larsen GL, Gelfand EW. 1994. Increased airways responsiveness in mice depends on local challenge with antigen. *Am J Respir Crit Care Med*, 149: 65-70.
- Sampson HA, Albergo R. 1984. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 74: 26-33.
- Sampson HA. 1988a. Immunologically mediated food allergy: the importance of food challenge procedures. *Ann Allergy*, 60: 262-269.
- Sampson HA. 1988b. The role of food hypersensitivity and mediator release in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 81: 635-645.
- Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. 1992. Fatal and near fatal-induced anaphylaxis. *JAMA*, 260: 1450-1452.
- Sampson HA, Ho D. 1997a. Relationship between food-specific IgE concentration and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 444-451.
- Sampson HA, Zeiger RS, Bock SA, Burks AW. 1997b. Prevalence of soy allergy in young children with cow milk allergy. *JACI*, 99: 394.
- Sampson HA. 1999. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 103(5 Pt 1):717-728.
- Saylor JD, Bahna SL. 1991. Anaphylaxis to casein hydrolysate formula. *J Pediatr*, 118: 71-74.
- Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, Filipiak B, Wichmann HE, Ring J. 2001. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy*, 56: 1172-1179.

- Schagger H, Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis for the separation of proteins in the region from 1 to 100 kDa. *Annal Biochem*, 166: 368-379.
- Schmitz J, Digeon B, Chastang C, Dupony D, Leroux B, Robillard P, Strobel S. 1992. Effects of brief exposure to partially hydrolysed and whole cow milk proteins. *J Pediatr*, 121: S87-S89.
- Schrandner JJP, van der Bogart JPH, Forget PP, Schrandner-Stumpel CTRM, Kuijten RH, Kester ADM. 1993. Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr*, 152: 640-644.
- Schulz O, Sewell HF, Shakib, F. 1998. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp Med.*, 187: 271-275.
- Selo I, Negroni L, Yvon M, Peltre G, Wal JM. 1998. Allergy to β -lactoglobulin: specificity of human IgE using CNBr derived peptides. *Int Arch Allergy Immunol*, 117: 20-28.
- Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. 2000. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest*, 105: 945-953.
- Shin D, Compadre CM, Sampson HA, et al. 1998. Identification and analysis of the critical amino acids and structures necessary for specific IgE binding to Ara h1, a major peanut allergen. *J Biol Chem*, 273: 13753-13758.
- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A. 1996. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet*, 347: 1792-1796.
- Shields RL, Whether WR, Zioncheck K, O'Connell L, Fendly B, Presta LG, Thomas D, Saban R, Jardieu P. 1995. Inhibition of allergic reactions with antibodies to IgE. *Int Arch Allergy Immunol*, 107: 308-312.
- Shibasaki M, Suzuki S, Tajima S, Nemoto H, Kuroume T. 1980. Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 61: 441-448.
- Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. 1995. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matches controls. *Pediatrics*, 95: 500-505.
- Siveke JT, Hamann A. 1998. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol*, 160: 550-554.
- Slaterry CW, Evard R. 1973. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim Biophys Acta*, 317: 529.
- Soler M, Matz J, Townley RG, Buhl R, O'Brien J, Fox H, Thirlwell J, Gupta N, Della Cioppa G. 2001. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur Respir J*, 18(2):254-261.
- Spuergin P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J. 1996. Allergenic epitopes of bovine α_{s1} -casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*, 51: 306-312.
- Spuergin P, Walter M, Schiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H. 1997. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy*, 52: 293-298.
- Sriramarao P, DiScipio RG, Cobb RR, Cybulsky M, Stanchnick G, Castaneda D, Elices M, Broide DH. 2000. VCAM-1 is more effective than MadCAM-1 in supporting eosinophil rolling under conditions of shear flow. *Blood*, 95: 592-601.
- Staines NA, Harper N. 1995. Oral tolerance in the control of experimental models of autoimmune disease. *Z Rheumatol*, 54: 145-154.
- Stoger P, Wuthrich B. 1993. Type I allergy to cow milk protein in adults. A retrospective study of 34 adult milk- and cheese allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 102: 399-407.
- Strobel S, Fairclough LM. 1989. Whole cow's milk and hydrolysed infants formulae: analysis of systemic immune responses and antigenic crossreactivity. In: Harms HK, Wahn U, eds. *Food allergy in infancy and childhood*. Berlin: Springer-Verlag, 158-165.
- Strobel S. 1992. Mechanisms of intestinal allergy. *Semin Pediatr Gastroenterol Nutr*, 3: 8-13.
- Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. 1997. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today*, 18: 61-64.
- Strachan DP, Harkins LS, Johnston ID, Anderson HR. 1997. Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 6-12.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells:

- induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10: 1969-1980.
- Takahashi T, Yamauchi K, Kaminogawa S. 1990. Comparison between the antigenicity of native and unfolded β -lactoglobulin. *Agric Biol Chem*, 54: 691-697.
 - Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11:443-51
 - Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. 1994. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet*, 344: 983-985.
 - Tarim O, Anderson VM. 1994. Fatal anaphylaxis in a very young infant possibly due to a aprtially hydrolyzed whey formula. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 148: 1224-1228.
 - Taylor B, Norman AP, Orgel HA, et al. 1973. Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy. *Lancet*, 2: 111-113.
 - Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schroder JM. 1999. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 777-786.
 - Tijssen P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. Elsevier. Amsterdam.
 - Tsang VCW, Peralta JN, Simons AR. 1983. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying by gel electrophoresis. *Meth Enzymol.*, 92:377-391.
 - Turki J, Pak J, Green SA, Martin Rj, Liggett SB. 1995. Genetic polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. *J Clin Invest*, 95: 1635-1641.
 - Utsumi S, Damodaran S, Kinsella J. 1984. Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β subunits of 7S. *J. Agric. Food Chem*, 32: 1406-1412.
 - van Beresteijn ECH, Peeters RA, Kaper J, Meijer RJGM, Robben AJPM, Schmidt DG. 1994. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J Food Protection*, 57: 619-625.
 - Van Beresteijn ECH, Meijer RJGM, Schmidt DG. 1995. Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 96, 365-374.
 - Van Hoeyveld EM, Escalona-Monge M, De Swert LFA, Stevens EAM. 1998. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. *Clin. Exp. Allergy* 28, 1131-1137.
 - Vandенplас Y, Deneyer M, Sacre L, Loeb H. 1988. preliminary data on a field study with a new hypoallergenic formula. *Eur J Pediatr*, 148: 274-277.
 - Vandенplас Y, Hauser B, van der Borre, et al. 1992. Effect of a whey hydrolysate prophylaxis of atopic disease. *Ann Allergy*, 68: 419-424.
 - Vandенplас Y, Hauser B, van der Borre, Clybouw C, Mahler T, Hachimi-Idrissi S, Deraeve L, Malfroot A, Dab I. 1995. The long term effect of a whey hydrolysate formula for the prophylaxis of atopic disease. *Eur J Pediatr*, 154: 488-494.
 - Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. 1996. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*. 1996 Mar;4(3):321-328.
 - Vanto T, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Klemola T, Koivikko A, Koskinen P, Syvanen P, Valovirta E, Varjonen E. 1999. The patch test, skin prick test, and serum milk-specific IgE as diagnostic tools in cow's milk allergy in infants. *Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 837-842.
 - Varner AE, Busse WW, Lemanske RF. 1998. Hypothesis: decreased use of pediatric aspirin has contributed to the increasing prevalence of childhood asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81: 347-351.
 - von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann H. 1994. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*, 149: 358-364.
 - von Pirquet C. 1963. Allergie. *Munch Med Wochenschr*. In: Gell PGH, Coombs RRA, eds. *Clinical aspects of immunology*. vol 30. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 317-337.
 - Voorhorst R, Spieksma-Boezema MIA, Spieksma F ThM. 1964. Is a mite (*Dermatophagoides sp.*) the producer of the house dust allergen? *Allergie and asthma*, 10: 329.
 - Wahn,U. 1993. What is a "hypoallergenic" formula? *ACI International* 5, 40-41.
 - Walker WA. 1977. Development of intestinal host defense mechanisms and the passive protective role of human milk. *Mead Johnson Symp Perinat Dev Med*, 11: 49.
 - Weller PF. 1994. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol*, 6: 85-90.

- Walley AJ, Cookson WOCM. 1996. Investigation of an interleukin promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet*, 33: 689-692.
- Wan T, Beavil RL, Fabiane SM, Beavil AJ, Sohi MK, Kewon M, Young RJ, Henry AJ, Owens RJ, Gould HJ, Sutton BJ. 2002. The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nature Immunology*, 3: 681-686.
- Wells HG. 1911. Studies of the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. *J Infect Dis*, 9: 147-171.
- Wershil BK, Wang ZS, Gordon JR, Galli SJ. 1991. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest*, 87: 446-453.
- Wershil BK, Galli SJ. 1994. The analysis of mast cell function in vivo using mast cell-deficient mice. *Adv Exp Med Biol*, 347: 39-54.
- Wickens K, Pearce N, Crane J, Beasley R. 1999. Antibiotic use in early childhood and the development of asthma. *Clin Exp Allergy*, 29: 766-771.
- Willems R, Duchateau J, Magrez P, Denis R, Casimir G. 1993. Influence of hypoallergenic milk formula on the incidence of early allergic manifestations in infants predisposed to atopic diseases. *Ann Allergy*, 71: 147-150.
- Williams HC, Strachman DP, Hay RJ. 1994. Childhood eczema: disease of the advantaged? *BMJ*, 308: 1132-1135.
- Williams CMM, Galli SJ. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 847-859.
- Wilson NW, Hamburger RN. 1988. Allergy to cow's milk in the first year of life and its prevention. *Ann Allergy*, 61: 323-327.
- Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. 2000. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood*, 95: 3146-3152.
- Working Group Sardinia. 1993. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin Exp Allergy*, 23: 484-492.
- Wuthrich B, Johansson SG. 1995. Allergy to cheese produced from sheep's and goat's milk but not to cheese produced from cow's milk. *J Allergy Clin Immunol*, 96: 270-273.
- Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, Costa JJ, Galli SJ. 1999. IgE enhances Fcε receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fcε receptor I expression and mediator release. *J Immunol*, 162: 5455-5465.
- Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M, Kishimoto T. 1988. Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell*, 55: 611-618.
- Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, Rosenberg WM, Bell JI, Hopkin JM, Cookson WO. 1994a. HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens. *Clin. Exp Allergy*, 24: 431-439.
- Young E, Stoneham M, Petrukevitch A, Barton J, Rona R. 1994b. A population study of food intolerance. *Lancet*, 343: 1127-1130.
- Yu G, Duchon K, Bjorksten B. 1998. Fatty acid composition in colostrum and mature milk from non-atopic and atopic mothers during the first 6 months of lactation. *Acta Paediatr*, 87: 729-736.
- Yunginger JW. 1992. Lethal food allergy in children. *N Engl J Med*, 327: 421-422.
- Zeece MG, Beardslee TA, Markwell JP, Sarath G. 1999. Identification of an IgE-binding region in soybean acidic glycinin G1. *Food Agric. Immunol* 11, 83-90.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
▲.....
Fecha.....
Inv. B..... Inv..... B. S7043