

01024

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

“Desarrollo y aplicación de métodos inmuno-enzimáticos para el estudio de extractos alérgicos y de la respuesta inmune humoral en pacientes alérgicos a leche bovina y a proteínas del látex natural”

Trabajo de Tesis Doctoral

Bioquímico Guillermo Horacio Docena



Año 2000

(043.2)
TESIS
01024

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subcuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-57111

El presente Trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado bajo la Dirección del Doctor Carlos Alberto Fossati en la Cátedra de Inmunología, con la colaboración del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos



Agradecimientos:

Al **Dr. Carlos Alberto Fossati** quien me fomentó el interés por la Inmunología y me guió en el desarrollo de este Trabajo de Tesis. Supo transmitirme toda su experiencia y enseñanza no sólo en mi formación científica, sino también en la planificación de las distintas etapas de trabajo y en la objetiva y crítica discusión de los resultados obtenidos. Además de ser mi Director de Tesis descubrí en él a un Amigo, que supo transmitirme todas sus cualidades humanas.

A la **Dra. María Cristina Añón** por haberme posibilitado el libre acceso al Instituto que dirige. Cada vez que debí recurrir a ella obtuve toda la colaboración que necesité, y las veces que tuve la posibilidad de intercambiar opiniones con ella me quedó su claridad para ver y resolver los problemas.

A todo el **personal del CIDCA** que de una u otra manera colaboraron con mi trabajo y me ayudaron en el uso del equipamiento disponible.

A **Carlitos Rubi** quien me enseñó a dar los primeros pasos experimentales cuando me incorporé al grupo. Desde ese momento comprendí que los experimentos nunca vuelven a dar como la primera vez que se realizan.

A **Norberto, Fernando y Martín** (mis amigos y compañeros de Cátedra) en quienes siempre encontré una respuesta cuando debí recurrir a ellos. Además, los memorables momentos que compartimos y sufrimos en la difícil, pero gratificante tarea de enseñar Inmunología en la Cátedra ya son parte de nuestras vidas.

A **Paula, María y Federico** con quienes comencé a “compartir la mesada”, por toda la comprensión, compañerismo y colaboración que siempre me brindaron. Con ellos esto recién comienza...

A los médicos del **Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata** con quienes hemos compartidos tan gratos momentos en Congresos, charlas y viajes. Con

ellos aprendí lo complejo e interesante que son las enfermedades alérgicas, y el desafío que significa comprenderlas.

Un agradecimiento muy especial a la **Dra. Rita Fernández** quien supo transmitirme toda su experiencia en el desarrollo y optimización de métodos inmunoenzimáticos. Su practicidad y empuje en todo emprendimiento que la involucre son realmente admirables.

A la gente de la **Cátedra de Bioquímica Patológica**, en especial a **Nené Etcheverry** y **Ana Cortizo**, quienes me brindaron un ámbito muy adecuado para que me iniciara en la Docencia.

A la gente del **IDEHU**, especialmente **Pablo Baldi**, **Alejandro Velikovsky** y el **Dr. Ricardo Margni**, quienes siempre colaboraron desinteresadamente cuando debimos recurrir a ellos. Han sido muy importantes en la formación de nuestro grupo.

A la **Universidad Nacional de La Plata** que me brindó el ámbito y los medios para poder iniciarme en la Investigación Científica y concretar este Trabajo de Tesis.

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas** por haberme otorgado las becas con las cuales pude realizar este Trabajo de Tesis.

A ellos todo mi agradecimiento.

*A mi familia que siempre me apoyo en mis
emprendimientos, y en especial a Andrea y Cami,
por todo lo que significan en mi Vida...*

**"Si el camino que eliges no tiene piedras,
seguro que no lleva a ninguna parte"**

INDICE GENERAL

| | |
|--|------------|
| Abreviaturas | i |
| Breve introducción y objetivos generales | 1 |
| Introducción general | 4 |
| Materiales y Métodos | 49 |
| Capítulo I - Alergia a leche bovina | 69 |
| Introducción | 71 |
| Objetivos específicos | 90 |
| Resultados | 92 |
| Discusión | 126 |
| Capítulo II - Alergia al látex | 137 |
| Introducción | 139 |
| Objetivos específicos | 149 |
| Resultados | 151 |
| Discusión | 183 |
| Conclusiones generales | 194 |
| Bibliografía | 197 |

ABREVIATURAS

| | | | |
|-------------------------------|--|---------------|---|
| α-La | alfa lactoalbúmina | ITAM | immunoreceptor tyrosine-based activation motifs |
| ADCC | citotoxicidad celular mediada por anticuerpo | IUIS | Unión Internacional de Sociedades de Inmunología |
| β-Lg | beta lactoglobulina | LB | linfocito B |
| BSA | Seroalbúmina bovina | Lt | leucotrienos |
| CD | "clúster" de diferenciación | LT | linfocito T |
| CPA | célula presentadora de antígeno | MHC | complejo mayor de histocompatibilidad |
| CRIE | contraradio inmuno electroforesis | MIP | macrophage inflammatory protein |
| CTL | linfocito T citotóxico | MPC | macrophage chemoattractant and activating factor |
| DE | desviación estándar | OPD | orto-fenilen diamina |
| DMSO | dimetil sulfóxido | PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida |
| DO | densidad óptica | Pg | prostaglandinas |
| EAST | enzymeallergosorbent test | PI | punto isoeléctrico |
| ELISA | enzyme-linked immuno sorbent assay | PM | peso molecular |
| FAL | fosfatasa alcalina | RANTES | regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted |
| FDA | Food and Drug Administration | RAST | radioallergosorbent test |
| FPLC | cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad | RIE | radio inmunoensayo |
| GM-CSF | factor estimulador de crecimiento macrofágico | SDS | lauril sulfato de sodio |
| HLA | Antígeno leucocitario humano | TA | temperatura ambiente |
| HRP | peroxidasa de rábano picante | TCR | receptor de linfocitos T |
| ICAM | molécula de adhesión intercelular | Th | linfocitos T colaboradores |
| Ig | inmunoglobulina | TNF | factor necrosante tumoral |
| IL | interleuquina | VCAM | molécula de adhesión vascular |
| | | WHO | Organización Mundial de la Salud |

Breve introducción y objetivos generales



BREVE INTRODUCCION

Las alergias son la más comunes de las enfermedades inmunológicas. Distintos mecanismos pueden estar involucrados en su patogenia, aunque los dependientes de la IgE son los que se observan con mayor frecuencia. Con respecto a la etiopatogenia de la alergia se han identificado tanto factores genéticos como ambientales.

La incidencia de las enfermedades alérgicas se encuentra en aumento, principalmente en países desarrollados. La forma de evitarlas sería actuando sobre los factores ambientales en los grupos de riesgo juntamente con la realización de un diagnóstico preciso y la instauración de un correcto tratamiento. El diagnóstico de la patología se basa en la determinación de la IgE específica mediante la aplicación de pruebas *in vivo* e *in vitro*.

Actualmente los tratamientos aplicados son principalmente farmacológicos, aunque a nivel experimental los avances han sido muy importantes.

Hemos decidido estudiar la respuesta inmune de humanos frente a dos alérgenos diferentes: proteínas de la leche bovina (sistema proteico animal) y proteínas del látex natural (sistema proteico vegetal).

La alergia alimentaria desencadenada por proteínas de leche de vaca es una patología muy importante en nuestro medio debido a los hábitos dietarios de la población. Afecta principalmente a los niños desde el nacimiento hasta la primera infancia ya que su alimentación se basa casi exclusivamente en la ingestión de leche bovina. En estos casos un correcto y precoz diagnóstico es fundamental, ya que entre los factores predisponentes se destaca la sensibilización por exposición temprana. Por lo tanto, reemplazando las proteínas de leche de vaca por alimentos que no generen problemas de intolerancia alimentaria se pueden revertir los trastornos originados. El principal inconveniente reside en la caracterización antigénica y alérgica de los sustitutos lácteos empleados. Además se debe tener en consideración que las proteínas de la leche son frecuentemente encontradas como suplementos, adulterantes o contaminantes de otros alimentos.

Con respecto a la alergia a proteínas del látex esta enfermedad se ha transformado en un problema muy serio en las últimas décadas. La gran expansión producida en infecciones tales como HIV y hepatitis produjo un incremento en el uso de productos manufacturados a partir de látex. Este factor introdujo grandes cambios en la industria del caucho y en la

exposición a proteínas del látex por parte de la población general, y especialmente la relacionada con la Salud. A partir del análisis de los factores predisponentes se han detectado diferentes grupos de riesgo en los cuales la prevalencia se encuentra marcadamente incrementada.

El principal problema lo constituye la alta frecuencia con que se presentan las reacciones alérgicas y, en muchos casos, la severidad de las mismas. Este alérgeno presenta una distribución muy amplia en el medio que nos rodea, lo cual constituye un serio inconveniente para los individuos sensibilizados. Dado que el tratamiento más efectivo consiste en eliminar el contacto con los alérgenos, es importante conocer qué productos contienen proteínas provenientes del látex.

OBJETIVOS GENERALES

- Preparación de extractos proteicos y caracterización de su composición proteica, antigénica y alérgica.
- Desarrollo de métodos diagnósticos de detección de IgE específica sérica.
- Estudio de la respuesta inmune humoral en pacientes alérgicos.
- Caracterización de la antigenicidad y alergenidad de los sustitutos empleados en el tratamiento.

Introducción general



| | |
|--|----------|
| INTRODUCCION GENERAL | 6 |
| 1- Generalidades del sistema inmune | 6 |
| 2- Mecanismos de hipersensibilidad | 7 |
| - Hipersensibilidad Tipo I o inmediata | 8 |
| - Hipersensibilidad Tipo II | 8 |
| - Hipersensibilidad Tipo III | 8 |
| - Hipersensibilidad Tipo IV o tardía | 8 |
| 3- Alergia atópica | 9 |
| 4- Inmunoglobulina E y Receptor de IgE | 10 |
| 5- Subpoblaciones celulares | 14 |
| 5.1. Mastocitos, basófilos y mediadores farmacológicos | 14 |
| 5.2. Subpoblaciones de LT colaboradores (Th 1-Th 2) | 17 |
| 5.3. Eosinófilos | 26 |
| 5.4. Monocitos y macrófagos | 28 |
| 6- Etiología de los procesos alérgicos | 28 |
| 7- Alergenos | 33 |
| 7.1. Generalidades | 33 |
| 7.2. Clasificación | 34 |
| 7.3. Estandarización de extractos alérgicos | 35 |
| 8- Signos clínicos | 39 |
| 9- Diagnóstico | 41 |
| 9.1. Pruebas <i>in vivo</i> | 42 |
| 9.2. Pruebas <i>in vitro</i> | 44 |
| 10- Terapia | 46 |

INTRODUCCION GENERAL

1- Generalidades del sistema inmune

El sistema inmune está integrado por células y moléculas que a lo largo del proceso evolutivo se han especializado en el reconocimiento y diferenciación entre lo propio y lo no propio. Independientemente que lo no propio sea nocivo o no, la función primordial del sistema inmune es reconocer, limitar y/o eliminar agentes extraños mediante la acción de mecanismos que pertenecen a la inmunidad natural o innata y a la inmunidad específica o adquirida. Estos mecanismos se han perfeccionado a lo largo del tiempo como un sistema integral que puede reconocer potencialmente cualquier agente extraño. Es muy poco frecuente que se active un único mecanismo como consecuencia del encuentro con un agente extraño, en general se ponen en juego un conjunto de mecanismos efectores de manera de activar un sistema defensivo que sea rápido y altamente específico para eliminarlo o controlarlo.

Con el transcurso del tiempo se ha producido una co-evolución entre los microorganismos, que desarrollan estrategias para evadir a la respuesta inmune y colonizar al huésped, y el sistema inmune del organismo, para tratar de evitar que los microorganismos logren invadir, colonizar y ejercer algún mecanismo patogénico. Es decir que durante el proceso evolutivo se ha producido un equilibrio dinámico entre microorganismo y huésped. Desde organismos evolutivamente inferiores hasta los vertebrados se pueden identificar mecanismos de defensa muy variados en cuanto a su grado de complejidad y su efectividad, dado que los distintos tipos de microorganismos, y aún distintas cepas de la misma especie, han logrado desarrollar diversos mecanismos de evasión de los sistemas defensivos para sobrevivir en cada huésped.

De esta forma la supervivencia de un individuo en un determinado medio ambiente no dependerá de la activación de un único mecanismo protector para hacer frente a un agente patógeno, sino de un conjunto de mecanismos solapados, de los cuales uno o más serán efectivos en la protección del organismo. Las enfermedades infecciosas constituyen la fuerza selectiva que dirige la evolución del sistema inmune. La prueba más concluyente de los cambios que ha experimentado el sistema inmune como consecuencia de la permanente presión selectiva que ejerce el medio ambiente sobre el organismo es el polimorfismo del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) (Hill 1991). Como ejemplo podemos citar la elevada frecuencia con que se expresan ciertos alelos, y aún haplotipos, de HLA en individuos que habitan determinadas regiones de Africa. Esta combinación de moléculas presentadoras de antígenos les confiere protección frente a

enfermedades infecciosas endémicas como la malaria, causada por el *Plasmodium falciparum*. Se trata de una patología crónica en la cual ambos organismos sobreviven.

La primera barrera que deben enfrentar los microorganismos son los elementos de la respuesta inmune innata (piel, mucosas, sudoración, secreciones del tracto gastrointestinal, vía alterna del complemento, células fagocíticas, células "natural killer", mastocitos, etc.). Son mecanismos constitutivos, con una especificidad de reconocimiento limitada, sin embargo son altamente efectivos. Si el microorganismo logra sobrepasar esta barrera, se activarán los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa o específica (vía clásica del complemento, elementos del sistema inmune humoral y celular) que se caracterizan por ser inducibles, altamente específicos y por su "memoria inmunológica". Esta última característica le permite al organismo responder de una manera más rápida y enérgica frente a posteriores encuentros con el antígeno, dado que los elementos efectores estarán dotados de mayor afinidad para reconocer los determinantes antigénicos.

Este conjunto de mecanismos que se ponen en juego a partir de la entrada de un microorganismo pueden eliminarlo (remisión), pueden llevar a un estado de coexistencia entre el organismo y el microorganismo (cronicidad), o pueden no ser efectivos en su eliminación (enfermedad). Según determinadas características del agente patógeno (vía de entrada, número de microorganismos que invaden, mecanismo de invasión, mecanismo patogénico, etc.) serán los mecanismos que prevalezcan para proteger al organismo: anticuerpos específicos, linfocitos T (LT) regulatorios y efectores, células fagocíticas, células citotóxicas, etc. Esto es consecuencia de la presión selectiva ejercida por el medio con el transcurso del tiempo.

Las patologías inmunosupresoras, ya sean genéticas o adquiridas, ponen en evidencia el rol del sistema inmune, principalmente en la protección contra microorganismos infecciosos. Pero además, el sistema inmune interviene en el control de una gran variedad de condiciones clínicas, incluyendo rechazo de tumores, órganos y tejidos transplantados, enfermedades autoinmunes y alergias.

2- Mecanismos de hipersensibilidad

La palabra alergia significa reactividad alterada. Incluye todos aquellos mecanismos inmunológicos que se activan frente a la entrada de un antígeno y que van a reaccionar con componentes propios del organismo. Este conjunto de reacciones se denominan reacciones de hipersensibilidad y fueron clasificadas por Gell y Coombs en 4

tipos (Gell 1975), según el principal mecanismo patogénico responsable del daño celular y tisular:

- Hipersensibilidad Tipo I o inmediata

Es la respuesta inmune mediada por la inmunoglobulina E (IgE) frente a antígenos solubles, en general inocuos y comúnmente presentes en el medio ambiente. Se produce la liberación de mediadores preformados en mastocitos y basófilos, generando un proceso inflamatorio en minutos. Es el mecanismo responsable de los procesos de anafilaxia, eczema, etc.

- Hipersensibilidad Tipo II

Es la respuesta inmune mediada por las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) frente a antígenos presentes en superficies de células propias o extrañas, o con proteínas propias de la matriz extracelular. Los mecanismos de citotoxicidad dependientes de complemento o mediados por anticuerpos (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos-ADCC) son los responsables del daño celular. Por ejemplo: reacciones contra drogas que se unen a la membrana plasmática de glóbulos rojos.

- Hipersensibilidad Tipo III

Es la respuesta inmune mediada por IgG o IgM que forman complejos inmunes con antígenos solubles. Dependiendo de su tamaño, serán clarificados de la circulación o se depositarán sobre ciertas membranas. Esto último desencadenará un foco inflamatorio por la activación del sistema de complemento y la consiguiente producción de sustancias quimiotácticas (por ejemplo de neutrófilos) y anafilotoxinas (C3a, C4a, C5a). Por ejemplo: la reacción de Arthus producida al inocular en la piel una sustancia extraña como el veneno de un insecto.

- Hipersensibilidad Tipo IV o tardía

Es la respuesta inmune mediada por LT citotóxicos (LT CD8⁺) frente a antígenos celulares, o por interleuquinas, proteasas y radicales libres secretados por macrófagos activados por las citoquinas provenientes de LT CD4⁺ específicos del antígeno. Por ejemplo: reacciones producidas por haptenos (drogas, venenos, metales) que se unen a proteínas propias y generan un foco inflamatorio localizado que se observa a las 24 - 72 horas. Se denomina dermatitis de contacto.

Por lo tanto las reacciones de hipersensibilidad se producen por una reactividad inadecuada, exagerada o por la falta de regulación de los mecanismos fisiológicos

inmunológicos que se activan por la presencia de componentes del medio ambiente. La principal consecuencia es el daño tisular causado por el proceso inflamatorio que desencadenan.

3- Alergia atópica

Las enfermedades alérgicas son las patologías inmunológicas más comunes que se presentan en humanos. En los países desarrollados su incidencia se ha incrementado notablemente en los últimos años. Desde los primeros informes de desórdenes alérgicos reportados en Suiza en el año 1927 (0.1 – 0.28 %) se ha duplicado la prevalencia de esta patología en la población general, por cada década. En la década del 90 se han informado valores de 30-35 % considerando casos de rinoconjuntivitis, eczema, asma, etc. (Wuthrich 1989, Wuthrich 1995, ISAAC 1998, Kay 1994). Este marcado incremento producido en los últimos 40 años no puede ser atribuido a variaciones genéticas, las cuales requieren mayores períodos tiempo para que se produzcan, ni a un aumento en la exposición a los alérgenos. Lo que se han modificado son factores ambientales (polución, control de enfermedades infecciosas, etc.) que afectan principalmente al individuo durante el período pre-natal y la primera infancia, donde ejercen una marcada influencia en la presentación de la patología.

En una enfermedad alérgica no siempre es posible identificar el mecanismo causante de la patología, además suele presentarse con una sintomatología muy variada: asma, rinitis, conjuntivitis, dermatitis, gastroenteritis, urticaria, anafilaxia, etc. En general más de un mecanismo está involucrado en el proceso inflamatorio y su activación se produce en forma secuencial. Basicamente se denomina enfermedad alérgica a la que está originada por mecanismos de hipersensibilidad Tipo I, ya que los mecanismos IgE-dependientes son los que se observan más frecuentemente.

Se denomina **atopía** al proceso alérgico mediado por la IgE. Está asociado a una excesiva producción de IgE por los linfocitos B (LB), bajo la regulación de citoquinas secretadas por linfocitos T: interleuquina 4 (IL) e IL 13 (Gauchat 1990). Por lo tanto, la mayoría de los alérgicos son atópicos.

Con el transcurso del tiempo se han observado incrementos en los valores de los niveles séricos de IgE específica y en los porcentajes de pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos. Por lo tanto lo que se ha producido en las últimas décadas es un incremento

en la prevalencia de la atopía, que se correlaciona con la mayor incidencia de los procesos asmáticos (Burrows 1989, Nakagomi 1994).

Con el término **alergeno** se denomina al antígeno reconocido por la IgE. En general son sustancias naturales, inocuas, hidrosolubles que ingresan al organismo por inhalación o por ingestión.

El punto crítico entre atopía y alergia es la degranulación de los basófilos y mastocitos mediada por la interacción entre la IgE unida a sus receptores de membrana y el alergeno. Sin embargo en el proceso inflamatorio desencadenado por la presencia del alergeno intervienen otras células, tales como eosinófilos, linfocitos, células endoteliales, macrófagos y neutrófilos.

La principal vía de ingreso de los alergenos al organismo se produce a través de las mucosas, en especial las mucosas gastrointestinal y respiratoria. Están provistas de un sistema especializado de células (sistema inmune de mucosas) que se encargan de montar la respuesta inmune localizada frente a la entrada de una sustancia extraña. Cuando el antígeno ingresa por primera vez al organismo será procesado por las células presentadoras de antígeno (CPA) locales y mediante la colaboración de los LT desencadenará la síntesis y secreción de IgE por parte de LB sistémicos y de mucosas. La IgE secretada pasa a circulación y se unirá a receptores específicos presentes en la membrana de distinto tipo de células (basófilos, mastocitos, eosinófilos, etc.) donde cumplirá su rol efector. Este proceso se denomina **sensibilización**.

Frente a posteriores exposiciones al alergeno sensibilizante, éste se unirá a la IgE ya presente en la superficie de las células, las cuales liberarán el contenido de sus gránulos citoplasmáticos y se desencadenarán los procesos inflamatorios locales o sistémicos.

4- Inmunoglobulina E y Receptor de IgE

La estructura molecular de IgE e IgM difieren de las de los demás isotipos en que poseen 4 dominios constantes en las cadenas pesadas ϵ y μ respectivamente. Es decir que tienen un dominio constante demás respecto a las otras inmunoglobulinas. Esto refleja un rasgo evolutivo ya que en lugar de tener una región bisagra con las características conformacionales que le permiten a los Fab (porción de la molécula de anticuerpo con el sitio e unión al determinante antigénico) adquirir la disposición espacial para poder unirse a los dos epitopes (como se observa en las cadenas α , δ y γ), presenta una secuencia de aminoácidos que define una estructura cuaternaria en forma de dominios de

inmunoglobulinas. Esto indicaría que las IgE e IgM son evolutivamente más primitivas que los otros isotipos. Además la IgE tiene un porcentaje de hidratos de carbono (13 %) similar a la IgM (10-12 %) y mayor a los demás isotipos (3-9 %), lo cual determina que su peso molecular sea también superior (190 kDa). La vida media de la IgE en circulación es de 2,5 días, aunque cuando está unida a sus receptores es mayor. No atraviesa la placenta ya que los receptores de Fc presentes en la placenta no reconocen su cadena pesada ϵ . Tampoco es capaz de fijar complemento, ya que no es reconocida por C1q.

La IgE cumple un rol central en la patogénesis de los procesos alérgicos, aunque la instauración de un foco inflamatorio juega un papel muy importante en el inicio de la respuesta inmune en general (Peters 1987). La función primordial de la IgE es intervenir en la respuesta inmune específica contra parásitos extracelulares, mediando la activación de mastocitos y eosinófilos (Capron 1981, Kojima 1985). Además, a través de la unión a receptores presentes en distintas CPA interviene en la captación de antígenos solubles para su procesamiento y presentación, en el contexto del MHC (Kehry 1989).

La IgE se encuentra en muy baja concentración en circulación (0,0003 mg/ml ó 0,019 % del total de las inmunoglobulinas), ya que en su mayor proporción se encuentra unida a sus receptores específicos, principalmente en mastocitos tisulares, basófilos circulantes y eosinófilos. Es decir que la IgE secretada por las células plasmáticas cumplen su función efectora luego de unirse a su receptor específico. Estos receptores, a diferencia de los receptores de IgG, tienen la capacidad de unir al ligando en forma monomérica y libre, es decir que no requieren que la IgE esté unida al alérgeno para poder reconocerla. La IgE se une al receptor a través del dominio constante C ϵ 3 de la cadena pesada.

Existen dos tipos de receptores para IgE:

1) **Fc ϵ RI**: son los receptores de alta afinidad (K_a : 10^9 - 10^{10} M $^{-1}$ y K_d 10^5 M $^{-1}$) que se encuentran en altos niveles en basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. También ha sido detectado, en niveles menores, en células presentadoras de antígeno como: células de Langerhans, células dendríticas y macrófagos (Sihra 1997, Bieber 1997). En individuos no alérgicos la densidad con que se expresan es de $2-3 \cdot 10^4$ receptores/mastocito. En individuos alérgicos este valor alcanza 10^6 receptores/mastocito. La densidad de Fc ϵ RI expresada en mastocitos y basófilos está regulada por los niveles de IgE sérica y de IL 4. Esto finalmente incide sobre la cantidad de mediadores y citoquinas liberadas al medio.

(Toru 1996, Shaikh 1997). El receptor tiene una estructura tetramérica $\alpha\beta\gamma\gamma$ (figura 1), donde la porción α extracelular es la que reconoce a la cadena pesada de la IgE y presenta plegamientos en estructura de dominios de inmunoglobulinas. La cadena β inicia la señal de transducción a través de una tirosín quinasa que fosforila los motivos ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) de las cadenas β y γ . Se caracteriza por tener 4 porciones hidrofóbicas transmembrana. La cadena γ tiene una porción citoplasmática muy extensa. Es la responsable del transporte del receptor desde el aparato de Golgi a la membrana y participa en la transducción de señales al interior de la célula. Al fosforilarse sus motivos ITAM se inicia la cascada de fosforilaciones hacia el interior celular. Esta cadena γ también se encuentra presente en los receptores Fc γ RII (CD 32) y Fc γ RIII (CD 16) de mastocitos murinos y por lo tanto pueden unir, aunque con baja afinidad, IgG₁ o IgE (Miyajima 1997). Además, presenta una alta homología con la cadena ξ del receptor de antígenos del LT (TCR). La activación y degranulación de mastocitos y basófilos requiere que el alérgeno una o “puentee” al menos dos moléculas de IgE con la misma especificidad, y en total 200-300 moléculas/célula (Dembo 1979).

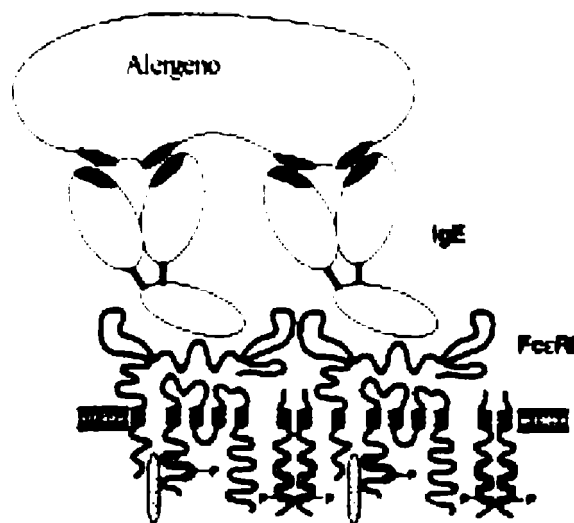


FIGURA 1- Estructura del receptor Fc ϵ RI con dos moléculas de IgE puenteadas por el alérgeno

2) Fc ϵ RII (CD23): este receptor pertenece a la familia de las lectinas calcio-dependiente, y por lo tanto su afinidad por la IgE resulta marcadamente inferior respecto al Fc ϵ RI (Ka:

10^5 - 10^8 M^{-1}). En la superficie del mastocito se encuentran en el orden de 10^3 - 10^4 receptores/célula, se expresa como monómero y puede ser clivado por proteólisis generando una porción soluble (sCD23) que retiene la capacidad de unir IgE. En pacientes atópicos se los observa en mayor densidad superficial. Además de la IgE monomérica, sus ligandos pueden ser la IgG₄, CD21 o receptor de C3b y componentes de la cápside del virus de Epstein-Barr. Existe bajo dos formas: **FcεRIIa** que está presente sólo en linfocitos B y el **FcεRIIb** que se expresa en células dendríticas, linfocitos T, monocitos, macrófagos, eosinófilos, plaquetas, células de Langerhans, y ciertas células del epitelio tímico. En los LB se le ha asignado diversos roles: receptor de antígeno, regulador de la síntesis de IgE, activación celular, fagocitosis dependiente de IgE, etc. (Bonnefoy 1995, Gordon 1994). En las células dendríticas incrementan su eficiencia como célula presentadora al captar antígenos por endocitosis mediada por un anticuerpo.

Para que la unión del alérgeno a la IgE desencadene la señal de transducción celular es suficiente con que se agreguen al menos dos receptores de IgE, es decir que el alérgeno debe poseer al menos dos epitopes capaces de unirse a dos moléculas de IgE en la membrana de la célula efectora (Metzger 1992). De esta manera se inducen cambios en la membrana plasmática que inician las señales de transducción con el incremento del calcio citosólico. Este movimiento de calcio genera finalmente la activación de factores de transcripción nucleares, fusión de la membrana plasmática con las membranas de los gránulos, liberación de su contenido al exterior, activación de la síntesis de mediadores lipídicos y citoquinas, y secreción de las mismas. (Beaven 1996).

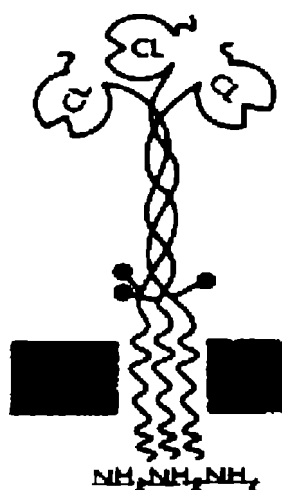


FIGURA 2. Estructura del Fcε RII

5- Subpoblaciones celulares

Las principales células efectoras en los procesos alérgicos agudos son los mastocitos, basófilos y eosinófilos. En las reacciones de fase tardía estas células también contribuyen a la patogenia, aunque LT, monocitos macrófagos y neutrófilos se encuentran presentes en los infiltrados tisulares.

Los procesos alérgicos mediados por IgE son dependientes de citoquinas presentes en el medio: síntesis de IgE (IL 4, IL 13), reclutamiento de basófilos (IL 4, factor necrosante tumoral α o TNF- α), síntesis de mediadores farmacológicos (IL 3, IL 4), producción y activación de eosinófilos (IL 3, IL 5, factor estimulante de colonias macrofágicas granulocíticas o GM-CSF), reclutamiento de eosinófilos (IL 3, IL 5, IL 16, GM-CSF, quimoquinas), reclutamiento de monocitos y LT (IL 16, quimoquinas), etc. Las células productoras de estas citoquinas son numerosas. Los LT y los mastocitos parecen jugar un papel preponderante en el inicio de los procesos, principalmente por la secreción de TNF- α e IL 4.

5.1. Mastocitos, basófilos y mediadores farmacológicos

La principal población celular que origina el foco inflamatorio frente a la entrada del alérgeno son los mastocitos. Al activarse por diferentes estímulos secretan potentes mediadores biológicamente activos presentes en el interior de sus gránulos citoplasmáticos (Gordon 1990, Galli 1995). Estos incrementan el flujo sanguíneo (reservorio de moléculas y células efectoras y regulatorias), aumentan la permeabilidad capilar, inducen la contracción de los músculos lisos y la producción de mucus para ayudar a expulsar al agente extraño. Este proceso genera un infiltrado de células inflamatorias que contiene además eosinófilos, neutrófilos y basófilos, cuyo tráfico celular es dirigido por factores quimiotácticos y la expresión selectiva de determinadas moléculas de adhesión.

La instauración de un proceso inflamatorio localizado le permite al tejido donde se encuentra el antígeno, contener su expansión y al mismo tiempo incrementar la afluencia de células y moléculas desde el torrente sanguíneo para activar los mecanismos inmunológicos efectores. La acumulación de líquido extracelular, o edema, incrementa el drenaje linfático, a través del cual las células presentadoras de antígeno y los antígenos son transportados hacia el ganglio regional más cercano. Este es el órgano histológicamente especializado en montar una respuesta inmune específica.

Los mastocitos, basófilos y eosinófilos tienen un progenitor hematopoyético común en médula ósea (precursor CD34+), donde el principal factor de crecimiento es la

IL 3. Durante las etapas tempranas de su ontogenia se induce la expresión de RFcε. En individuos atópicos la cantidad de este progenitor hematopoyético se encuentra incrementada en médula ósea, y puede ser detectado en circulación (Denburg 1985, Otsuka 1985). En las mucosas la presencia de citoquinas provenientes de células T y no T (IL 3, IL 4, IL 5, IL 9, GM-CSF) inducen su maduración y diferenciación (Denburg 1980).

Los basófilos abandonan la médula ósea como células maduras y se localizan en la circulación sanguínea, constituyendo menos del 1 % de los leucocitos sanguíneos. Se ha observado que en ciertos procesos inflamatorios (frente a células tumorales, en reacciones alérgicas de fase tardía, etc.) estas células pueden extravasarse y acumularse en los tejidos circundantes.

Los mastocitos abandonan la médula ósea y alcanzan su madurez en tejidos vascularizados, donde residen. Su localización periférica se encuentra marcadamente elevada en individuos alérgicos (3-4 veces mayor que en un no atópico), principalmente en los períodos de sensibilización. Del mismo modo, en procesos infecciosos, tales como los originados por Nematodos, se observa un incremento de los mastocitos tisulares, atraídos por citoquinas secretadas por LT. (Jarrett 1982).

Los mastocitos pueden sufrir una activación inmunológica (mediada por FcεR, receptores de componentes del complemento, receptores de citoquinas, etc.) o no inmunológica (estímulos físicos, drogas, contacto entre células, sustancias liberadas por microorganismos, etc.), constituyendo procesos que pueden operar en forma independiente o sinérgica. El tiempo necesario para que se produzca la degranulación de estas células varía notablemente: mientras la activación inmunológica se produce en forma casi instantánea (segundos), la no inmunológica requiere de horas.

Mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas se han identificado a los mediadores farmacológicos presentes en los gránulos citoplasmáticos de mastocitos y basófilos. Estos mediadores pueden ser clasificados como:

- **preformados:** se encuentran almacenados en gránulos citoplasmáticos y son secretados al activarse la célula. Los principales mediadores de mastocitos y basófilos son: histamina (el más importante en el hombre, también presente en ratas, ratones y conejos), serotonina (importante en ratones y conejos, no es sintetizada por mastocitos humanos), proteasas neutras (carboxipeptidasas, serin-proteasas, catepsinas, hidrolasas, sulfatasas, exoglicoxidasas etc.), proteoglicanos (heparina, sulfato de condroitina), TNF-α, factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos, factor activador de plaquetas, etc. (Schwartz

1993). Al igual que en los eosinófilos los gránulos citoplasmáticos contienen lisofosfolipasa que forman los cristales de Charcot-Leyden.

Los mastocitos son el principal reservorio de histamina de los tejidos, mientras que los basófilos, lo son en el torrente sanguíneo. Este mediador es sintetizado por descarboxilación de la histidina. Los proteoglicanos estarían implicados en la cinética de liberación y activación de los diferentes mediadores cuando el contenido de los gránulos es expuesto al medio extracelular. Se ha demostrado que la interacción entre estos componentes determina que la histamina sea rápidamente liberada a pH neutro. Actúa sobre células endoteliales y de la musculatura lisa a través de diferente tipo de receptores. Las proteasas son los mediadores mayoritarios de los gránulos, siendo la triptasa (serín-endopeptidasa) la principal enzima en los mastocitos humanos. Se la cuantifica en distintos fluidos biológicos como medida de la activación de mastocitos. El contenido de las otras proteasas variará según la subpoblación de mastocitos.

Por lo tanto estos mediadores son los responsables de los efectos inmediatos observados al activarse los mastocitos, ya que se secretan en forma instantánea y actúan con gran intensidad. **de síntesis:** la activación celular de mastocitos y basófilos inicia la síntesis *de novo* de derivados del ácido araquidónico de membrana como leucotrienos (LtC₄ y sus derivados LtD₄ y LtE₄), prostaglandinas (PGD₂) y tromboxanos. Son mediadores pro-inflamatorios con actividad vasoactiva. Los mastocitos además tienen la capacidad de producir numerosas citoquinas (IL 1, IL 3, IL 4, IL 5, IL 6, IL 9, IL 8, IL 12, IL 13, GM-CSF, factor de crecimiento de fibroblastos y TNF- α) (Gordon 1990, Robinson-Durham 1993, Bischoff 1999), mientras que en los basófilos sólo se ha demostrado la síntesis de IL 4 e IL 13, bajo determinadas condiciones. Las citoquinas constituyen los mediadores más recientemente identificados.

Las cantidades relativas de los distintos derivados de fosfolípidos varía según la subpoblación y localización de los mastocitos.

Los efectos causados por estos mediadores se observan a tiempos mayores, por lo cual estas células también son importantes en reacciones de fase tardía y en la cronicidad. Es decir que la función de los mediadores de síntesis es mantener el foco inflamatorio durante tiempos prolongados.

Por lo tanto los mastocitos y basófilos cumplen un rol central en los procesos inflamatorios que se producen inmediatamente después del contacto con el alérgeno, durante las reacciones de fase tardía y en la inflamación persistente característica de un proceso alérgico crónico.

Pero además estas células son muy importantes como elementos de la respuesta inmune innata y específica, a través de las siguientes funciones:

- se ha demostrado su capacidad fagocítica (Abraham 1997) y de procesamiento y presentación antigénica (Frangji 1996), por lo cual podrían actuar como CPA.
- expresan CD40L por lo cual pueden inducir, junto a la secreción de citoquinas, la síntesis de IgE en LB (Gauchat 1993, Pawankar 1997).
- la secreción de citoquinas les permite reclutar y activar distinto tipo de células (basófilos, eosinófilos, monocitos, neutrófilos y LT), mediante la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales de distintos órganos (selectinas E y P, VCAM-1, ICAM-1) (Bevilacqua 1993, Bochner 1994).
- regulan la diferenciación de los LT a través de las citoquinas secretadas.

Los mastocitos pueden ser divididos en dos subpoblaciones:

- **Células mastoides de tejido conectivo (CTMC):** se distribuyen alrededor de los vasos sanguíneos; tienen una densidad de receptores de IgE de $3 \cdot 10^4$ /célula y contienen una gran cantidad de histamina preformada en sus gránulos. Su proliferación a partir de médula ósea no es inducible por interleuquinas de LT.
- **Células mastoides de mucosas (MMC):** se encuentran en mucosas, principalmente de intestino y pulmón, hacia donde llegan por los vasos sanguíneos guiadas por moléculas de adhesión. La densidad superficial de receptores es de $2 \cdot 10^5$ /célula y contienen menor cantidad de histamina en sus gránulos. La proliferación y maduración en médula ósea es dependiente de LT (IL 3, GM-CSF e IL 5).

Por lo tanto los mastocitos están distribuidos por todo el organismo para detectar la presencia de antígenos. Como consecuencia de su activación secretan metabolitos con propiedades pro-inflamatorias y regulatorias. En el caso particular de individuos alérgicos estos procesos se encuentran exacerbados y pueden ocasionar un daño tisular, que varía desde leves (dermatitis, rinitis, náuseas, tos, etc.) hasta severos (asma y anafilaxia) (Galli 1993, Lantz 1998).

5.2. Subpoblaciones de LT colaboradores (Th 1-Th 2)

Los linfocitos T son células que se generan en médula ósea y maduran en el timo. Posteriormente pasan a circulación y se las encuentra en sangre periférica, linfa, órganos linfoides (bazo, ganglios linfáticos) y otros órganos (piel, hígado, tracto gastrointestinal,

tracto respiratorio) en los cuales cumplen diversas funciones: eliminación de células, activación o inhibición de otras células del sistema inmune, regulación de la secreción de moléculas efectoras por parte de células del sistema inmune, etc.

La evidencia experimental, obtenida a partir de los trabajos de T. Mosmann en la década del 80 (Mosmann 1986, Mosmann 1989), sobre la existencia de subpoblaciones murinas funcionales de linfocitos T helpers CD_4^+ o colaboradores (Th) ha ayudado a dilucidar los mecanismos en los que están involucradas las diferentes células que intervienen en la patogénesis de las reacciones alérgicas. La caracterización inicial de estas subpoblaciones en modelos animales despertó el interés en determinar si estos mismos fenotipos también pueden ser hallados en humanos. En base a los patrones de secreción de citoquinas a partir de clones T específicos aislados de individuos con patologías autoinmunes o alérgicas (Romagnani 1991, Wierenga 1990) se confirmó su existencia .

Cuando un LT se activa por unión de su receptor específico de antígeno (TCR) al complejo péptido-MHC presente en la superficie de la CPA, junto a una serie de señales coestimulatorias, se genera una cascada de señales de transducción. Consecuentemente el LT prolifera y se diferencia a un estadio celular en el cual se sintetizan un conjunto de proteínas. Posteriormente se pueden expresar en membrana (receptores, etc.) o secretarse al medio extracelular, y actuar en el microentorno que las rodea o a distancia (IL). A su vez, estas moléculas pueden ejercer su acción sobre la misma célula (efecto autócrino) o sobre distinto tipo de células (efecto parácrino) cumpliendo una función efectora o regulatoria. Entre las proteínas secretadas se encuentran las interleuquinas que van a ejercer su acción sobre distinto tipo de células a través de la unión a receptores específicos de membrana. Estos receptores presentan regiones intracitoplasmáticas con actividad quinasa que al activarse producen la fosforilación del mismo y su activación. La agregación de varios receptores de membrana iguales y su posterior activación genera una cascada de señales intracelulares que culmina con la activación celular (Kishimoto 1994).

Las subpoblaciones de LT sólo pueden ser diferenciadas en base al patrón de IL que secretan, ya que no se han identificado marcadores de superficie constitutivos y diferenciales.

Estas subpoblaciones celulares no sólo posibilitan el reconocimiento de una sustancia extraña en el organismo, para lo cual fueron seleccionadas en el timo, sino que también activan determinados mecanismos protectores para contener o eliminar al

antígeno. Por lo tanto, los linfocitos T CD4⁺, a través de la secreción de interleuquinas, son críticos en la regulación de la activación de los mecanismos efectores.

La caracterización de las citoquinas secretadas por clones T específicos permitió identificar dos subpoblaciones celulares llamadas: **Th 1** y **Th 2**. Las células que dan origen a estas subpoblaciones se denominan células pluripotenciales o **Th p** o **Th 0** y secretan principalmente IL 2.

Se demostró que los **Th 1** secretan principalmente IL 2, IL 3, TNF- α y - β , GM-CSF e interferón- γ (IFN- γ). En base a las funciones que ejercen estas interleuquinas al interactuar con la célula blanco, se concluye que la subpoblación Th 1 activa mecanismos protectores dependientes de la fagocitosis, principalmente activación de macrófagos. Son mecanismos de la inmunidad celular que actúan frente a microorganismos intracelulares (virus, bacterias, protozoarios). Además, inducirán en los LB, tanto murinos como humanos, la síntesis de determinados isotipos de inmunoglobulinas las cuales median procesos fagocíticos (**tabla 1**), mientras que inhibe la síntesis de IgE (Coffman 1986, Amigorena 1990, Snapper 1992, Megga 1992, Kitani 1993, Wilder 1996).

Por otro lado, la subpoblación **Th 2** secreta IL 3, IL 4, IL 5, IL 6, IL 9, IL 10, IL 13 y GM-CSF, TGF- β , TNF- α activando mecanismos independientes de la fagocitosis, ya que la IL 10 inhibe la activación de la subpoblación Th 1, y por lo tanto de los macrófagos. La diferenciación de esta subpoblación linfocitaria a partir de las células precursoras es inhibida por IFN- γ . Su principal función será inducir la síntesis de determinados isotipos de inmunoglobulinas en LB y estimular la proliferación y diferenciación de determinadas poblaciones celulares (**tabla 1**). Por lo tanto esta subpoblación activará mecanismos de la respuesta adaptativa humoral. Las principales células blanco de estas IL serán:

- LB: la IL 4 induce la síntesis de IgE (junto a la IL 13) en LB de mucosas, IgG₁, IgG₄ e IgA, mientras que la IL 5 e IL 6 inducen la síntesis de IgA. Esto ha sido demostrado mediante el empleo de pruebas *in vitro* de cultivos celulares en ratones y humanos. (Isakson 1982, Coffman 1986, Snapper 1987, Murray 1987, Bond 1987, Snapper 1988, Gascan 1991, Mega 1992).
- basófilos, mastocitos y eosinófilos: IL 3, IL 4, IL 5, GM-CSF inducen proliferación y maduración de células progenitoras en médula ósea las cuales se diferenciarán a basófilos, mastocitos y eosinófilos. Estas células serán atraídas hacia el foco inflamatorio por acción de estas interleuquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión.

El estudio de modelos animales desafiados con distintos microorganismos infecciosos (ratones “knock out” para ciertas IL, o tratados con IL recombinantes, o con anticuerpos monoclonales anti-IL, o con anticuerpos anti-receptores de IL), modelos animales para patologías autoinmunes, y LT humanos provenientes de individuos con diferentes patologías, permitieron concluir acerca de la existencia de linfocitos Th 1 y Th 2 en el contexto fisiológico, y la influencia que ejercen *in vivo* las interleuquinas sobre la síntesis de los distintos isotipos de inmunoglobulinas (Finkelman-Katona-Mosmann 1988, Finkelman-Katona-Urban 1988, Pockley 1991, Wilder 1996).

Tabla 1 – Influencia de las IL en la síntesis de inmunoglobulinas.

| | Ratones | Humanos |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| IL 4 | IgG ₁ , IgE, IgA | IgG ₄ , IgE, IgA |
| IFN γ | IgG _{2a} , IgG ₃ | IgG, IgA |
| TGF β | IgG _{2b} , IgA | IgA |
| IL 5, IL 6 | IgA | IgA |

De las interleuquinas mencionadas las más importantes desde el punto de vista efector e inmunorregulatorio son IFN γ , IL 4 e IL 10 (Seder 1994). Se han identificado otras subpoblaciones supresoras que intervienen en diferentes procesos:

- **Tr 1:** son linfocitos T CD4⁺ que producen IL 2, IL 5, IL 10, IFN- γ y TGF- β ; participan en procesos de tolerancia (Saloga 1999).
- **NK T:** son células del linaje NK que secretan citoquinas Th 1, principalmente IFN- γ y participan en los mecanismos de defensa anti-tumoral (Seo 1999).
- **LT CD4⁺ CD62⁺:** son LT que producen bajos niveles de IL 2 e IFN- γ y no producen IL 4 e IL 10. Participan en fenómenos de autoinmunidad (Lepault 2000).
- **Th 3:** son LT CD4⁺ y producen principalmente TGF- β , IL 4 e IL 10. Participan en procesos de tolerancia y supresión de numerosas células (Fukaura 1996).

Por lo tanto estas interleuquinas intervienen en los mecanismos que operan frente a microorganismos extracelulares (bacterias y principalmente parásitos Nematodes) o intracelulares (virus, bacterias y parásitos), procesos de autoinmunidad, procesos alérgicos y en la modulación de los diferentes mecanismos del sistema inmune.

Sin embargo este modelo, que implica asignarle un rol funcional a cada subpoblación de LT, es una simplificación de un proceso complejo y dinámico, que resulta muy útil para explicar muchos fenómenos involucrados en la respuesta inmune protectora y en los procesos inmunopatológicos (enfermedades autoinmunes y enfermedades alérgicas). En realidad son los extremos de un continuo de subpoblaciones celulares que se encuentran entre Th 1 y Th 2, ya que en muchas situaciones no se observa un perfil de citoquinas compatible con las subpoblaciones descritas, o es posible inducir en ciertos clones T la expresión de patrones solapados de citoquinas que corresponderían a otras subpoblaciones de LT colaboradores (Kelso 1995). En ciertas ocasiones el sistema inmune requiere para activar los mecanismos efectores protectores una combinación de IL que no se corresponden con los patrones descritos.

Existen disfunciones inmunopatológicas en las que se puede atribuir claramente su etiología a una determinada subpoblación de LT. En los casos de infecciones por microorganismos patógenos en general no es tan claro asignarle a una determinada subpoblación un rol funcional. Así, a las Th 1 se les asigna un papel fundamental en el control de las infecciones por agentes intracelulares y en el origen de diversas enfermedades autoinmunes (Diabetes Mellitus insulino-dependiente, encefalomiелitis autoinmune experimental, etc.). Sin embargo, la eliminación de ciertos antígenos intracelulares requiere la intervención de mecanismos Th 2-dependientes. Por otro lado, las Th 2 activan mecanismos de defensa contra microorganismos extracelulares y son los responsables de los procesos alérgicos (Finkelman 1997, Abbas 1996, Aebischer 1996). El sistema inmune también interviene en el control de procesos tumorales. Según las características del tumor se pueden observar LT CD4⁺ Th 1, Th 2 o LT citotóxicos CD8⁺. En los mecanismos inmunológicos involucrados en el rechazo de órganos transplantados no existe una subpoblación celular única que sea la efectora para eliminar al tejido extraño.

Probablemente antes de surgir estas dos subpoblaciones el sistema inmune haya sido efectivo en controlar a los microorganismos a los que se encontraba expuesto mediante mecanismos más rudimentarios. Sin embargo los patógenos, para poder sobrevivir en determinados huéspedes, debieron adaptarse y desarrollar mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Estas variaciones indujeron, con el transcurso del tiempo, cambios en el sistema inmune apareciendo mecanismos más sofisticados. De este modo la

evolución a lo largo del tiempo ha sido un proceso de adaptación dinámica entre microorganismos y huésped.

En organismos evolutivamente superiores frente a la entrada de un agente infeccioso actuarán en primera instancia los mecanismos constitutivos de la respuesta innata. Al mismo tiempo se inicia la activación de los mecanismos de la respuesta inmune específica o adaptativa, que actuarán en el caso que los mecanismos innatos no sean lo suficientemente efectivos para eliminar al antígeno. Aquí los LT juegan un rol central ya que pueden eliminar directamente al microorganismo por lisis, colaborar con la activación de células citotóxicas, activar a otras células del sistema inmune (macrófagos), colaborar con los LB para la secreción de anticuerpos, modular la activación de otras células del sistema inmune, etc. Estas funciones las realizan a través de la secreción de citoquinas y quimoquinas principalmente

Factores inherentes al microorganismo (naturaleza del antígeno, vía de colonización, número de microorganismos necesarios para formar un foco infeccioso desde donde expandirse, localización, etc.) y al organismo (vía de ingreso, interacción microorganismo-células del huésped, localización intra o extracelular, madurez del sistema inmune, estado hormonal, interacción MHC-péptido, tipo de célula presentadora de antígeno interviniente, haplotipo MHC, densidad de moléculas MHC-péptido en la superficie celular, señales coestimuladoras, balance de interleuquinas en el microentorno de activación, etc.) determinarán qué subpoblación celular se activará para generar el mecanismo protector.

En las primeras etapas las IL regulatorias más importantes son IFN- γ , cuya fuente principal son las células NK, y la IL 4 proveniente de mastocitos y eosinófilos. En el caso que el microorganismo no sea eliminado por la respuesta innata, se activarán los mecanismos inmunológicos de la respuesta adaptativa específica. Pero estos mecanismos además de ser protectores para el organismo, pueden originar procesos inmunopatológicos: enfermedades autoinmunes (mediadas por Th 1) y procesos alérgicos (mediados por Th 2).

Para el caso particular de los Nematodos, éstos inducen una fuerte respuesta Th 2, ya que la infección con este tipo de Helmintos está asociada a hipereosinofilia, niveles elevados de IgE sérica (Finkelman 1997), aumento de IgG₁ y mastocitosis (Pritchard 1983, Madden 1991). Estos parásitos extracelulares se multiplican en la luz del intestino. El sistema inmune desarrolló con el transcurso del tiempo mecanismos efectivos para

controlarlo. Los parásitos liberan antígenos que son captados, procesados y presentados por CPA especializadas. Estas activan a linfocitos T CD_4^+ vírgenes que proliferan y se diferencian a Th 2 por la presencia de IL 4 en el microentorno en el cual se activan. Esta citoquina proviene de la activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos (células de la respuesta innata) como consecuencia del reconocimiento del microorganismo. Los linfocitos Th 2 secretan IL que ejercen un efecto regulatorio sobre la proliferación y diferenciación de los LB a células plasmáticas secretoras de IgE. La IgE circulante se une a la superficie del parásito lo que posibilita que actúen los eosinófilos, células efectoras en la eliminación del parásito (Rotman 1996). Además la IL 5 proveniente de los Th 2 inducen la proliferación, diferenciación y activación de estas células. Los eosinófilos activados secretan proteínas (proteína catiónica del eosinófilo y proteína básica de membrana) y radicales libres del oxígeno y nitrógeno que dañan la membrana del parásito. Este proceso se denomina citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Coffman 1989, Levitz 1995).

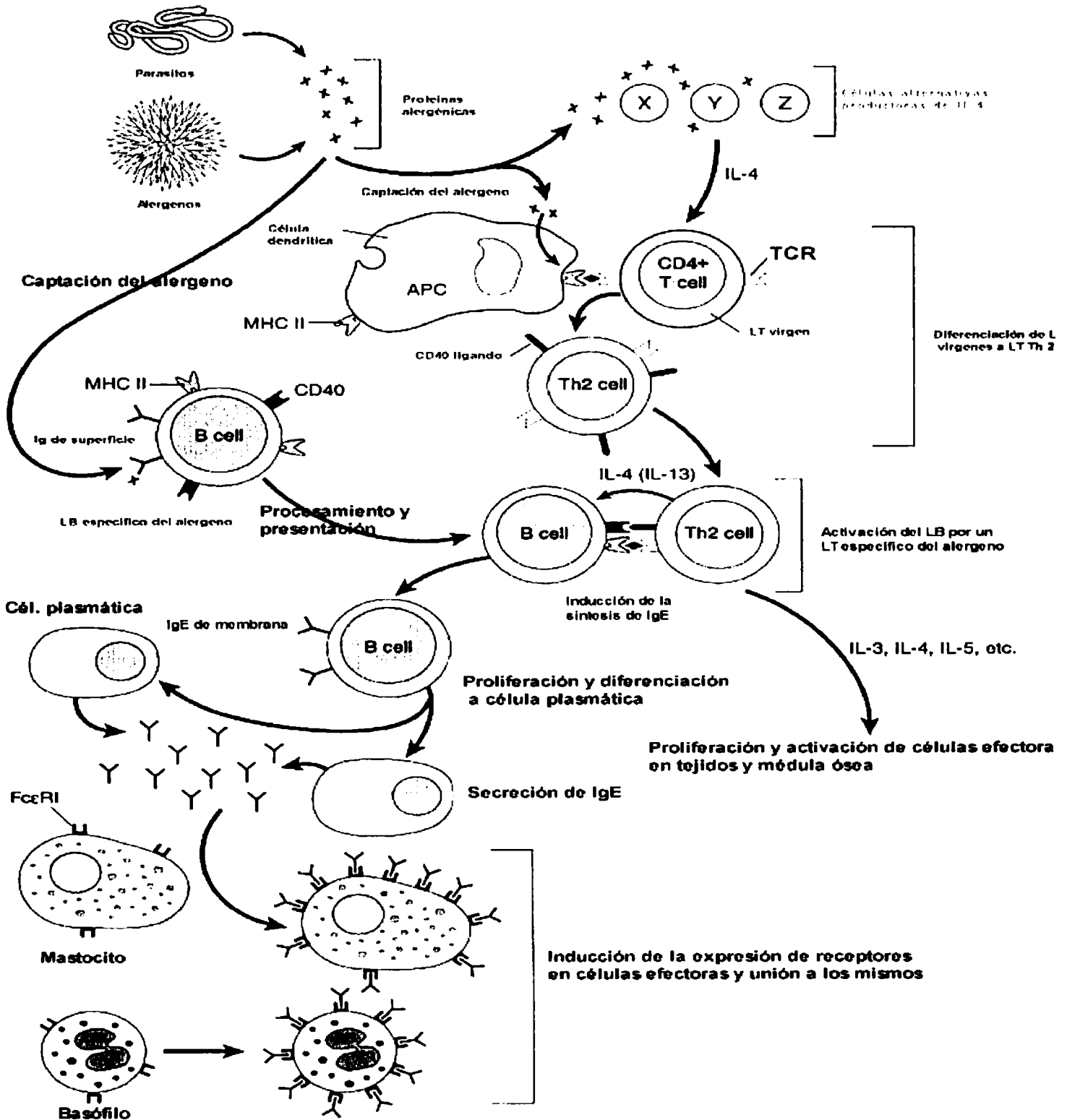
Además la IgE se une a los RFe de los mastocitos. La unión de al menos dos IgE por epitopes presentes en la superficie del parásito desencadenan su activación y degranulación. El foco inflamatorio originado finalmente expulsa al parásito del tracto gastrointestinal (Faulkner 1997). De esta manera el rol de la IgE es ser el nexo entre la célula efectora (eosinófilos y mastocitos) y la célula blanco (parásito). La presencia de receptores de porciones Fc de inmunoglobulinas en la membrana de la célula le confiere una especificidad de reconocimiento que le permite cumplir una función efectora específica. Por lo tanto según el tipo de célula y de RFc será el mecanismo efector interviniente: fagocitosis (por macrófagos y neutrófilos), o secreción de sustancias citotóxicas preformadas (células NK, eosinófilos, mastocitos, basófilos, plaquetas).

Se cree que los eosinófilos evolucionaron como mecanismo de defensa contra parásitos extracelulares (Gleich 1986). Dado que los parásitos desarrollaron mecanismos de evasión, el sistema inmune requirió contar con mecanismos protectores más efectivos que los que conforman la inmunidad natural. De esta forma es probable que los mastocitos hayan pasado a cumplir un rol más relevante, a través de la secreción de interleuquinas que dirigen la diferenciación y polarización de los LT y afectan la fisiología del tracto gastrointestinal. Así, la intervención de la IgE, y su unión por un lado a antígenos de la superficie del parásito, y por el otro a receptores presentes en eosinófilos y en mastocitos, inducirá la liberación de potentes mediadores inflamatorios e interleuquinas (IL 4, IL 5, IL 12, etc.) que finalmente deteriorarán la membrana del parásito y lo expulsarán. Como

contrapartida, los parásitos desarrollaron mecanismos de evasión muy variados y curiosos: alteración de sus proteínas antigénicas de cubierta, generación de enzimas proteolíticas que degradan la porción Fc de las inmunoglobulinas (fracción cristalizable de los anticuerpos, formada por las cadenas pesadas), se recubren de moléculas del huésped (MHC, Fab, moléculas de tejido conectivo, etc.), secretan moléculas antigénicas para desviar la respuesta inmune, inducen la síntesis de anticuerpos asimétricos, colonizan huéspedes jóvenes, secretan metabolitos funcionalmente análogos a superantígenos o con acción mitogénica sobre LB (acción similar al LPS) o con acción similar a la IL 4, etc. Esta es la razón por la cual en una parasitosis se observan fuertes respuestas humorales. En este último caso el objetivo es inducir una fuerte respuesta policlonal a IgE para bloquear el RFcε en células efectoras (evitan ADCC de eosinófilos y la degranulación de mastocitos ya que la IgE específica unida al parásito no tiene receptor a dónde unirse) e inducir un “feedback” negativo sobre los LB para la síntesis de IgE. De esta manera la respuesta policlonal lleva a que la IgE específica pierda relevancia frente al gran aumento de IgE no específica. Así la IgE específica protege al huésped, mientras que la IgE no específica protege al parásito.

Por lo tanto, estos mismos mecanismos que operan frente a antígenos parasitarios son los que se activan en individuos alérgicos cuando se exponen a los alérgenos. En las fases tempranas de un proceso alérgico los LT cumplen un rol inmunorregulatorio al inducir la síntesis de IgE y proliferación y activación de mastocitos. En las fases tardías también han sido observados LT CD4⁺ en los infiltrados de vías aéreas en individuos asmáticos y aquí la secreción de citoquinas Th 2 inducirá el reclutamiento de eosinófilos que causarán daños tisulares (Robinson-Hamid 1993, Bentley 1993).

Esquema 1. Principales interacciones celulares en la fase de sensibilización de respuestas inmunes mediadas por IgE



5.3. Eosinófilos

Son células granulocíticas que se originan y maduran en la médula ósea. Se distribuyen en sangre y tejidos, principalmente en mucosas, donde cumplen sus funciones efectoras. Se caracterizan por la presencia en su citoplasma de gránulos que contienen proteínas catiónicas con actividad pro-inflamatoria y citotóxica:

- proteína catiónica del eosinófilo: tiene actividad proteasa y ribonucleasa; daña la membrana de Helminetos, bacterias y células propias (Gleich 1986).
- proteína básica de membrana: no tiene actividad enzimática, pero daña la membrana de parásitos, células tumorales y normales (Gleich 1993)
- proteína con actividad hidrolasa
- proteína neurotóxica del eosinófilo: tiene actividad ribonucleasa, mucho mayor que la proteína catiónica del eosinófilo (Gleich 1993).
- peroxidasa del eosinófilo: forma radicales libres de oxígeno que dañan membranas celulares de parásitos, bacterias y células eucarióticas (Gleich 1993).
- proteína que forman los Cristales de Charcot-Leyden: tiene actividad fosfolipasa.

Por degradación del ácido araquidónico los eosinófilos sintetizan, por acción de la 5-lipooxigenasa, los leucotrienos LTC₄ y sus derivados LTD₄ y LTE₄, mientras que la 15-lipooxigenasa cataliza la síntesis de lipoxinas y sustancia P. Estos metabolitos tienen actividad vasoactiva, inducen la contracción de la musculatura lisa y la secreción de mucus.

Por otro lado estas células cumplen un rol inmunoregulatorio ya que sintetizan, almacenan y secretan distintos tipos de citoquinas:

- factores de crecimiento: GM-CSF, IL-3 y IL-5 (estimulan la maduración del progenitor de eosinófilos y basófilos en médula ósea).
- quimoquinas: RANTES, MIP, eotaxina.
- pro-inflamatorias: TGF- α y - β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8
- regulatorias: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10.

Además pueden actuar como células presentadoras de antígeno (Del Pozo 1992) ya que tienen capacidad fagocítica, la que puede ser mediada por receptores (López 1981): expresan moléculas coestimuladoras (Hartnell 1990, Ohkawara 1996), moléculas MHC clase II (Lucey 1989), y liberan citoquinas (Del Pozo 1990). Estas propiedades se encuentran potenciadas cuando la célula está activada, principalmente por GM-CSF, IL-3 e IL-5 (Weller 1993).

Además estas células en estado activo expresan receptores de membrana para citoquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-16, GM-CSF, IFN- α , etc), quimoquinas (eotaxina, factor activador de plaquetas, LTB₄, RANTES, etc.), moléculas de adhesión (E-selectina y P-selectina), inmunoglobulinas (IgE, IgG, IgA) y componentes del complemento (C1q, C3b, C4b, C5a). Muchos de estos ligandos se generan en el foco inflamatorio por lo cual estarían actuando como sustancias quimiotácticas y activadoras. La eotaxina secretada por los endotelios activados es la principal sustancia quimiotáctica para atraer eosinófilos al foco inflamatorio, por inducción de la expresión en las células endoteliales de VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1). La IL-5 actúa a nivel de médula ósea promoviendo maduración de eosinófilos, y en periferia induce la expresión de la quimokina CCKR-3 o receptor de eotaxina, quimiotaxis, activación celular y supervivencia. Pero existen otras quimoquinas que tienen un alto grado de homología con la eotaxina y por lo tanto contribuyen a la movilización de eosinófilos y formación del foco inflamatorio alérgico (RANTES, MIP, MPC, etc.) (Ponath 1996).

Los eosinófilos activados secretan sustancias que producen un daño tisular localizado, con alteración de las células endoteliales, de las cilias y producción de moco (Kay 1985). Este proceso originado por los eosinófilos es característico de las fases tardías, a diferencia del daño causado por los mastocitos en las fases tempranas de un proceso alérgico.

Por lo tanto estas células pueden cumplir diversas funciones efectoras: pro-inflamatorias (por la acción de sustancias vasoactivas), inmunoregulatorias (por la acción de citoquinas), antimicrobiana (ADCC, secreción de diferentes componentes) y presentadora de antígeno.

En un proceso alérgico o una infección por Helminths, donde la producción de GM-CSF, IL-3 e IL-5 estarán muy aumentadas (provenientes principalmente de linfocitos Th 2), se producirá una hipereosinofilia, observándose un incremento de precursores en médula ósea y en periferia.

En un proceso alérgico crónico o asma la principal célula efectora en ocasionar los daños histológico en las vías aéreas son los eosinófilos. En condiciones fisiológicas permanentemente se están produciendo procesos inflamatorios y regulatorios o reparadores que evitan el daño tisular. Cuando estos procesos se activan en forma sucesiva el tejido afectado se fibrosa, y esto es lo que ocurre en numerosas condiciones fisiológicas y patológicas (cicatrización, escleroderma, fibrosis hepática, pulmonar o cardíaca, etc.).

En estos casos mastocitos y eosinófilos son las células inflamatorias presentes en los tejidos a reparar. Estas células al activarse secretan mediadores que inducen la secreción de proteínas de matriz extracelular en los fibroblastos (Noguchi 1992, Jeffrey 1991). De esta manera intervienen en los procesos de daño y reparación tisular que en la cronicidad culminan con una fibrosis excesiva del tejido en el que se desencadenó el foco inflamatorio.

Los fibroblastos constituyen una población heterogénea de células del tejido conectivo encargadas de proveer la matriz extracelular para la proliferación de células epiteliales en la remodelación del tejido dañado. A su vez los fibroblastos tienen la capacidad de sintetizar y secretar citoquinas inmunorregulatorias.

Los mediadores que pueden modular las propiedades de los fibroblastos son:

- mastocitos: histamina, triptasa, quimasa, heparina.
- eosinófilos: proteína catiónica del eosinófilo, proteína básica mayor.
- citoquinas fibrogénicas: TGF- β , TNF- α , IL 1, IL 2, IL 4, IL 6.

5.4 Monocitos y macrófagos

Estas células se observan en los infiltrados celulares presentes en las reacciones de fase tardía y en las reacciones inflamatorias crónicas.

Al ser activadas a través de distintos receptores de membrana, mediante sus ligandos específicos (IgG, IgE, componentes de complemento, etc.), secretan mediadores pro-inflamatorios, básicamente citoquinas inmunorregulatorias (TNF- α), enzimas proteolíticas, radicales libres, y el factor liberador de histamina (Sampson 1989).

La presencia de RFc ϵ RI, RFc ϵ RII y RFc γ le permitiría a estas células concentrar alérgenos en su superficie, procesarlos y presentar sus péptidos a los LT. De esta manera estarían manteniendo la memoria T inmunológica localizada.

Por lo tanto cumplen roles inmunorregulatorio y citotóxico.

6- Etiología de los procesos alérgicos

A pesar de los avances suscitados en el conocimiento de los procesos moleculares y celulares que desencadenan las reacciones alérgicas, no se han identificado completamente los mecanismos fisiopatogénicos. Involucran un conjunto sumamente complejo de factores genéticos individuales y del medio ambiente.

La asociación observada entre un proceso infeccioso originado por parásitos o un proceso alérgico, con hiperseosinofilia y niveles elevados de IgE indican una proliferación y diferenciación de la subpoblación de LT Th 2.

Para el caso de las infecciones parasitarias la respuesta inmune polarizada hacia la activación de LT Th 2 es consecuencia de la interacción de células del sistema inmune (inmunidad innata y adaptativa) con el parásito o con moléculas secretadas por los mismos. En este caso se ha demostrado que estos componentes tienen actividad análoga a endotoxinas, superantígenos o citoquinas (Pearlman 1993, Gazzinelli 1997).

En cambio los alérgenos en general no tienen actividad biológica y son sustancias inocuas comunes del medio ambiente, por lo cual la exposición es casi permanente. Un individuo atópico se diferencia de uno no atópico en que en los primeros frente a la entrada de un alérgeno los linfocitos B (LB) activados tendrán una capacidad incrementada de sintetizar y secretar IgE, aunque se mantiene la capacidad de secretar los otros isotipos de inmunoglobulinas. Contrariamente, en un individuo normal o no atópico se sintetizarán isotipos de cadena pesadas en las proporciones normales. Por lo tanto en los individuos atópicos se observan niveles circulantes de IgE total más elevados que en los normales, persistiendo estos niveles aún fuera de los períodos de exposición (Okudaira 1981, Szakal 1992). El nivel sérico de IgE total variará según el individuo atópico, ya que los distintos grados de atopia dependerán de los genes involucrados. En general en estos individuos es posible identificar la IgE específica contra varios aeroalérgenos, aunque el alérgeno sensibilizante variará según la edad del individuo: en la infancia predominan alérgenos alimentarios y *Dermatophagoides*, mientras que en adultos son más comunes los aeroalérgenos.

Los procesos alérgicos muestran actualmente una epidemiología en expansión. En el término de 30-40 años no pueden haberse producido alteraciones genéticas tan marcadas como para explicar el notable incremento observado en su prevalencia (este valor se duplica cada 10 años). Por lo tanto se considera a la alergia una enfermedad multifactorial con un componente genético y otro ambiental.

En cuanto a la base genética aún no se ha identificado un gen asociado a una condición de susceptibilidad para la patología que determine una exagerada y sostenida producción de IgE. Es así que se ha implicado a muchos genes en el desarrollo de esta predisposición, habiéndose reconocido que está más ligada a una herencia poligénica, que a las formas clásicas de herencia mendeliana.

Se han realizado estudios poblacionales y genéticos, siendo la principal dificultad para la realización de los mismos definir el fenotipo de alergia o asma en el cual se van a analizar distintos parámetros clínicos. La sintomatología puede variar de un individuo a otro con la edad, exposición a alérgenos, respuesta a medicamentos, a alimentos, etc. En cambio la atopía se caracteriza por presentar niveles elevados de IgE total y presencia de IgE específica detectable por métodos *in vivo* o *in vitro*.

En los estudios genéticos se buscan marcadores genéticos en genes que se sospecha que están asociados a la fisiopatología de la enfermedad. La asociación familiar es el mayor indicio sobre la influencia de factores genéticos en la instauración de la patología (Edwards-Lubs 1971). Habría una contribución multigénica a diferentes niveles: fallas en la regulación de la activación del gen que codifica para IL 4 por mutaciones a nivel del promotor, mutaciones en el gen que codifica para la cadena α del receptor de IL 4, fallas en las poblaciones de mastocitos de mucosas, fallas a nivel de Fc ϵ R y co-receptores en mastocitos, hiperreactividad de vías aéreas, etc. Se han observado asociaciones entre variantes genéticas en determinados estados de atopía. Se han identificado defectos en ciertos genes que estarían involucrados en los procesos de atopía, tales como los genes que codifican para IL 3, IL 4, IL 5, IL 13 y GM-CSF en el cromosoma 5 (Postma 1995, Marsh 1995), genes que codifican para moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (Barnes 1998) y variantes polimórficas de TNF- α en el cromosoma 6 (Caraballo 1991, Hsieh 1991), gen que codifica para una variante alélica para Fc ϵ RI β (Shirwaka 1994) en el cromosoma 11, entre los cuales se encuentra el primer gen ligado descrito (Cookson 1989), genes mutantes para IFN- γ y NO sintetasa en el cromosoma 12, quimocinas, como RANTES y eotaxina, en el cromosoma 17, etc.

Factores ambientales serían los responsables de iniciar la patología en individuos susceptibles, y cambios en los mismos explicarían la mayor incidencia de las alergias en las últimas décadas. Hasta hace unos años se pensaba que la polución induciría cambios importantes en la fisiología del sistema inmune, ya que distintos agentes químicos presentes en la atmósfera (SO₂, NO₂, O₃) provenientes del humo del cigarrillo, combustión de los autos, de la industria, etc. poseen propiedades pro-inflamatorias e irritantes para la piel y mucosas. Se ha demostrado en animales de experimentación y en humanos que estos agentes actuarían incrementando la respuesta de las vías aéreas frente a aeroalérgenos, por alteración de la función de barrera que ejercen los epitelios (Devalia 1994, Díaz-Sánchez 1997), inducción de la síntesis de inmunoglobulinas (Díaz-Sánchez 1994, Gilmour 1995), en especial como adyuvante para la producción de IgE a nivel

pulmonar (Muranaka 1986, Díaz-Sánchez 1997), activación de macrófagos y secreción de citoquinas y quimoquinas, quimiotaxis de LT, monocitos, granulocitos. Por lo tanto este tipo de residuos del medio ambiente actuaría como inmunomoduladores que potencian el desarrollo de enfermedades alérgicas.

La dieta y los hábitos alimenticios también se han modificado marcadamente en los últimos años y esto ha influido a diferentes niveles sobre el sistema inmune: menor ingesta de vitamina C (posee propiedades anti-inflamatorias) y de carne de pescado (contiene ácidos grasos que inhiben la síntesis de leucotrienos pro-inflamatorios), mayor consumo de ácidos grasos poliinsaturados (inducen la síntesis de prostaglandina E₂, que favorece la diferenciación de LT a Th 2) (Purasiri 1994), Na⁺, K⁺, y Mg⁺ (afectan la contracción de la musculatura lisa de vías aéreas), mayor consumo de alimentos procesados, etc. Además, la reducción de los períodos de amamantamiento y cambios en la dieta de la madre también son factores que han afectado la incidencia de las alergias alimentarias. Entre los factores ambientales también se incluye el aumento de las cantidades de alérgenos domiciliarios (principalmente *Dermatophagoides*, epitelios de animales y hongos) causado por el mayor amoblamiento de las viviendas, la presencia de alfombras, menor ventilación de los ambientes, etc. La sensibilización a un alérgeno puede ocurrir a cualquier edad, pero sensibilizaciones tempranas, y en especial con *Dermatophagoides pteronyssinus*, se ha visto que está asociada con mayores riesgos de desarrollar procesos asmáticos (Price 1990). Sin embargo, el aumento observado en la prevalencia de la rinitis alérgica estacional, coincidente con la presencia estacional de ciertos pólenes, no se correlaciona con una mayor exposición a estos alérgenos, ya que la presencia de partículas de polen en el medio ambiente está disminuyendo progresivamente. Este descenso puede atribuirse a una disminución de las áreas verdes, que en la últimas décadas ha alcanzado hasta un 40 % (Emberlin 1997). Por lo tanto, una mayor exposición al alérgeno no explicaría en todos los casos un incremento en la sensibilización, y otros factores adicionales estarían influyendo en la instauración de los síntomas alérgicos, por ejemplo la presencia de irritantes atmosféricos que interactúan con los alérgenos y podrían exacerbar el desarrollo de atopía (Ishizaki 1987).

El principal factor ambiental que estaría influyendo sobre la instauración de los procesos alérgicos serían los microorganismos presentes en el medio ambiente que nos rodea. La ingesta de alimentos y bebidas más controlados en cuanto a la presencia de contaminantes, mejores planes de vacunación y tratamientos antimicrobianos con antibióticos más efectivos, ayudan a controlar y reducir infecciones intracelulares

bacterianas y virales. Desde el año 1989 se postula que las infecciones comunes adquiridas tempranamente en la infancia podrían ejercer un factor de protección para el desarrollo de las enfermedades alérgicas (Strachan 1989). Posteriormente se propuso la “hipótesis de la higiene” que sustenta que la declinación en los últimos años de las enfermedades infecciosas en la infancia es la causa más importante del incremento de la atopía en los países desarrollados (Strachan 1997).

Se postula que la higiene y la falta de una adecuada estimulación temprana bacteriana o viral juegan un rol en la ejecución de los programas inmunogenéticos, principalmente de activación y diferenciación de subpoblaciones de linfocitos Th 1 y Th 2. Al no activarse los mecanismos inmunológicos protectores contra patógenos intracelulares, los Th 0 no se diferencian a Th 1. Consecuentemente la falta de citoquinas antagonistas de los Th 2 (IFN- γ e IL 12) determinaría la diferenciación de los Th 0 a Th 2, con el consiguiente aumento de la actividad humoral y la síntesis de IgE frente a la exposición a los alérgenos (Shirakawa 1997). Pero no sólo microorganismos patógenos modularían la activación del sistema inmune, sino que la flora saprófita que coloniza distintos órganos también participa de la homeostasis local a través del tejido linfoide asociado a mucosas. En este caso el estado nutricional, la dieta, la ingesta de antibióticos orales, etc. influyen sobre la composición de la flora bacteriana. Se han descrito diferencias en cuanto a la composición de la flora intestinal al comparar individuos alérgicos y normales, e inclusive entre niños de diferentes culturas. Dado que la flora microbiana dirige la maduración del sistema inmune, cambios en su composición podrían jugar un rol importante en la instauración de procesos alérgicos (Bjorksten 1999).

Por lo tanto variaciones en los microorganismos patógenos y saprófitos del medio ambiente, junto a la reducción de las infecciones por microorganismos intracelulares (principalmente en chicos de corta edad, cuando se produce la sensibilización) han influido sobre la activación y memoria de los mecanismos específicos de la respuesta inmune.

Otro factor importante a tener en cuenta es el microambiente uterino en que se desarrolla el feto, en el cual predominan citoquinas (IL 4, IL 5, IL 10 e IL 13) secretadas por las células placentarias. Las citoquinas secretadas por célula Th 1 son las responsables de la activación de los mecanismos asociados al rechazo de trasplantes. Por lo tanto la presencia de citoquinas Th 2 aseguraría el mantenimiento de la gestación y la tolerancia de un alotrasplante. Además, modificarían la inmunidad a nivel del balance de células Th 1/Th 2 (Marzi 1996). Una expansión de LT Th 2 predispondría al momento de nacer a

procesos alérgicos. Clones T específicos de ciertos alérgenos aislados de sangre de cordón al momento del nacimiento muestran una capacidad disminuida de producción de IFN- γ al ser estimulados. Esto podría favorecer la producción de LT con fenotipo Th 2 y el incremento en la síntesis de IgE por parte de los LB (Warner 1994). Se ha demostrado que niveles incrementados de IgE en sangre de cordón son indicadores de procesos atópicos como dermatitis, urticaria, rinitis, asma, etc. (Croner 1990, Zeiger 1995). Por lo tanto el microambiente uterino predispone a los LT a diferenciarse a Th 2 con la consiguiente síntesis de IgE y desarrollo de procesos atópicos en individuos predispuestos. Sin embargo el ambiente neonatal tiende a balancear esta tendencia, mediante la interacción con distintos microorganismos del medio ambiente, de la flora intestinal, etc. El control de este tipo de infecciones desde el nacimiento hasta la primera infancia puede resultar un factor importante que contribuye al desarrollo de un estado de atopía (Stracham 1994).

El crecimiento fetal juega un rol importante en el desarrollo de las enfermedades alérgicas y en la atopía. Una desproporción en el crecimiento fetal (evaluada a través de la edad gestacional, peso al nacer, circunferencia cefálica) estaría asociado con un riesgo incrementado de desarrollar reacciones atópicas, principalmente dermatitis atópica, en la niñez (Olesen 1997). Se podría explicar por una alteración en el crecimiento del tronco y timo, y una reducción en el peso del timo, que podría alterar el balance de las poblaciones celulares (Godfrey 1994).

Por lo tanto, factores de predisposición inmunogenéticos que controlan la síntesis y expresión de citoquinas y receptores, interaccionan con el medio ambiente y esto ha generado con el transcurso del tiempo un incremento de la capacidad de síntesis de IgE frente a la entrada de un antígeno.

7- Alérgenos

7.1. Generalidades

En un individuo atópico cualquier sustancia natural o sintética reconocida como extraña por el organismo puede comportarse potencialmente como un alérgeno. Las sustancias naturales complejas, principalmente proteínas y glicoproteínas, son los alérgenos más frecuentes en generar reacciones de hipersensibilidad mediada por anticuerpos, básicamente IgE. Los compuestos orgánicos simples, sustancias inorgánicas y metales intervienen en mecanismos mediados por células (hipersensibilidad Tipo IV). Sin embargo, un mismo alérgeno puede ser responsable de más de un mecanismo de hipersensibilidad.

Se han descrito más de 500 sustancias que pueden comportarse como alérgenos y aparentemente no existirían propiedades físico-químicas o conformacionales que determinen *a priori* un comportamiento alérgico. Dependiendo de diversos factores (dosis de exposición, vía de ingreso, organización genética del individuo, etc.) cualquier proteína se podría comportar como un alérgeno. Se ha observado, en general, que los alérgenos más potentes son glucoproteínas hidrosolubles resistentes al calor, ácidos y proteasas. No se ha podido atribuir a los alérgenos un rol inmunomodulatorio específico, excepto para el caso específico de *Dermatophagoides pteronyssinus* en el que se ha caracterizado exhaustivamente las funciones proteolíticas de sus principal alérgeno Der p1. Este antígeno es una enzima con actividad proteásica de cisteína similar a la papaína. Es capaz de clivar al CD23 de la superficie de LB y modular la síntesis de IgE (Schultz 1995), alterar las uniones entre células epiteliales y por lo tanto la permeabilidad de las mucosas, (Robinson 1997), clivar la cadena α del receptor de IL 2 y disminuir la capacidad de las células de proliferar y secretar IFN- γ , etc.

7.2. Clasificación

Los alérgenos pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- **aeroalérgenos**: están presentes en el aire y provienen de sustancias particuladas. La mayoría de los atópicos presentan IgE específica contra alguno de ellos. Incluyen: pólenes de árboles, gramíneas y flores (Plátano, álamo, *Ambrosia*, *Lolium*, gladiolo, etc.), esporas de hongos (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, etc.), epidermis de animales (perro, gato, conejo, cerdo, caballo, etc.), excreciones de Acaros (*Dermatophagoides*), polvo ambiental, etc..

Según su localización pueden clasificarse en alérgenos domiciliarios (*Dermatophagoides*, hongos, polvo ambiental, epitelio de animales, etc.) o externos (pólenes, hongos, epidermis de animales, etc.). La forma de ingreso al organismo es principalmente por inhalación y básicamente generan cuadros de rinitis alérgica y asma.

-**alimentarios**: proteínas de la leche bovina, leche de oveja, huevo, maní, pescados, mariscos, trigo, soja, frutas (banana, kiwi, frutillas, naranja), especias, carne de pollo, semillas de algodón, etc. Pueden generar signos clínicos cutáneos, gastrointestinales y sistémicos, que aparecen antes de los 2 años de edad (Bock 1987). Ingresan al organismo por ingestión.

-venenos: aveja, avispa, hormiga colorada, etc. En algunos casos se conoce su actividad biológica: fosfolipasa, hialuronidasa, hemolizante, etc. Ingresan por inoculación a través de la piel y además de producir procesos atópicos localizados suelen originar cuadros sistémicos.

-drogas: son haptenos que se transforman en inmunogénicos al unirse a portadores proteicos del organismo. Ejemplos: penicilina, compuestos de amonio cuaternario, sulfamidas, etc. Pueden ingresar por ingestión, inhalación o inoculación y es común que originen angioedema y signos sistémicos.

-ocupacionales: la sensibilización se produce por exposición durante la actividad laboral. Ejemplo: látex, trigo, epitelios de animales, algodón, soja, etc. Pueden generar desde procesos leves (dermatitis), hasta graves y sistémicos (shock anafiláctico). La mayoría de los alérgenos en la actualidad son de este tipo.

7.3. Estandarización de extractos alérgicos

Se define a un extracto alérgico como la preparación de un alérgeno obtenida por extracción de los componentes activos, a partir de una fuente animal o vegetal, aplicando una determinada metodología.

La falta de estandarización de los extractos alérgicos empleados en el diagnóstico y la inmunoterapia constituye un problema muy importante. Se observa una marcada variación en la composición alérgica de los extractos al comparar distintas marcas, como así también una gran variedad disponible de extractos de un mismo alérgeno, con el agravante que cada fabricante emplea distintas unidades para caracterizarlos. Esta falta de consistencia en la fabricación de extractos alérgicos determinó que la Organización Mundial de la Salud (WHO) haya fijado recomendaciones para la estandarización de los mismos.

En el pasado han existido diferencias entre las pautas establecidas en países europeos (a través de la European Union) y en Estados Unidos (a través de la Food and Drug Administration–FDA) con respecto a la estandarización de un extracto alérgico (Dreborg 1993, AAAAI 1997). Actualmente, y a través de la WHO, se han unificado los criterios y se está desarrollando una estrategia común.

La estandarización de un extracto alergénico consiste en definir su potencia alergénica total, su actividad biológica y la composición individual de los alérgenos principales.

El principal inconveniente para lograrlo es la complejidad y heterogeneidad de los extractos empleados. En general estas preparaciones son extractos crudos obtenidos a partir de la fuente natural. Dependiendo de la fuente de la cual se extrae será la composición individual de alérgenos mayores y menores. Por otro lado, en la naturaleza numerosos componentes se presentan como isoformas naturales (Malik 1988, Beezhold 1994, Breitenbach 1996), y estas variantes alélicas pueden diferir en su plegamiento y por lo tanto en su alergenicidad y capacidad de unión a la IgE de células efectoras y a los TCR de los LT específicos (Kraft 1999). Además algunos extractos alergénicos son mezclas de alérgenos provenientes de especies relacionadas (pólenes, *Dermatophagoides*), lo cual incrementa aún más su heterogeneidad.

Los criterios de estandarización fijan pautas en cuanto a:

- Fuente proteica: deben emplearse materiales relevantes bajo ciertas normas de recolección, almacenamiento, extracción y purificación.
- Métodos de estandarización alergénica: se basan en la detección *in vivo* e *in vitro* de anticuerpos IgE específicos de los alérgenos. Para la determinación del poder alergénico *in vivo* se emplean pruebas cutáneas (prick test o intradermorreacción) y se evalúan diferentes parámetros indicadores de la reacción inflamatoria para definir unidades biológicas que caractericen a la preparación. Entre las técnicas *in vitro*, el RAST (radio alérgo sorbent test) de inhibición ha sido elegida como la prueba serológica de referencia. Se emplea como fuente de IgE un "pool" de sueros de pacientes alérgicos al alérgeno a evaluar y se mide la capacidad de inhibición de unión del alérgeno a la IgE. En todos los casos se requiere contar con pacientes alérgicos, establecer criterios de selección de los mismos y la existencia de estándares de referencia.
- Unidades: han existido diferentes formas para caracterizar un extracto alergénico, pero sólo aquellas que especifiquen su potencia total y la concentración individual de los principales alérgenos debe ser considerada al momento de elegir un extracto para el diagnóstico o inmunoterapia. El principal inconveniente es que se definen unidades arbitrarias lo cual dificulta su interpretación y la comparación de los resultados cuando se emplean diferentes extractos o se realizan en distintos países. Se han definido diversas unidades, aunque originariamente guardaban escasa relación con la actividad

biológica del extracto: Noon definía unidades de peso/volumen, Stull y Cooke empleaban unidades de nitrógeno proteico PNU, etc.

En general la definición de la unidad está vinculada a un parámetro *in vivo* obtenido por aplicación de pruebas cutáneas en pacientes:

- medida de la superficie del halo generado por prick test. Es un valor relativo ya que se lo compara con el halo producido por un control positivo realizado con una cantidad estandarizada de histamina. Las unidades se denominan HEP (Histamine Equivalent Prick) y son empleadas por países escandinavos.
- medida del tamaño del eritema generado por intradermorreacción. Se mide el diámetro de la reacción inflamatoria y se trata por lo tanto de un valor absoluto. Estas unidades se denominan BAU (Bioequivalent Allergy Unit) y son empleadas principalmente en USA. Se construye una curva estándar con cantidades conocidas del extracto a emplear. Este sistema de unidades ha reemplazado a las unidades AU (Allergy Unit), las cuales se definían en base al RAST de inhibición.

Además se emplean otros métodos *in vitro* para caracterizar la composición alérgica de los extractos: inmunodifusión radial, CRIE (contra radio inmunoelectroforesis), isoelectroenfoque, ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), immunoblotting, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), etc.

En la década del 80 se creó un Subcomité de Estandarización de Extractos Alérgicos de la IUIS (Unión Internacional de Sociedades de Inmunología) y de la WHO que fijó las pautas para la caracterización, reproducibilidad, seguridad, estabilidad, manufactura y etiquetado de los extractos alérgicos.

Algunos extractos reunieron las condiciones requeridas para un "Estándar Alérgico Internacional de Referencia" (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Short ragweed, Timothy grass, Birch pollen, epitelio de perro, y de gato) mientras que otros, por su complejidad, son "Preparaciones de Referencia" (Bermuda grass). A estos extractos se les asigna un valor de Unidades Biológicas Internacionales que es absoluto y no guarda relación con su actividad alérgica. En el futuro se espera que un mayor número de extractos puedan ser estandarizados, para lograr mayor eficiencia y seguridad en su empleo para diagnóstico y tratamiento, y para una mejor interpretación de los resultados reportados.

El etiquetado de los viales debe contener información sobre vida media o fecha de vencimiento, concentración de los alérgenos principales (en unidades biológicas o

absolutas), potencia alergénica en unidades biológicas (determinada por prueba cutánea en forma cuantitativa), un esquema recomendado para inmunoterapia y la forma de almacenamiento que asegure su estabilidad.

El rápido desarrollo de nuevas tecnologías para el análisis de DNA y proteínas ha significado un importante aporte para la caracterización de los extractos alergénicos. De esta manera la aplicación de técnicas moleculares de clonación y expresión de proteínas en diferentes sistemas eucarióticos y procarióticos permitió contar con alergen recombinantes. Se trata de una fuente homogénea de proteínas que posee una pureza definida y una actividad biológica determinada (pólenes, *Dermatophagoides*, epitelio de animales, insectos, alimentos, etc.). Se ha demostrado que los alergen recombinantes y sus respectivas formas naturales poseen propiedades comparables con respecto a sus estructura, función e interacción con elementos del sistema inmune. Esto ha posibilitado emplear a los alergen recombinantes en distinto tipo de estudios *in vivo* e *in vitro* para diagnóstico de la patología, inmunoterapia, mapeo de epitopes, etc.

La formulación de extractos proteicos en base al empleo de alergen recombinantes permitiría elaborar lotes de extractos con una cantidad definida de alergen y monitorear su estabilidad.

Por otro lado la obtención de anticuerpos monoclonales ha permitido contar con anticuerpos de especificidad conocida y en cantidades elevadas como para ser aplicados al estudio de los alergen, desarrollo de métodos de cuantificación, etc. (Dreborg 1992).

La producción de anticuerpos IgE humanos recombinantes y de fragmentos peptídicos alergénicos permitirá, empleando librerías combinatorias, identificar epitopes B que caractericen la estructura de los alergen (Steinberger 1996).

Por lo tanto la identificación de los alergen mayores y menores de cada sistema, la obtención de anticuerpos monoclonales específicos y los alergen recombinantes permitieron desarrollar métodos inmunológicos (ELISA, RAST, immunoblotting, CRIE, isoelectroenfoque, etc.) y no inmunológicos (determinación de la actividad enzimática para alergen en venenos de insectos, etc.) para caracterizar en forma más precisa la composición y poder alergénico de un extracto.

Los métodos inmunológicos son los de elección para estandarizar extractos alergénicos por la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que puede lograrse, aunque no puedan evaluar la potencia de unión *in vivo* a la IgE presente en la membrana de los órganos blanco.

8- Signos clínicos

Los procesos alérgicos son consecuencia de las sucesivas exposiciones al alergeno de individuos sensibilizados, y la activación inadecuada de mecanismos inmunológicos. Afecta principalmente las mucosas nasal, bronquial, gatrointestinal y la piel.

Se pueden producir 3 tipos de reacciones:

- **reacciones alérgicas agudas:** se producen a los segundos o minutos de la exposición al alergeno. Los signos clínicos observados (enrojecimiento e hinchazón de la piel, broncoconstricción, etc.) son consecuencia de la acción de mediadores preformados que actúan en forma rápida e intensa (basicamente histamina y triptasa). Son secretados principalmente por mastocitos residentes en el tejido donde se produce la exposición. Las células blanco pueden ser: células del endotelio vascular, células de glándulas secretorias, nervios sensitivos, células de músculo liso de vasos sanguíneos, mucosa respiratoria y gastrointestinal, etc. Estas reacciones son las que se observan cuando se realizan las pruebas cutáneas.
- **reacciones de fase tardía:** se produce a las horas del contacto con el alergeno, cuando en general los signos clínicos agudos han desaparecido. El proceso inflamatorio es inducido por mediadores de síntesis que actúan a tiempos mayores y con menor intensidad. Son secretados por mastocitos, inducen un tráfico celular con reclutamiento de glóbulos blancos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos, LT) y edema. Este proceso altera la histología y el funcionalismo del órgano como consecuencia de los productos tóxicos liberados por las células del infiltrado linfoideo. Los signos clínicos con que se pueden presentar son: broncoconstricción, enrojecimiento y edematización de la piel, rinoconjutivitis, tos, dermatitis, etc. Aquí los mediadores que actúan sobre las células blanco, provenientes de células presentes en el tejido y que han migrado por vía sanguínea, son: histamina, esterasa, leucotrienos (LTC₄) y citoquinas (TNF- α , IL 8, etc.).
- **inflamación alérgica crónica:** afecta aquellos órganos que han sido repetidamente expuestos al alergeno sensibilizante durante largos períodos. Se trata en general de aeroalergenos estacionales o domiciliarios. Los signos clínicos van a depender del órgano afectado, en general son causados por un infiltrado celular de eosinófilos y LT (en menor medida macrófagos). Se inducen cambios histológicos persistentes y se altera el funcionalismo del órgano. El caso más importante es el asma alérgica que afecta a la mucosa respiratoria.

En general la gravedad y localización de los signos clínicos depende de la vía de entrada del alérgeno, dosis del mismo y de la cantidad de IgE unida a los receptores de membrana. La atopía es la principal causa de asma, rinitis y eczema entre los 5 y 25 años de edad. Generalmente se observa que los individuos atópicos presentan con elevada frecuencia signos de alergia alimentaria antes de los 2 años de edad. Luego se induce un período de tolerancia a los alérgenos alimentarios y se sensibilizan contra alérgenos inhalantes. Finalmente estos procesos culminan en un cuadro asmático cuando el diagnóstico o tratamiento no es el correcto.

La sintomatología con que puede presentarse la atopía es variable:

a) Anafilaxia: es una reacción sistémica aguda que puede variar desde formas suaves (urticaria generalizada) hasta severas, afectando las mucosas de labios, laringe y lengua (angioedema), del tracto gastrointestinal (náuseas y vómitos), del tracto pulmonar (broncoconstricción) y sistema cardiovascular (hipotensión, colapso circulatorio, shock anafiláctico).

En general los alérgenos que la inducen son drogas (penicilina, aspirina, etc.), venenos de insectos (abeja, avispa, mosquito, etc.), productos de látex, inmunoterapia, etc. Las reacciones anafilácticas también pueden ser provocadas por complejos inmunes, anafilotoxinas derivadas de la activación del sistema del complemento o pueden no estar mediadas por IgE (reacciones anafilatoideas) como es el caso de las reacciones causadas por medios de contraste o por el ejercicio físico.

b) Rinitis alérgica: es la manifestación que se observa con mayor frecuencia (5-22 % de la población general de USA). Puede presentarse en determinadas épocas del año o durante todo el año según el alérgeno sensibilizante (pólenes, hongos, *Dermatophagoides*, etc.). La vía de entrada de los alérgenos es por inhalación y la sintomatología con que se presenta consiste en rinorrea, congestión nasal, estornudos, etc.

c) Dermatitis atópica: enfermedad inflamatoria de la piel que en general se presenta en la infancia. Dependiendo del nivel de IgE total circulante será la gravedad y extensión de las lesiones. Los alérgenos desencadenantes más frecuentes son los alimentarios en la infancia y los aeroalérgenos en adultos.

d) Asma: es una inflamación crónica de vías aéreas pulmonares que se produce por sucesivas activaciones de células pro-inflamatorias locales, principalmente mastocitos y eosinófilos de la submucosa, que llevan a una reducción en la luz de los bronquios. Afecta al 5-10 % de la población, principalmente chicos, aunque en los últimos 20 años se ha duplicado su prevalencia en países desarrollados. La gravedad de los episodios depende de la hiperreactividad de cada individuo, es decir del umbral de estímulo que los basófilos y mastocitos requieren para activarse y secretar mediadores. Las células responsables del engrosamiento de la pared de los bronquios (mastocitos y basófilos, eosinófilos y LT) se encuentran en el infiltrado de la mucosa.

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, Para influenza, etc), ejercicio físico, drogas anti-inflamatorias no esteroideas, etc.

En los casos de infecciones virales, las células blanco son células epiteliales de vías respiratorias y mastocitos de pulmón. El virus induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α de macrófagos) lo que conduce a la constricción bronquial y aumento de secreción de moco.

e) Síntomas gastrointestinales: el alérgeno ingresa por ingesta generando la activación de mastocitos sensibilizados de la mucosa gastrointestinal. Consecuentemente se producen vómitos y diarrea por pérdida de líquidos y contracción de la musculatura lisa. La diseminación del alérgeno y el tráfico de células inmunes entre los distintos tejidos linfoides asociados a mucosas pueden originar cuadros no relacionados con el tracto gastrointestinal como urticaria, dermatitis, broncoespasmo, etc.

9- Diagnóstico

Dado que la sintomatología con se presenta un proceso alérgico puede ser originada también por un proceso no alérgico y a su vez un proceso alérgico puede tener distinta etiología, es imprescindible realizar un diagnóstico diferencial y preciso. Por ejemplo: la liberación de histamina por mastocitos activados con drogas opiáceas, procesos asmáticos causados por la aspirina o una infección viral, reacciones anafilactoideas originadas por medios de contraste yodados son procesos IgE-

independientes, pero la sintomatología con que suelen presentarse es similar a la de un proceso atópico.

La historia clínica debe incluir datos del paciente, historia familiar, una descripción detallada de los síntomas, momento y localización ambiental de aparición y desaparición de los síntomas, tratamientos previos, exposiciones laborales, un examen clínico exhaustivo, etc. En muchos casos no es posible identificar los factores ambientales desencadenantes, o el alérgeno sensibilizante, por lo que se debe recurrir a pruebas *in vivo* e *in vitro*. Éstas permiten evaluar la función de determinados órganos (obstrucción de vías respiratorias, resistencia de vía respiratoria nasal, timpanometría, etc.), orientar sobre la identidad del alérgeno, identificar el mecanismo inmunológico interviniente y su magnitud.

En primera instancia se debe confirmar que un mecanismo inmunológico es el responsable del cuadro observado. Luego se debe identificar el alérgeno responsable del mismo para iniciar el tratamiento.

Mediante las pruebas cutáneas se puede determinar si participan o no mecanismos inmunológicos y además identificar al alérgeno sensibilizante, ya que la piel es un órgano en el que se encuentran los elementos necesarios para desencadenar un proceso inflamatorio alérgico. Presenta la ventaja que, por tratarse de una reacción localizada, permite realizar estas pruebas en forma controlada. Además se obtiene el resultado en minutos, en general no son costosas (es función del extracto alérgico empleado) y se pueden ensayar diferentes alérgenos en forma simultánea. Pero a diferencia de las pruebas funcionales de provocación *in vivo*, no evalúan la respuesta del órgano afectado; además requieren discontinuar tratamientos iniciados, la piel no debe estar alterada, no se pueden realizar en chicos de corta edad, los extractos empleados deben ser de composición alérgica conocida para evitar posibles reacciones sistémicas, etc. Por lo tanto para la realización de estas pruebas se deben reunir ciertas condiciones: principalmente conocer la composición alérgica del extracto y ser realizadas bajo condiciones controladas de seguridad para el paciente.

9.1. Pruebas *in vivo*

9.1.1. Pruebas cutáneas

Son empleadas para el diagnóstico de los distintos tipos de hipersensibilidad:

- **prueba del parche:** consiste en la aplicación de un papel de filtro embebido con una cantidad conocida del alérgeno sobre el antebrazo. A las 48-72 horas se observa la

presencia de eritema, pápulas o vesículas que indican la presencia de un proceso inflamatorio mediado por un mecanismo de hipersensibilidad tipo IV o celular. Estas pruebas son muy empleadas para diagnosticar una dermatitis de contacto causada por haptenos.

- **prick test:** para la realización de esta prueba se introduce una pequeña cantidad del alérgeno (ng- μ g de proteínas) con una lanceta en el antebrazo y se evalúa la aparición de un eritema y una pápula (halo y roncha) en 15-20 minutos. Estos signos clínicos indican la activación de los mastocitos presentes en el sitio de inoculación por la unión del alérgeno a la IgE. En general estas pruebas no provocan reacciones tardías, pero si pueden originar procesos de anafilaxia. Además, la aplicación de estas pruebas permite determinar la dosis del alérgeno a emplear en los casos que se realice inmunoterapia o pruebas de provocación.

- **prueba intradérmica:** mediante el empleo de una jeringa de tuberculina se inocula intradérmicamente en el brazo una determinada cantidad (en general 0.01 ml) de una solución que contiene al alérgeno. Luego de 15-20 minutos se observa la presencia de un foco inflamatorio. Resultados tardíos (6, 12 o más horas) son inciertos para el diagnóstico. Este tipo de pruebas pueden originar procesos sistémicos, ya que la sensibilidad y la cantidad de alérgeno inoculada son mayores que para el prick test.

9.1.2. Pruebas de provocación

Se utilizan para evaluar la respuesta del tejido blanco a un desafío con el alérgeno, bajo condiciones controladas.

En la prueba del parche se contacta la piel con el alérgeno y se evalúa la aparición de urticaria o dermatitis a las 48-72 horas. Mediante la provocación bronquial se evalúan los cambios en el flujo o resistencia del aire; en la provocación nasal se mide también la resistencia al paso del aire y la presencia de congestión o rinorrea. En el reto oral con alimentos o medicamentos, luego de suspender la exposición a los mismos para que desaparezcan los signos clínicos, se realiza un desafío bajo condiciones muy controladas (en general doble ciego). Se observa la aparición de signos de atopía en la piel, sistema gastrointestinal y respiratorio.

Una prueba positiva no implica necesariamente la participación del sistema inmune.

9.2. Pruebas *in vitro*

La aplicación de ensayos inmunológicos, tanto para el estudio de los alérgenos como de distintos aspectos de la respuesta inmune humoral del individuo, son los métodos de elección ya que se pueden lograr ensayos con una alta especificidad y sensibilidad. Pueden ser aplicados sobre un número elevado de muestras que, además, pueden ser de muy variado origen (secreciones, suero, plasma, saliva, etc.), característica muy importante en estudios poblacionales. La gran ventaja de las pruebas diagnósticas *in vitro*, respecto a las pruebas *in vivo*, es que se evita poner en riesgo al paciente. Por otra parte, pueden ser realizadas en presencia de signos clínicos de atopía en el paciente, los cuales imposibilitan la realización de las pruebas cutáneas. La desventaja de estas pruebas es que se está evaluando un componente aislado de la reacción alérgica como es la IgE total o específica en circulación, y que no se está evaluando al órgano afectado. Esto puede complicar la interpretación de los resultados al compararlos con la historia clínica del paciente y los resultados de las pruebas *in vivo*.

El desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos requiere disponer de soluciones que contengan a los alérgenos, anticuerpos específicos (monoclonales o policlonales) y un método para medir la magnitud de la interacción antígeno-anticuerpo.

Los métodos desarrollados para la determinación de IgE deben reunir ciertas características:

- bajo índice de detección: la concentración de IgE específica en circulación es del orden de los picogramos/mililitro.
- especificidad: se debe identificar en forma precisa al alérgeno desencadenante de los signos clínicos de atopía.
- reproducibilidad: para facilitar la interpretación y comparación de los resultados obtenidos.

Mediante el empleo de un fase sólida (plásticos o papeles especialmente desarrollados para unir proteínas), anticuerpos de elevada afinidad y un método adecuado para cuantificar la unión antígeno-anticuerpo es posible detectar y cuantificar la presencia de IgE específica en una muestra determinada. Cuando estos ensayos emplean anticuerpos conjugados a isótopos radiactivos (I^{125}) se denominan RAST, mientras que si emplean enzimas (peroxidasa y fosfatasa alcalina son las más empleadas), se denominan ELISA o EAST (enzyme allerge sorbent test) dependiendo de la fase sólida empleada. Además se han desarrollado nuevas técnicas que amplifican la señal final de color. Esto determina una mayor sensibilidad del ensayo (sistema avidina-biotina, quimioluminiscencia, etc.)

El diagnóstico de un proceso atópico debe incluir las determinaciones de IgE total y específica.

- **IgE total:** se realiza por ELISA o RIA (radio immuno assay) sensibilizando la fase sólida con un anticuerpo anti-IgE humana policlonal. Se construye una curva estándar con una solución de referencia de IgE. El resultado del suero a analizar se obtiene por interpolación a partir de la curva de referencia. El resultado final se informa en U/ml. Se deben determinar los rangos de valores normales para las distintas edades, principalmente antes de los 15 años.

- **IgE específica:** la cuantificación se realiza por ELISA, RAST o EAST. El principal inconveniente que presentan es la falta de un estándar de IgE específica de concentración conocida para cada alérgeno. Se recurre a una semicuantificación construyendo una curva de referencia con el alérgeno más común en la región y un "pool" de sueros de pacientes atópicos a dicho alérgeno. Se grafica la señal del ensayo (cpm o densidad óptica) vs dilución del "pool" y se le asignan valores arbitrarios en clases de 0 á 4 o mayor. Se realiza la determinación para el alérgeno a analizar y con el resultado obtenido se interpola en la curva de referencia la clase de IgE específica. En nuestro caso se empleó una curva de referencia para *Dermatophagoides* expresando el resultado final en clases que van desde 0, si no se detecta la presencia de IgE específica, y hasta 4 o mayor según la cantidad de IgE específica determinada en el suero analizado.

La presencia de IgE específica también se puede detectar mediante la técnica de "immunoblotting" que consiste en separar a los componentes proteicos de la mezcla alérgica por un método electroforético (isoelectroenfoque, geles nativos o desnaturizantes de poliacrilamida) y transferirlos por distintos medios (capilaridad, electrotransferencia, vacío, etc.) a una fase sólida (membrana de nitrocelulosa, de nylon, etc.). Posteriormente se incuba con el suero a estudiar y se revela la presencia de IgE empleando un anticuerpo anti-IgE conjugado a una enzima. El agregado de un sustrato que precipite en el sitio donde se encuentra la enzima permite observar la aparición de bandas coloreadas. Esta técnica permite detectar la presencia y especificidad individual de la IgE sérica, aunque no puede ser aplicada para la cuantificación de la IgE específica.

Una variante más simplificada del "immunoblotting" es el "dot-blot" que permite detectar la presencia, la especificidad (cuando se realiza con alérgenos purificados) y semicuantificar la IgE específica. Presenta la ventaja que al enfrentar el suero a estudiar con el alérgeno sin desnaturizar se detecta la unión de anticuerpos a epitopes nativos.

10- Terapia

En general los signos clínicos en una alergia desaparecen al interrumpir el contacto con el alergeno desencadenante. Por lo tanto, el tratamiento más efectivo consiste en evitar la exposición al mismo. Pero con ciertos aeroalergenos es prácticamente imposible lograrlo (pólenes, epitelios de animales, *Dermatophagoides*, proteínas de látex, etc.). Además requiere un diagnóstico correcto y preciso de la alergia, es decir determinar qué tipo de hipersensibilidad es la que origina el proceso y cuál es el alergeno desencadenante de los síntomas. Por otro lado se debe conocer cuáles son las fuentes posibles que contienen al alergeno, y en el caso que sea necesario, cuáles son los sustitutos hipoalergénicos posibles.

En el caso que el diagnóstico y tratamiento no sean correctos, y las exposiciones al alergeno continúen, el daño puede ser irreversible y la enfermedad, un proceso crónico. Por lo tanto el control ambiental, principalmente en la infancia, constituye el tratamiento más efectivo con que se cuenta.

Además el hecho que numerosos factores incidan en su instauración, que no se conozca la etiología de los procesos alérgicos y que se desconozca la forma exacta de reorientar la respuesta inmune, dificulta la implementación de un tratamiento que incida sobre los mecanismos del sistema inmune.

Actualmente los tratamientos más empleados consisten en la aplicación de:

- adrenalina: bloquea la liberación de mediadores pre-formados de los mastocitos (interrumpe las señales de transducción) y es antagonista de mediadores que inducen la contracción de células de los músculos lisos (histamina y LTC₄).
- anti-histamínicos: bloquean la unión de la histamina a sus receptores específicos sobre células endoteliales y de músculo liso.
- glucocorticoides: inhiben el tráfico celular desde vasos sanguíneos al foco inflamatorio tisular, inhiben la síntesis y liberación de leucotrienos en eosinófilos, mastocitos y basófilos, inhiben la síntesis de citoquinas en mastocitos (Schleimer 1993).

Estos tratamientos no corrigen la alteración del sistema inmune. La **inmunoterapia convencional** o desensibilización o hiposensibilización constituye el único tratamiento que altera los mecanismos inmunológicos. Es una terapia empírica, cuyo modo de acción se desconoce, que se ha aplicado desde hace varias décadas y resulta efectiva para ciertos alergenos como venenos, *Dermatophagoides*, etc. Consiste en

introducir repetidamente y por distintas vías (sublingual, intradérmica, endovenosa) al alérgeno en dosis muy bajas y aumentarlas gradualmente con el tiempo 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. Se ha observado que disminuye la reactividad evaluada por test de provocación (cutáneos, nasales y bronquiales), disminuye la IgE circulante luego de un incremento inicial, y aumenta la IgG₄ sérica y la IgA nasal, disminuye la quimiotaxis de eosinófilos hacia los focos inflamatorios, disminuye la liberación de histamina por mastocitos y basófilos estimulados con alérgenos, etc. Aparentemente lo que induce es una re-orientación en la activación de los LT induciendo una secreción de citoquinas Th 1. Se desconoce si se activan nuevos precursores Th 0, si LT Th 2 específicos son re-orientados a secretar citoquinas Th 1, si el IFN γ proviene de LT CD8⁺ o de LT $\gamma\delta$, si los LT Th 2 se anergizan, etc.

Las terapias potenciales o alternativas que afectarían al sistema inmune, consisten en:

- empleo de alérgenos recombinantes y alérgenos recombinantes mutantes: con el epítipo B alterado de manera que no se una a la IgE de los mastocitos (Kudo 1978, Kraft 1999), o si se une que no induzca su degranulación.
- empleo de péptidos inmunogénicos: que contengan epítipos T de manera que interactúen con el TCR de los LT. Al no existir la segunda señal se induce un estado de anergia en el linfocito T específico. Se ha probado con *Ambrosia* (Amb a1) y epitelio de gato (Fel d1) (Higgins 1992, Jenkins 1992).
- empleo de isoformas naturales de ciertos alelos con baja capacidad de unión a la IgE y una fuerte actividad estimuladora sobre LT.
- inmunización con DNA (codificante del alérgeno): se probó que es efectivo en animales donde genera una respuesta Th 1 (Raz 1996).
- desviar la activación de los LT TH 0 hacia TH 1 administrando el antígeno por vías alternativas, o administrando el receptor de IL 4 en forma soluble para secuestrar la IL 4 circulante (Garrone 1991, Khoury 1992).
- empleo de péptidos de IgE para bloquear los RFce.
- bloquear la formación del foco inflamatorio: con anticuerpos anti-citoquinas pro-inflamatorias (α -TNF, α -IL 5) o con citoquinas antagonistas, con antagonistas de receptores de interleucinas.

- administración de anticuerpos anti IgE monoclonales humanizados: al unirse a la IgE circulante bloquean su unión a los RFcε (Mac Glasham 1997, Rabe 1998)
- empleo de inmunosupresores que inhiban la liberación de citoquinas de LT, mastocitos, eosinófilos, basófilos (ciclosporina A, FK 506).
- empleo de antagonistas de interleuquinas: por ejemplo antagonistas de la IL-5: cadena α del receptor de IL-5 soluble, IL-5 mutante (se une al receptor, pero no desencadena la señal de transducción), anticuerpos monoclonales humanizados anti-IL-5, etc. (Mauser 1995).

Por lo tanto la terapia puede ser inmunológica o farmacológica. Esta última resulta efectiva en el manejo del paciente, aunque no logre corregir el problema de base.

Otro de los objetivos terapéuticos es realizar una hiposensibilización profiláctica en aquellos individuos pertenecientes a grupos de alto riesgo de desarrollar procesos de atopía. Por ejemplo en el caso de un hijo en el que ambos padres sean asmáticos, donde la probabilidad de ser asmático es del 70-80 %. En estos se especula con que es más fácil tolerizar LT vírgenes y dirigir la síntesis de IL hacia patrones protectores en individuos que aún no han desarrollado signos de atopía. Como este tratamiento debe ser instaurado en chicos de corta edad es muy difícil establecer en qué casos aplicarlo. Otros inconvenientes radican en que en esta etapa de la vida la susceptibilidad a la sensibilización se encuentra incrementada y además no debe superponerse con planes de vacunación donde se requiera una fuerte respuesta TH 2 para que el mecanismo inmunológico protector sea efectivo.

Materiales y métodos



| | |
|--|----|
| 1. Extractos antigénicos | 52 |
| 1.1. Leche bovina | 52 |
| 1.2. Látex natural | 54 |
| 2. Obtención de antisueros en ratones | 55 |
| 3. Obtención de antisueros en conejos | 56 |
| 4. Electroforesis SDS-PAGE e immunoblotting | 56 |
| 5. Determinación de la concentración de proteínas | 58 |
| 6. ELISA competitivo secuencial para cuantificación de proteínas | 58 |
| 7. Determinación del título de antisueros | 59 |
| 8. Sueros humanos | 60 |
| 8.1. Alergia a leche bovina | 60 |
| 8.2. Alergia al látex | 60 |
| 9. Determinación de IgE total | 61 |
| 10. Determinación de IgE específica sérica | 62 |
| 10.1. Dot-blot | 62 |
| 10.2. ELISA indirecto | 62 |
| 10.3. EAST | 63 |
| 10.4. ELISA de captura | 64 |
| 10.5. Immunoblotting | 64 |
| 11. Determinación de IgG específica por ELISA | 64 |
| 12. Producción de anticuerpos monoclonales | 65 |
| 13. Producción de líquido ascítico | 66 |
| 17. Aislamiento y purificación de anticuerpos monoclonales | 66 |
| 14. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales | 66 |

| | |
|--|----|
| 15. Tratamiento de miscelas de caseína con agentes caotrópicos | 67 |
| 16. Coloración y oxidación de hidratos de carbono | 67 |
| 17. Prueba cutánea | 68 |

MATERIALES Y METODOS

1. Extractos antigénicos

1.1. Leche bovina

Como fuentes proteicas se emplearon productos comerciales: leche bovina descremada (Molico), caseína total (Hammersham), β -Lg, α -La, β -caseína, α -caseína y κ -caseína (SIGMA), hidrolizados proteicos, aislados proteicos de porotos de soja y de leche bovina (proteínas del suero y caseínas). Los extractos proteicos fueron preparados disolviendo la muestra en buffer fosfatos pH 7.4 (10 mg/ml), eliminándose los restos de muestra sin disolver por centrifugación (3000 rpm-20 minutos). En los casos que el contenido de lípidos fuera elevado se extrajeron con cloroformo y posteriormente las muestras fueron dializadas contra agua destilada o distintos buffers según el uso que se le fuera a dar. Cuando el extracto no fue usado en el momento, se lo conservó a -20°C .

Los distintos aislados proteicos fueron preparados de la siguiente forma:

1.1.1. Precipitación isoelectrica de las caseínas

Se incubó una muestra de leche con HCl 0.1N a 25°C pH 4.6, aislándose las proteínas del suero por centrifugación (3000 g - 20 min.). El precipitado de caseínas fue lavado con HCl y redisolto por neutralización con NaOH 1N. Ambas fracciones fueron dializadas (membrana de 6 kDa de cutoff) contra TBS y conservadas a -20°C hasta su empleo.

1.1.2. Coagulación de caseínas

A una muestra de leche descremada (15 mg/ml de proteínas totales) se agregó 20 μg renina de cuajo (quimosina) y se incubó durante 12 horas a 37°C . Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos y se obtuvo un precipitado correspondiente a las caseínas y un sobrenadante correspondiente a las proteínas del suero. El precipitado fue lavado, resuspendido y dializado como se describió previamente. Se conservó a -20°C hasta su empleo.

1.1.3. Aislados de proteínas de soja

Se prepararon aislados proteicos a partir de 4 variedades de porotos de soja (INTA): Asgrow 4004, Asgrow 4656, Don Mario 43 y Caminera 32.

Se trataron porotos molidos (enteros y sin cáscara) con NaHCO_3 en agua destilada a $90\text{ }^\circ\text{C}$ y se homogeneizó (UT-20000) 3 veces durante 1 minuto. Se centrifugó a 8000 rpm-20 min. a temperatura ambiente (TA) y se descartó el “pellet”. El sobrenadante fue tratado con cloroformo para extraer lípidos. Luego de centrifugado (13000 rpm –10 min.- temp.) amb.) se dializó contra TBS durante 12 horas a TA

A partir de estos extractos proteicos se prepararon aislados por tratamiento con TCA 15 %, buffer HAc/NaAc 1M pH 4. Los precipitados fueron lavados, resuspendidos (NaOH 0.1 M) y dializados contra agua destilada. Se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo.

1.1.4. Obtención de miscelas y monómeros de caseína

1.1.4.1. Electroelución: a partir de geles preparativos SDS-PAGE (Hoeffer) de muestras de leche bovina descremada se identificaron las bandas correspondientes a las proteínas a aislar mediante tinción con Coomassie brilliant blue y tinción con plata. Se seccionó la porción de gel conteniendo la fracción de interés.

Para la electroelución se empleó el equipo Electro Eluter 422 (Bio Rad) durante 5 horas a 170 volts y 10 mA por tubo. La muestra obtenida se dializó contra agua destilada y luego se procedió a su liofilización. Se conservó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo.

Mediante esta técnica se aislaron monómeros de caseína (α -caseína y β -caseína).

1.1.4.2. Cromatografía de exclusión molecular: se realizó en una columna Pharmacia 26/100, empleándose como relleno Sephacryl S-300 y como eluyente buffer fosfatos 0.01M pH 7.4.

Las muestras empleadas fueron leche descremada de origen comercial y caseína de origen comercial y aislada. Se sembró un volumen de 13 ml a una concentración de 25 mg/ml. El flujo fue de 24 ml/hora y el volumen de las fracciones recolectadas fue de 1,2 ml por tubo. El transcurso de la corrida fue seguido mediante el empleo de un detector de absorbancia a 280 nm y la corrida duró aproximadamente 8 horas. El análisis de las fracciones se realizó por SDS-PAGE y cuantificación de proteínas por el método de Lowry (1951).

Mediante esta técnica se aislaron principalmente miscelas de caseína de alto PM.

1.1.4.3. FPLC de intercambio catiónico (Fast Protein Liquid Chromatography): se realizó en una columna de Pharmacia Mono S HR 5/5 de intercambio catiónico variando la fuerza iónica mediante un gradiente de NaCl. Las muestras a analizar fueron previamente tratadas con 2-mercaptoetanol 0.5 %. Como eluyentes fueron empleados:

-A: buffer acetato pH:5 0.02 M, urea 6 M.

-B: buffer acetato pH:5 0.02 M, urea 6 M, NaCl 1M.

El volumen de cada muestra sembrada fue de 1 ml (concentración proteica de 8 mg/ml) y el flujo fue de 1 ml/min. La presión de corrida fue de 2 MPa. Se realizaron distintos perfiles de elución (variando el gradiente de fuerza iónica) para hallar las condiciones óptimas de separación de los componentes de interés (monómeros de caseína).

1.1.5. Extractos proteicos obtenidos a partir de hidrolizados de leche bovina:

Se prepararon extractos proteicos por incubación de muestras liofilizadas con buffer fosfatos pH 7.4. Los lípidos fueron eliminados por extracción con cloroformo y la muestra se dializó contra agua destilada. Los hidrolizados empleados fueron:

- hidrolizado extensivo de caseína: Pregestemil (Mead Johnson)
- hidrolizado parcial de caseína: KAS 1000 (Kasdorf)
- hidrolizado parcial de proteínas de suero: NAN HA (Nestlé), BEBA HA 1 (con seroalbúmina bovina hidrolizada agregada) (Nestlé).
- hidrolizado de proteínas de suero y caseínas: Aptamil HA1 (Milupa), Humana HA 1
- hidrolizado parcial de proteínas de soja: Nursoy (Wyeth)
- formulación a base de aminoácidos: Neocate (SHS International)

1.2. Látex natural

Se emplearon diferentes fuentes para la preparación de extractos proteicos:

1.2.1.- Látex natural amoniacado

Se emplearon 3 tipos diferentes de látex amoniacado: de alto contenido de amoníaco (0.7 %), de bajo contenido de amoníaco (0.2 %), ambas con un 61.50 % de sólidos totales (Ennar-Bakrie Rubber L.P., USA), y una muestra que es la materia prima empleada por la

industria (KOPELCO SA) en nuestro país para manufacturar preservativos. Contiene un 0.22 % de amoníaco y un 61.52 % de sólidos totales (LEE LATEX PTD LTD. , Malasia).

1.2.2.- Productos manufacturados a partir de látex natural

Se analizaron distintos tipos de productos manufacturados a partir de látex y productos sintéticos: guantes de diferentes marcas, lotes y para diferentes usos (domésticos, cirugía, hipoalergénicos), chupetes, tetinas, preservativos, globos, tiras elásticas, barbijos, productos para odontología, pelotas de tenis, pelotas de squash, gomas de borrar, pegamentos, catéteres de uso médico, etc.

Los métodos de extracción de proteínas a partir de estas fuentes fueron los siguientes:

- Incubación del **látex natural amoniado** con buffer de extracción (buffer fosfato salino pH 7.4 con el agregado de diferentes detergentes: 1 % SDS, 0.5 % NP40, 0.5 % Tween 20, 0.5 % Tween 80, 0.5 % Tritón X100 y 1 % deoxicolato) (1:1 v/v) durante 12 horas a temperatura ambiente con agitación. Se aisló la fase acuosa mediante ultracentrifugación (100.000 g, durante 90 min. a 4° C). La capa superior poliisoprenica fue descartada y la fase acuosa conteniendo a las proteínas hidrosolubles (*C serum*) se dializó durante 8 horas a 4° C contra buffer Tris salino pH 8.5 empleando una membrana de 3 kDa de cutoff. Se fraccionó y conservó a -20 °C hasta su uso.

- Los diferentes **productos manufacturados** fueron cortados en pequeños trozos y se incubaron con buffer PBS 0.1 M pH 7.4 (1:5 peso/volumen) en presencia de 1 % de SDS. Se incubó durante 18 horas a TA o 2 horas a 37° C con agitación. Se separó el sobrenadante por filtración y se centrifugó a 4000 g durante 10 min. para remover partículas de mayor tamaño. Posteriormente se filtró, mediante el empleo de membranas de 0.45 µm y 0.22 µm de tamaño de poro (MSI), se dializó de la forma antes descrita, se liofilizó y conservó a -20 °C hasta su empleo.

2. Obtención de antisueros en ratones

Se inmunizaron distintos lotes de ratones BALB/c (2 lotes de 5 ratones por sistema) con extractos proteicos de leche descremada, caseína o de látex natural amoniado obtenido

en presencia de SDS y posteriormente dializado contra PBS. Se siguió el siguiente protocolo de inmunización: una primer inmunización intraperitoneal empleando Adyuvante de Freund Completo y 20 μg de proteína/0.2 ml/ 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. Finalmente se realizó una sangría total, obteniéndose aproximadamente 1 ml de sangre de cada ratón. Previamente a cada inoculación se realizaron sangrías parciales por el plexo retroorbital para obtener el título de anticuerpos específicos contra el inmunógeno empleado.

Previo al inicio del plan de inmunización se extrajeron muestras de cada animal para descartar la presencia de anticuerpos específicos en el suero del animal pre-inmunizado, que luego pudieran interferir en los inmunoensayos a desarrollar.

3. Obtención de antisueros en conejos

Para cada sistema se inmunizaron dos lotes de conejos New Zealand con extractos proteicos obtenidos de leche bovina o de látex natural amoniaco en buffer fosfatos pH 7.4, mediante el siguiente protocolo de inmunización: una primer inmunización intramuscular con Adyuvante de Freund Completo y 250 μg de proteína/ 2 ml/ conejo. Luego se realizaron cuatro inoculaciones sucesivas, cada 3 semanas, con Adyuvante de Freund Incompleto y cantidades decrecientes de proteínas hasta 125 μg / 1 ml/ conejo. Se realizaron sangrías parciales y se tituló la presencia de anticuerpos específicos séricos por ELISA indirecto. Se realizó la sangría total aproximadamente a los 3 meses cuando se consideró que el título era el adecuado para el posterior uso que se le iba a dar (ELISA competitivo de cuantificación).

Previamente a las inmunizaciones se extrajeron muestras de cada animal para analizar la presencia de anticuerpos específicos en el suero del animal pre-inmunizado.

4. Electroforesis SDS-PAGE e immunoblotting

La separación de proteínas por SDS-PAGE fue realizada en un equipo Mini Protean II (Bio-Rad) con un sistema discontinuo según la técnica de Laemmli (1970). Se emplearon geles de poliacrilamida de 14% (proteínas de leche bovina) y 15% (proteínas de látex). Las corridas se realizaron a 100V para el gel de apilamiento y a 150 V durante 1 hora para el gel de corrida. Los geles fueron fijados y coloreados por dos métodos: Coomassie brilliant blue G-

250 (se sembró 35 µg de proteínas por calle) y tinción de plata (se sembró 10 µg de proteína) según la cantidad de proteína sembrada.

Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa de 0.45 nm (SMI), durante 1h a 270 mA (Tsang 1983). 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 PBS pH 7.4 conteniendo 5% de suero de caballo y 0.05 % de Tween 20 como solución de bloqueo (PBS-SC-Tween), y cortadas en tiras de 5 mm.

Estas tiras fueron reveladas con los sueros de los pacientes, antisueros de ratón o anticuerpos monoclonales. Los lavados fueron efectuados con PBS-Tween 20 0.05 %. La presencia de anticuerpos específicos unidos al antígeno inmovilizado se reveló mediante el empleo de diferentes sistemas conjugados:

- anti-IgE humana (específico de cadena ε) obtenido en cabra y conjugado a fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, dilución 1/1000 en solución de bloqueo, (SIGMA, DAKO) durante 12 horas a temperatura ambiente.
- anti-IgE humana (específico de cadena ε), anticuerpo monoclonal y conjugado a fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, dilución 1/1000 en solución de bloqueo, (Southern Biotechnology) durante 12 horas a temperatura ambiente.
- Un sistema de amplificación que consiste en una primera incubación con anti-IgE humana (específico de cadena ε) biotinilado, obtenido en oveja (VECTOR), 1 hora a 37° C y luego con Streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina o peroxidasa (PIERCE, VECTOR, SIGMA) durante 30 minutos a 37° C.
- Anticuerpos anti-gama globulinas de ratón conjugado peroxidasa (BIO RAD), obtenido en conejo, dilución 1/1000 durante 1 hora a 37 °C.
- Anticuerpos anti-gama globulinas de conejo conjugado a peroxidasa (BIO RAD), obtenido en cabra, dilución 1/1000 durante 1 hora a 37°C.

El revelado de las tiras se realizó empleando distintos sustratos-cromógenos: 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato/nitro blue tetrazolium (5-BCIP/NBT) para fosfatasa alcalina y 4-cloro-1-naftol para peroxidasa (SIGMA).

5. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales de los extractos se realizó según los métodos de Bradford y Lowry empleando como estándar de calibración seroalbúmina bovina o ovoalbúmina. Cuando el extracto proteico se preparó en presencia de SDS el método de Bradford no se puede aplicar, mientras que Lowry, es útil sólo si la concentración de SDS es menor al 1 %, por las interferencias producidas en la reacción de coloración.

Para el caso particular de extractos proteicos obtenidos a partir de látex en los que los aditivos químicos (antioxidantes, aceleradores, conservadores, etc.) agregados durante los procesos industriales de manufacturación introducen interferencias en la determinación de proteínas totales por el método de Lowry, se aplicó una modificación al método (ASTM 1995). Previo a la determinación de las proteínas totales se realizaron sucesivas etapas de precipitación e incubaciones con deoxicolato de sodio 0.15 % (p/v), ácido tricloroacético 72 % (p/v) y ácido fosfotúngstico 72 % (p/v). Se centrifugaron las muestras y el "pellet", que contiene a las proteínas precipitadas, fue resuspendido en NaOH 0.1 M. Se empleó ovoalbúmina como estándar de referencia para construir la curva de cuantificación.

Para cuantificar proteínas en extractos de productos se prepararon diluciones seriadas del extracto, por triplicado, interpolando el resultado final con aquella dilución cuya DO entrara dentro del rango de linealidad de la curva dosis-respuesta construida con el estándar de referencia.

6. ELISA competitivo secuencial para cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas de leche o látex en extractos y productos manufacturados se desarrolló un ELISA de inhibición competitivo y secuencial.

Se obtuvieron los antisueros policlonales en conejos según se describió previamente, empleando como inmunógenos los extractos obtenidos a partir de leche bovina descremada o látex natural amoniacado. Por ELISA indirecto se determinó el título de cada antisuero ensayando distintas condiciones de sensibilización, tiempos y temperaturas de incubación, volúmenes de trabajo, concentraciones de antígeno y conjugado, etc.

Las condiciones óptimas del ensayo fueron las siguientes: se sensibilizaron las placas (NUNC, Maxisorp) con 100 µl (1 µg de prot./fosa) de cada extracto proteico 8 horas a 4 °C.

Se lavó con PBS- 0.05% (v/v) Tween 20 y se bloqueó con PBS- 5 % suero de caballo- 0.05 % Tween 20 durante 1 hora a 37 °C.

Para el ensayo de cuantificación fueron preincubados durante 60 min. a 37 °C volúmenes iguales del antisuero específico, a la concentración establecida según su título, con diluciones seriadas del estándar proteico empleado para cada sistema (cuantificado por Lowry) o las distintas muestras a cuantificar (se ensayaron distintas diluciones).

Un volumen de 100 µl de cada mezcla de preincubación se incubó en cada fosa sensibilizada durante 60 min. a 37°C. Luego de lavar se agregó el antisuero anti-proteínas de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (BIO RAD) 1/3000 durante 60 min. a 37 °C. Para el desarrollo de color se agrega o-fenilendiamina (OPD) - H₂O₂ en buffer citrato-fosfato pH 5. La reacción se detiene con SO₄H₂ 4N y se mide densidad óptica (DO) a 490 nm.

Dado que no se observa una relación lineal entre los valores de DO y concentración de antígeno se transforman las DO en logit (Tijssen 1985) para linealizarlos y graficar la curva de referencia. Se determinó el límite de detección del ensayo mediante un análisis estadístico τ de Student y el rango de concentraciones del estándar, en el cual la curva se comporta en forma lineal, para obtener las concentraciones de proteínas antigénicas de las muestras por interpolación.

7. Determinación del título de antisueros

El título de las muestras obtenidas de los ratones y conejos inmunizados fue determinado por ELISA indirecto.

Se sensibilizó la fase sólida (policubetas de poliestireno NUNC Maxisorp) con el inmunógeno (1 µg de prot./fosa) durante 1 hora a 37 °C y se bloqueó empleando una solución de proteínas de leche bovina 3% (p/v) durante 1 hora a 37 °C. Los lavados se realizaron con solución de NaCl 9 g/l y Tween 20 0.05% (v/v). Posteriormente se incubó con diluciones seriadas de los sueros (diluidos en solución de bloqueo) durante 1 hora a 37 °C. La presencia de anticuerpos específicos se reveló empleando anticuerpos específicos de especie (cadena γ) conjugado a HRP 1/3000 (BIO RAD). Previamente cada anticuerpo conjugado fue titulado para determinar la dilución óptima a emplear en el ensayo. Se agregó el sustrato-cromógeno (OPD-H₂O₂) y luego de detener la reacción con SO₄H₂ 4N se leyó DO a 490 nm.

Se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos específicos durante las inmunizaciones, hasta que se realizó la sangría total aproximadamente a los 3 meses. Se hizo un “pool” de sueros para cada sistema, se determinó el título de anticuerpos específicos, y se almacenó a - 4°C hasta su empleo.

8. Sueros humanos

Los sueros analizados fueron obtenidos en distintos Servicios hospitalarios a los cuales concurren los pacientes para su asistencia: Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata, Servicio de Alergia Hospital Pedro de Elizalde, Servicio de Urología del Hospital de Niños de La Plata, Servicio de Alergia del Hospital Penna de Bahía Blanca.

8.1. Alergia a leche bovina

Para la optimización de los inmunoensayos para detección y cuantificación de IgE específica se evaluaron 140 sueros pertenecientes a 75 individuos de sexo masculino y 65, de sexo femenino, con edades comprendidas entre 3 meses y 25 años. Ochenta sueros pertenecen a pacientes alérgicos a leche de vaca mientras que los restantes pertenecen al grupo control negativo.

En el grupo de pacientes atópicos, 43 sueros pertenecen a mujeres y 37, a varones, con edades entre 3 meses y 25 años. Fueron seleccionados en base a historia clínica compatible (dermatitis, rinitis, trastornos digestivos, etc luego de la ingesta del alimento) e IgE total elevada según la edad.

El grupo control negativo estuvo constituido por 25 sueros de pacientes atópicos a otros alérgenos alimentarios (huevo, harina, maní, etc.) y 35 de individuos no atópicos (sin historia clínica compatible con alergia e IgE total normal para la edad).

Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

8.2. Alergia al látex

En una primera etapa en la que se desarrollaron y optimizaron métodos inmunoenzimáticos para detección de IgE específica por EAST, RAST y ELISA fueron

analizados 236 sueros. Pertenecían a individuos con edades comprendidas entre 1 y 68 años los que se dividieron en 4 grupos (en base a la bibliografía internacional existente):

-Grupo I: este grupo incluye 16 sueros pertenecientes a pacientes que han sido sometidos a múltiples cirugías: 15 con espina bífida y 1 con un tumor cerebral. Corresponden a 7 de sexo femenino y 9 de sexo masculino, con edades entre 1 y 24 años (edad promedio: 7.8).

-Grupo II: este grupo consiste en 64 sueros provenientes de individuos cuya actividad laboral está relacionada con la Salud (médicos, odontólogos, enfermeros, instrumentistas, bioquímicos, personal de laboratorio, etc.). Pertenecen a 51 mujeres y 13 hombres con edades comprendidas entre 18 y 57 años (edad promedio: 37.7).

-Grupo III: se incluyen 96 sueros de pacientes ambulatorios elegidos al azar que concurren por diferentes motivos al Servicio de Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata. Sus edades están comprendidas entre 1 y 68 años, corresponden a 61 pacientes de sexo femenino y 35 de sexo masculino (edad promedio: 32.6).

-Grupo control: este grupo comprende 60 sueros pertenecientes a individuos no atópicos. Presentan IgE total normal según la edad y sin signos clínicos evidentes de alergia a productos que contienen látex. Corresponden a 36 mujeres y 24 hombres con edades entre 1 y 69 años (edad promedio: 31.2).

Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

Luego de optimizados los ensayos en cuanto a su sensibilidad y especificidad, se aplicaron a un estudio multicéntrico de prevalencia de alergia al látex (actualmente en ejecución). Se emplea como ensayo de screening un ELISA indirecto y como ensayo de cuantificación: EAST. En este proyecto participan los Servicios de Urología del Hospital de Niños de La Plata, Alergia del Hospital San Juan de Dios de La Plata, Alergia del Hospital J. Penna de Bahía Blanca y Alergia del Hospital Pedro de Elizalde de Capital Federal. En estos Servicios asistenciales se realizan las pruebas cutáneas (con extractos comerciales y los preparados por nuestro grupo), las historias clínicas correspondientes y se les extrae una muestra de sangre que es remitida a nuestro laboratorio para su análisis.

9. Determinación de IgE total

Para la determinación de la IgE total sérica se desarrolló un ELISA de captura empleando discos de papel (Munktell Swedish Filter) activados con BrCN a los cuales se les acopló un anticuerpo anti-IgE humana policlonal (SIGMA). Luego de bloquear (PBS-SC-

Tween) 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). El sustrato empleado fue ρ -nitrofenil fosfato de sodio (NPP). Se detiene 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) y chequeada contra un estándar internacional de IgE (Immunoglobulin E Reference Preparation 69/204). Mediante el empleo de sueros previamente analizados por radioinmunoensayo (PRIST-Pharmacia) se determinó la sensibilidad y especificidad de del ensayo optimizado.

10. Determinación de IgE específica sérica

10.1. Dot-blot

Para el dot-blot se sensibilizaron papeles de nitrocelulosa con 2 μ l de una solución de 1 mg/ml del alérgeno de interés disuelto en el buffer empleado para la electrotransferencia (TRIS-Glicina-Metanol) pH 8.4. El bloqueo se realizó con PBS-SC-Tween y luego se incubó con el suero (diluido 1/5 en solución de bloqueo) durante 12 horas a temperatura ambiente. Se lavó como ha sido descrito y se reveló con anti-IgE humana (específica de cadena ϵ) y conjugada a fosfatasa alcalina 1/1000 (Southern Biotechnology). El desarrollo de color se realizó con 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato/nitro Blue Tetrazolium (5-BCIP/NBT) (SIGMA).

10.2. ELISA indirecto

Se sensibilizaron placas de microelisa (NUNC, Maxisorp) con los extractos proteicos (1 μ g de prot./fosa) obtenidos a partir de látex natural amoniaco y leche bovina descremada. Se bloqueó con PBS-suero de caballo 5% y se incubó los sueros de los pacientes (dilución 1/5 en solución de bloqueo). Se lavó como fue descrito e incubó con el conjugado: anti-IgE humana (específica de cadena ϵ) obtenida en cabra y conjugada a fosfatasa alcalina 1/1000 (Southern Biotechnology). El desarrollo de color se realizó con ρ -nitrofenil fosfato de sodio, deteniendo la reacción con NaOH. Se midió absorbancia a 405 nm.

Para determinar el cutoff de cada ensayo se analizaron alrededor de 50 sueros normales (sin historia clínica de atopía, niveles IgE total normales y sin IgE específica) en las mismas condiciones que los sueros de los pacientes atópicos. El valor de corte se calculó como la media + 3 desviaciones estándar.

Como controles de especificidad se analizaron sueros de pacientes alérgicos a alérgenos no relacionados con los sistemas empleados (drogas, pólenes, malezas, etc.) y un suero con valores de IgE total de 20.000 UI/ml correspondiente a un Síndrome de hiper IgE.

El control de especificidad y sensibilidad del ELISA para detección de IgE específica para látex se realizó comparando nuestros resultados con los obtenidos mediante el empleo de un kit comercial de ELISA (CAP System, Pharmacia Diagnostic, Uppsala, Sweden).

Este inmunoensayo fue empleado como método de screening para ambos sistemas.

10.3. EAST

La determinación de IgE específica sérica para cada sistema se realizó mediante el diseño de un ELISA indirecto. Se emplearon discos de papel activados con CNBr que fueron sensibilizados con cada extracto proteico o muestras comerciales (1 mg/ml de proteínas) en buffer 0.1 M carbonato/bicarbonato pH 8.5 según el método de Ceska (1972). Se incubó cada disco con 50 µl de suero (sin diluir) a analizar durante 12 hs a temperatura ambiente. La presencia de IgE específica fue revelada con 50 µl de un anticuerpo anti-IgE humana (específica de cadena ε en cabra) y conjugada a fosfatasa alcalina 1/1000 (Southern Biotechnology). El sustrato utilizado fue p-nitrofenil fosfato de sodio (NPP), la reacción se detuvo con NaOH 20 mM. Se midió absorbancia a 405 nm.

Para la cuantificación de la IgE específica en clases se construyó una curva de calibración empleando un "pool" de sueros con IgE específica contra *Dermatophagoides*, por tratarse del alérgeno más frecuente en nuestro medio, y un extracto proteico obtenido a partir del cuerpo de dicho ácaro (Lundkvist 1975). La composición proteica del extracto fue determinada por SDS-PAGE, cuantificada por el método de Lowry y comparada con un extracto estándar internacional. Se determinó la concentración de IgE total del "pool" de sueros y las diluciones se realizaron empleando suero de caballo o un suero humano con un bajo contenido de IgE total. Se realizaron 4 diluciones del "pool" de sueros (hasta valores de IgE total de 50 UI/ml) y se realizó la técnica previamente descrita de EAST con papeles sensibilizados con el extracto de *Dermatophagoides*.

Con las DO obtenidas con este sistema se graficó la curva DO vs clases (desde 0 hasta 4) de la que interpolando se obtienen los valores de IgE específica en clases para cada sistema. Previamente se determinó con un “pool” de sueros de cada sistema (leche bovina y látex), que la curva dosis-respuesta es paralela a la curva de *Dermatophagoides*.

Este ensayo se empleó para la semicuantificación de IgE específica para cada sistema.

10.4. ELISA de captura

Placas de microelisa de poliestireno (NUNC, Maxisorp) fueron sensibilizadas con los anticuerpos monoclonales contra proteínas de leche: 1D5-I, 2A1-I o 3B5-I. (0.5 µg/fosa). Se incubó, lavó (PBS-Tween 20) y bloqueó con PBS-SC-Tween. Posteriormente se incubó con una solución de leche bovina (1 mg/ml) durante 1 hora a 37°C para luego agregar los sueros de los pacientes a analizar (diluidos 1/5 en solución de bloqueo). Se incubaron durante 8 hs a TA, se lavó y se agregó el conjugado: anti-IgE biotilado (Vector) y streptavidina-HRP (Pierce). El revelado de color fue realizado con OPD-H₂O₂. Se detuvo la reacción con SO₄H₂ 4N y se midió densidad óptica a 490 nm.

10. 5. Immunoblotting

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubaron con la solución de bloqueo (suero de caballo en PBS 5 %) durante 1 hora a 37 °C y luego de lavarlas (NaCl-Tween 20) se incubaron con cada suero diluido ¼ en solución de bloqueo durante 12 horas a TA. Se lavó exhaustivamente y se agregó el anticuerpo conjugado (sistemas descritos en el punto 4). El revelado de color se realizó con 5-BCIP-NBT o con 4-cloro-1-naftol según la enzima conjugada. La reacción se detuvo empleando solución de lavado.

11. Determinación de IgG específica por ELISA

Se sensibilizaron placas de microelisa (NUNC, Maxisorp) con 1 µg de proteínas/fosa con los extractos de leche bovina o látex natural amoniacado. El bloqueo se realizó con PBS-suero de caballo-Tween 20 y luego se incubó con los sueros a analizar. Se probaron diferentes diluciones (1/20, 1/50, 1/100) y tiempos de incubación. Luego de lavar con NaCl-Tween 20 se agregó el conjugado: anti-cadena γ humana conjugado a HRP 1/3000 (BIO RAD). Luego

de incubar durante 1 hora a 37°C y lavar se agregó el sustrato-cromógeno: OPD-H₂O₂. La reacción se detuvo con SO₄H₂ 4N y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Para determinar el cutoff de cada ensayo se analizaron 50 sueros a los cuales hubo que adsorberles la IgG con un antisuero anti-cadena γ (30 min. a 37°C) con papeles de nitrocelulosa sensibilizados con proteínas de leche bovina o látex natural (12 horas a 4°C). El valor de corte e los ensayos se estableció como la media de las densidades ópticas + 3 DE.

12. Producción de anticuerpos monoclonales

Ratones BALB/c (hembras de 7 semanas de edad) fueron inmunizados intraperitonealmente como se describió previamente con proteínas totales de leche o látex natural. Mediante sangrías parciales se analizó el título de anticuerpos por ELISA indirecto para cada sistema a los 7 días posteriores a cada inmunización.

El ratón con mayor título de anticuerpos específicos fue sangrado 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), como fue descrito por Galfré y Milstein. 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 las fosas para identificar a las que contienen hibridomas secretores de anticuerpos específicos por ELISA indirecto. Las fosas que dieron valores positivos, respecto a los controles empleados, fueron expandidas y crecidas. Para determinar la especificidad de los anticuerpos secretados se analizaron los sobrenadantes por diferentes métodos:

- immunoblotting
- ELISA indirecto sensibilizando con proteínas totales de leche, fracciones proteicas purificadas y látex natural
- Dot blot sensibilizando con proteínas totales de leche, fracciones proteicas purificadas y látex natural.

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

13. 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 Pristane para inducir la formación de líquido ascítico y se crecieron los hibridomas 1D5-I, 2A1-I y 3B5-I (previamente descongelados y crecidos). Se inocularon por vía intraperitoneal a razón de $2 \cdot 10^6$ células/ratón cada hibridoma por separado y luego de 15-20 días se extrajo el líquido ascítico conteniendo los anticuerpos de interés por punción.

17. Aislamiento y purificación de anticuerpos monoclonales

De cada líquido ascítico se aislaron los anticuerpos monoclonales por precipitación isoeléctrica con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50 % con agitación lenta a 4 °C. Se centrifugó a 7000 rpm durante 30 minutos y el “pellet” 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).

La purificación se realizó por cromatografía de intercambio aniónico (FPLC, MONO Q) empleando como buffer de elución

El pico que eluye en aproximadamente 30 % de NaCl corresponde a la fracción que contiene las inmunoglobulinas. Se chequeó su pureza por SDS-PAGE, y su especificidad por ELISA e immunoblotting.

La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry.

14. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales

Mediante la aplicación de la precipitación en medios gelosados (Outcherlony) se determinó el isotipo de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales purificados.

Se sembraron en agarosa al 1 % (p/v en PBS) 5 μ l/fosa de cada antisuero anti-isotipo obtenidos en cabra (The Binding Site) y de cada sobrenadante de cultivo correspondiente a cada anticuerpo monoclonal. Se dejó difundir durante 48 hs a 4 °C y luego de sucesivos lavados con PBS y agua destilada se reveló la presencia de bandas de precipitación por coloración con Amidoschwartz.

15. Tratamiento de mezclas de caseína con agentes caotrópicos

Las mezclas de caseína aisladas y purificadas por cromatografía fueron sometidas a diferentes tratamientos para alterar su conformación:

- Incubación a 37°C durante 2 horas con β -mercaptoetanol 0.5 %.
- Incubación durante 12 horas a 4°C con β -mercaptoetanol 0.5 % y urea 3 M, 6M y 9M.
- Incubación con ditioneol 10 mM durante 2 horas a TA con agitación, agregado de iodoacetamida 25 mM y agitación por rotación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se dializó contra PBS.

16. Coloración y oxidación de hidratos de carbono

Para la coloración e identificación de hidratos de carbono en muestras de leche bovina se separaron las proteínas en un gel desnaturizante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se realizó la identificación de las glicoproteínas mediante el empleo del kit para la detección de glicoproteínas de BIO RAD.

Para la oxidación de hidratos de carbono se lavó la membrana de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas con buffer AcH/NaAc 0.1 M pH 5.5. La incubación con NaIO₄ 10 mM en buffer AcH/NaAc 0.1M pH 5.5 se realizó en distintas condiciones siempre en la oscuridad: 12 hs a 4°C, 20 minutos a 37 °C y 60 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana con buffer acetato pH 5.5 y con PBS pH 7.4.

Posteriormente se reveló la presencia de hidratos de carbono en la membrana o se continuó con el immunoblotting con los anticuerpos monoclonales como se describió anteriormente.

Para la oxidación de hidratos de carbono no se pudo realizar la técnica en solución dado que las proteínas de la leche no pueden ser dializadas contra buffer AcH/NaAc pH 4.5 porque las caseínas se desnaturalizan.

17. Prueba cutánea

Las pruebas cutáneas se realizaron por prick test sobre la cara anterior del antebrazo empleando lancetas de metal.

Se prepararon extractos alergénicos en una concentración proteica del orden de los $\mu\text{g/ml}$ en buffer fosfatos pH 7.4. Se les adicionó glicerina (50 % v/v) y fueron filtrados empleando membranas de 0.22 μ de tamaño de poro. 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 realización del prick test requirió de las siguientes condiciones:

- Edad mayor de 3 años
- Que no se encuentre bajo tratamiento con anti-histamínicos o corticoides
- Que la piel no tenga lesiones
- Conocer la composición proteica del extracto alergénico
- Que el paciente no tenga una historia clínica de anafilaxia

Los extractos proteicos empleados fueron los siguientes: látex, mezcla de *Dermatophagoides*, *Alternaria* y *Ambrosia*. Se consideró resultado positivo cuando los diámetros de la roncha y halo fueran 3 mm mayor que los del control negativo.

Capítulo I -Alergia a leche bovina



| | |
|--|----|
| 1. Generalidades | 72 |
| 2. Composición proteica de la leche bovina y características estructurales | 74 |
| 2.1. Componentes proteicos de las miscelas de caseína | 75 |
| 2.2. Proteínas del suero | 81 |
| 3. Signos clínicos y mecanismos patogénicos | 83 |
| 4. Diagnóstico | 85 |
| 5. Tratamiento | 86 |
| Objetivos específicos | 90 |
| Resultados | 90 |
| Discusión | 90 |

Capítulo I -Alergia a leche bovina

Introducción



1. Generalidades

Los alimentos son esenciales para la vida y su ingesta constituye el mayor ingreso de sustancias extrañas al organismo. En países occidentales se estima que la cantidad de alimentos ingeridos por un individuo a lo largo de su vida alcanza las 2-3 toneladas, lo cual constituye un importante desafío para el sistema inmune. El permanente contacto del organismo con proteínas antigénicas puede desencadenar enfermedades o intolerancias alimentarias (Sampson 1999).

La leche constituye un complejo fluido biológico sintetizado por los mamíferos para alimentar a sus crías. Dado su elevado contenido de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y minerales y su estabilidad biológica, se ha constituido con el transcurso del tiempo en un importante alimento. Las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde hace más tiempo y en mayor cantidad ha consumido el hombre. En niños se la emplea como reemplazo de la leche materna y en adultos es una fuente de proteínas y minerales muy importante. Las cualidades nutricionales de sus componentes ha determinado que se hayan desarrollado numerosos productos lácteos procesados y que sean empleados como aditivos en alimentos no lácteos.

Dado que la leche bovina es la que más se produce comercialmente, ha sido exhaustivamente estudiada en cuanto a su composición química, estructura primaria de sus principales componentes proteicos, propiedades fisico-químicas, propiedades funcionales, estructuras conformacionales, etc. La leche descremada es un sistema coloidal en el cual la fase dispersa esta constituida por agregados proteicos (caseínas) que interaccionan con la fase fluida (suero) y de esta manera no coagula espontáneamente.

Reacciones adversas a leche de vaca y otros alimentos han sido descritas desde hace siglos (Blackfan 1920, Loveless 1950, Cohen 1989). Con el fin de uniformar la nomenclatura concerniente a las intolerancias alimentarias la Academia Americana de Alergia e Inmunología (AAAI) y el Instituto Nacional de Salud (NIH) han definido en forma precisa los distintos desórdenes originados por los alimentos con el fin de estandarizar la literatura:

- **reacción adversa:** incluye a todas las reacciones producidas por la ingesta de un alimento o aditivo.

- **reacción adversa tóxica:** reacción causada por sustancias nocivas presentes en el alimento y que afectan la salud de cualquier individuo. Ejemplos: histaminas en ciertos pescados, toxinas bacterianas, contaminantes químicos (sulfitos, glutamatos), etc.
- **reacción adversa no tóxica:** reacción causada por un componente del alimento, puede estar mediada o no por el sistema inmune y depende de la susceptibilidad individual.
- **alergia o hipersensibilidad:** reacción adversa no tóxica originada por mecanismos inmunológicos, mecanismos de hipersensibilidad antes mencionados. La hipersensibilidad mediada por IgE es la más común de las patologías alimentarias inmunológicas.
- **intolerancia:** reacción adversa no tóxica originada por mecanismos no relacionados con el sistema inmune. Es la forma que se presenta con mayor frecuencia y las causas pueden ser muy variadas: anomalías anatómicas en el tracto gastrointestinal, deficiencias enzimáticas (en general disacaridasas), presencia de sustancias farmacológicamente activas (cafeína, tiramina, etc), trastornos psicológicos (ansiedad, depresión), etc.

Para el caso de las alergias el mecanismo patogénico más frecuentemente descrito es el de hipersensibilidad Tipo I, aunque diversas respuestas de hipersensibilidad pueden producirse en un individuo genéticamente predispuesto (May 1972, Host 1994). En ellos se produce una falla en el desarrollo de tolerancia oral o se pierde la tolerancia en su tracto gastrointestinal, resultando en una producción excesiva de IgE específica contra proteínas nutritivas que atraviesan en forma intacta la mucosa intestinal (Björkstén 1983). La mayoría de los individuos presentan en circulación anticuerpos específicos de isotipo IgG (principalmente IgG1 e IgG3) que resultan inocuos, mientras que los individuos atópicos, producen IgE que desencadenará los fenómenos de atopía al ingerir el alimento que contiene al componente nocivo. En general estos componentes pueden ser proteínas, glicoproteínas o hidratos de carbono.

La prevalencia de las alergias alimentarias está en aumento debido a los cambios introducidos en la dieta (incorporación de nuevos alimentos como kiwi, mango, mayor ingesta de alimentos preparados, etc.) y nuevas tecnologías de procesamiento empleadas por la industria alimentaria (nuevos alimentos por modificación de preexistentes, nuevos ingredientes, etc.).

Las alergias alimentarias constituyen las primeras manifestaciones de atopía en individuos susceptibles, y pueden manifestarse a partir de las primeras ingestas del alimento (Bock 1987, Host 1990). En general luego se continúan con desórdenes causados por alérgenos de distinto origen y culminan con procesos crónicos (asma), si no se realizó un tratamiento correcto (Gortler 1995). Los alérgenos alimentarios más comunes en chicos son leche bovina, huevo y trigo, aunque esto varía según la dieta de cada país.

En países desarrollados se han descripto prevalencias de reacciones adversas a alimentos en chicos de hasta un 28 % (Bock 1987), mientras que se estima que la prevalencia de la alergia a proteínas de leche bovina en la primera década de vida es de un 2-8 %. (Goldman 1963, Hide 1993; Schrandt 1993, Host 1990, Host 1994). En adultos se han reportado datos de prevalencias inferiores al 3 % (Hide 1993; Schrandt 1993, Young 1994, Niestijl Jansen 1994). Entre las reacciones de hipersensibilidad, las IgE-dependientes constituyen aproximadamente el 60 % de las mismas. El 15 % de los individuos manifiestan reacciones alérgicas frente a la leche durante la segunda década de vida, mientras que el 35 % desarrolla reacciones de atopía al estar expuestos a otros alimentos. Esta disminución de la respuesta con el tiempo implica que se estaría induciendo un estado de tolerancia a los alérgenos alimentarios (Host 1990, Host 1997).

Reacciones adversas a aditivos también son observadas, aunque con una frecuencia inferior al 1 % (Fuglsang 1993).

En nuestro país constituye la alergia alimentaria más frecuentemente observada, debido a los hábitos alimenticios de nuestra población.

2. Composición proteica de la leche bovina y características estructurales

Las proteínas constituyen el 3-3.5 % (p/v) de la leche de vaca, lo cual representa el 95 % del nitrógeno total. El resto del nitrógeno es aportado por aminoácidos libres, nucleótidos, urea, etc. El 80 % de las proteínas (24-28 g/l) se encuentra bajo la forma de complejos macromoleculares o miscelas cuya principal función biológica sería el transporte de minerales bajo la forma de fosfatos de calcio (30 % del calcio total), mientras que el resto de las proteínas (5-7 g/l) se encuentra en forma soluble.

Las proteínas de la leche bovina y de otras especies pueden ser clasificadas en dos grupos según su solubilidad por acción de una enzima (quimozina o renina) o por acidificación a pH 4.6 y a 20°C: las caseínas, fracción insoluble que constituye el 80 % de las proteínas totales, y las proteínas del suero o fracción soluble.

2.1. Componentes proteicos de las miscelas de caseína

Desde un comienzo se consideró a las caseínas como un sistema proteico homogéneo. Sin embargo la aplicación de diferentes métodos para su estudio permitieron demostrar la gran heterogeneidad del sistema. El análisis de su movilidad electroforética, en geles alcalinos de poliacrilamida en presencia de urea, permitió distinguir 3 fracciones denominadas, en orden decreciente de movilidad, α -caseína, β -caseína y γ -caseína (Palumbo 1972, Whitney 1976). Luego se determinó que las α -caseínas incluyen a las α_s -caseínas, cuya solubilidad depende de la presencia de calcio en el medio (insolubles en concentraciones de CaCl_2 mayor que 0.4 M a pH 7.0 y a 4°C) y a las κ -caseínas, cuya solubilidad es independiente de la presencia de calcio (Hipp 1952, Waugh 1962). Estudios posteriores permitieron dilucidar la complejidad del sistema de las caseínas. Es un sistema constituido por más de 20 proteínas fosforiladas divididas en 4 grupos: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína (previamente designadas α_s -caseínas), β -caseína y κ -caseína, en una relación aproximada entre ellas de 40:10:35:12. Además, han sido caracterizados componentes menores provenientes de la proteólisis post transcripcional de las caseínas por acción de proteasas alcalinas presentes en la leche (plasminógeno, plasmina) (Eigel 1979): γ -caseína (1-2 g/l) y proteosa-peptonas (0.6-1.8 g/l) provenientes de β -caseína, y λ -caseína derivada de la α_{s1} -caseína.

Cuatro componentes han sido descriptos como los principales en la conformación de las miscelas de caseína: α_{s1} -, α_{s2} -, β -, y κ -caseína en una proporción 3.8:1:3.6:1.3

Presentan una homología de secuencia muy baja, a pesar de lo cual comparten algunas propiedades: presentan una estructura tipo dipolar con propiedades anfipáticas, son proteínas fosforiladas, tienen una escasa estructura terciaria, se encuentran muy hidratadas, su estructura laxa las hace muy susceptible a proteasas, en general resisten procesos térmicos, etc.

Las caseínas presentan microheterogeneidad debida a distintos grados de fosforilación, glucosilación, polimerización por formación de enlaces disulfuros y polimorfismo genético.

La fosforilación es un proceso post-traduccional que se produce en el Aparato de Golgi por acción de caseíno fosfoquinasas que actúan en sitios específicos (residuos serinas y treoninas, principalmente en α s-caseínas). Estas secuencias peptídicas que contienen a los restos fosforilados presentan una alta homología de secuencia entre las α - y β -caseína de diferentes especies animales. Se localizan en zonas con plegamiento β , que por el plegamiento de la molécula se encuentran muy próximos entre sí constituyendo un dominio muy hidrofílico. Estos dominios conservados constituyen importantes epitopes inmunorreactivos resistentes a la degradación enzimática (Otani 1987, Meisel 1989).

La κ -caseína es el único componente que contiene hidratos de carbono. Presenta distintos grados de glucosilación sobre restos treonina. Se han detectado restos de glucosamina, galactosa, N-acetil galactosamina y ácido N-acetil muramínico que alteran la carga y migración electroforética de este componente (en geles de poliacrilamida se pueden observar hasta 7 bandas). Asimismo, las caseínas polimerizan por formación de enlaces disulfuro inter e intracatenarios lo cual modifica sus propiedades conformacionales. Finalmente, presentan un polimorfismo genético por sustitución de uno o varios aminoácidos y estas isoformas muestran distinto comportamiento antigénico y alergénico. Así tenemos 5 variantes alélicas para la α s₁-caseínas, 4 para la α s₂-caseínas, 8 para la β -caseína y 2 para la κ -caseína, aunque algunos alelos sólo se expresan en las glándulas mamarias de ciertas especies.

Debido al carácter hidrofóbico de las caseínas, éstas tienden a asociarse y formar agregados aunque sus características variarán con la temperatura y el pH del medio (pH normal de la leche: 6.6). La α s₁-caseína forma polímeros de hasta 6 unidades entre sí, mientras que β -caseína puede formar polímeros de hasta 22 unidades (Mc L Whitney, 1988). Además se forman complejos supramoleculares entre α s-caseína, β -caseína y κ -caseína mediante la formación de puentes disulfuros entre ellas.

α s₁-caseína: está constituida por 199 aminoácidos y el 70 % de su estructura es desordenada debido al alto contenido en prolina. Además el 45 % de los residuos aminoacídicos son hidrofóbicos (Merciér 1971). Presenta un clúster ácido (41-80) en el cual predominan aminoácidos ácidos y contiene 7 de los 8 residuos fosfatos (monoéster de serina). Esta porción presenta una estructura secundaria de α hélice, una alta carga neta negativa, una baja hidrofobicidad y un alto grado de solvatación (Merciér 1971). Estas características determinan que la estructura sea abierta, susceptible a la acción de proteasas (pepsina, tripsina, plasmina) y varíe con la presencia de detergentes desnaturizantes.

La porción 100-199 presenta una elevada hidrofobicidad que determina una auto-asociación en medio acuoso con baja fuerza iónica. Esta propiedad depende de la temperatura y de la fuerza iónica: a 37 °C y fuerza iónica 0.5 es insoluble. Por otro lado la solubilidad de este componente depende del calcio iónico presente en el medio. En presencia de 5-10 mM de Cl_2Ca precipita y este fenómeno no depende de la temperatura.

Por lo tanto en las condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de calcio de la leche este componente debería ser insoluble.

α s₂-caseína: esta formada por 207 aminoácidos y es la más fosforilada por lo cual interacciona muy fuerte con el Ca^{++} . En su secuencia tiene dos restos cisteínas con los cuales forma puentes disulfuro intra e intercatenarios, aunque sólo forma dímeros. Contiene dos segmentos de 70 aminoácidos con una homología de secuencia del 38 % que podrían haber surgido por duplicación génica.

Presenta regiones alternadas de 40 aminoácidos con distinta carga e hidrofobicidad. Es el componente con menor grado de asociación por interacciones hidrofóbicas. Las interacciones electrostáticas son importantes para estabilizar la estructura.

β -caseína: contiene 209 aminoácidos y es el componente más hidrofóbico. El alto contenido de residuos de prolina distribuidos en toda su estructura determina una conformación poco ordenada. Dos tercios de su estructura es no polar, mientras que el extremo N terminal (1-43) contiene los 5 restos fosfatos, una carga neta negativa elevada, una baja hidrofobicidad y una estructura en α hélice (Creamer 1981).

La porción 136-209 es altamente hidrofóbica, con un muy bajo contenido de estructura β . Esta porción determina una agregación de la molécula en forma espontánea a 37 °C, aunque estas interacciones hidrofóbicas dependen de la temperatura (Waugh 1970).

La solubilidad de esta molécula también depende de la presencia de calcio en el medio. A temperatura ambiente y en presencia de concentraciones inferiores a la de la leche este componente es insoluble.

Cuando se encuentra conformando las miscelas su alto grado de hidrofobicidad determina que por su estructura compacta sea muy poco sensible a las proteasas. Sin embargo, como monómero, y a 4°C, la acción de proteasas genera las γ -caseína (porción C terminal hidrofóbica) y las proteosa-peptonas (extremo N terminal hidrofílico).

κ -caseína: esta formada por 169 aminoácidos y sólo tiene dos grupos fosfatos con los que interacciona con el Ca^{++} . De esta forma su solubilidad no se ve afectada por la presencia de un amplio rango de concentración de calcio iónico en el medio. Esta propiedad y su interacción con las demás caseínas le permite estabilizarlas en presencia de calcio.

Es el único componente que se encuentra glucosilado por lo cual la porción que contiene a los hidratos de carbono presenta una elevada hidrofiliidad.

El extremo C terminal (138-169) glucosilado presenta una hidrofobicidad baja, una carga neta negativa elevada, y 2 zonas con estructura de α -hélices. La porción N terminal (1-34) tiene una alta frecuencia de carga, pero una carga neta 0 y se encuentra en la superficie de la molécula. El resto de la molécula tiene una elevada hidrofobicidad (35-137) y una estructura secundaria de hojas β -plegada antiparalelas (31 %) y β giros (24 %). Esta conformación ordenada hace que la κ -caseína sea poco sensible a las proteasas aunque la quimosina del cuajo (renina) actúa en forma muy específica, provocando su coagulación. Cliva el enlace Phe-Met (105 y 106) que se encuentra en una zona superficial que contiene α -hélice rodeada de zonas con β giros. Se generan dos componentes: caseíno-glicopéptido o macropéptido (106-169) que es el extremo C terminal aniónico, muy polar y soluble, por los grupos fosforilados y glucosídicos; y un péptido hidrofóbico o para- κ caseína, que es insoluble, catiónico y por su elevada hidrofobicidad coagula en medio acuoso.

Además la κ -caseína, al igual que la α_{s2} -caseína, contiene dos restos de cisteína: la que se encuentra en la posición 11 se ubica en una zona superficial (extremo N terminal), mientras que la 88 se halla en una zona con estructura β -plegada (dentro de la zona hidrofóbica) que también es superficial. Esta característica hace a estos restos aminoacídicos accesibles a la disulfhidriloxidasa, presente en la membrana de los glóbulos, que cataliza la formación de puentes disulfuros intra e intercatenarios por lo cual puede formar polímeros.

Por lo tanto este componente es muy importante para mantener la estabilidad miscelar y se ubica principalmente en su superficie interactuando con el medio acuoso.

Miscelas de caseína: a pesar de haberse caracterizado en forma detallada a las caseínas individuales, no se conoce exactamente la estructura de las miscelas. Los monómeros se asocian entre sí formando estructuras esféricas con un diámetro promedio de 140 nm, un volumen aproximado de $1.4 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$, un peso molecular determinado por dispersión de luz de $10^8 - 10^9 \text{ kDa}$ (Holt 1975) y con alrededor de 25.000 monómeros por estructura en una relación: $3 \alpha_{s1} : 1 \alpha_{s2} : 3 \beta : 1 \kappa$

En la **figura 3** se muestra una fotografía obtenida por microscopía electrónica correspondiente a miscelas de caseína de leche bovina descremada.

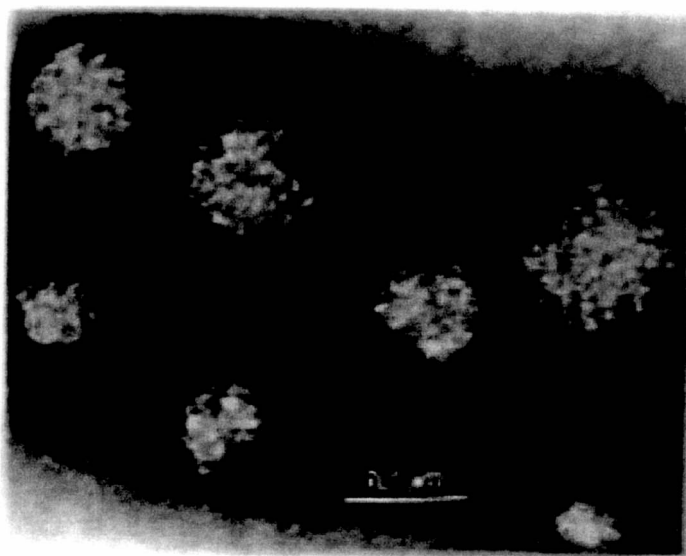


FIGURA 3. Miscelas de caseína de leche bovina descremada (microscopía electrónica). Tomada de Farrell (1973)

Se han propuesto diversos modelos para explicar la estructura y el comportamiento de las miscelas, en base a la aplicación de diferentes metodologías y a la acción y características de diversas enzimas proteolíticas. Estos modelos permiten explicar la solubilidad de los componentes en presencia de calcio iónico, interacciones entre componentes, tamaños de las miscelas, acción de enzimas proteolíticas tales como la quimosina, papaína, etc (Waugh 1970, Parry 1969, Garnier 1970, Shimm 1964, Morr 1967, Farrel 1973). El modelo más aceptado es el que postula la existencia de submiscelas de 10-30 nm de diámetro, que interaccionan entre sí para formar las estructuras supramoleculares de 140 nm. Entre las submiscelas se establecen enlaces hidrofóbicos, puentes de Ca^{++} (fosfato de calcio coloidal) y enlaces disulfuro intercatenarios. La composición de estas estructuras es variable. La distribución y tamaño de las submiscelas dependerá de su contenido en κ -caseína. Las submiscelas con mayor contenido se ubicarán en la superficie de la miscela, para interactuar con el medio acuoso, y además serán las estructuras con menor tamaño.

En la figura la **figura 4** se muestra el esquema propuesto por Slattery y Evard (1973) en donde se puede observar una miscela formada por submiscelas.

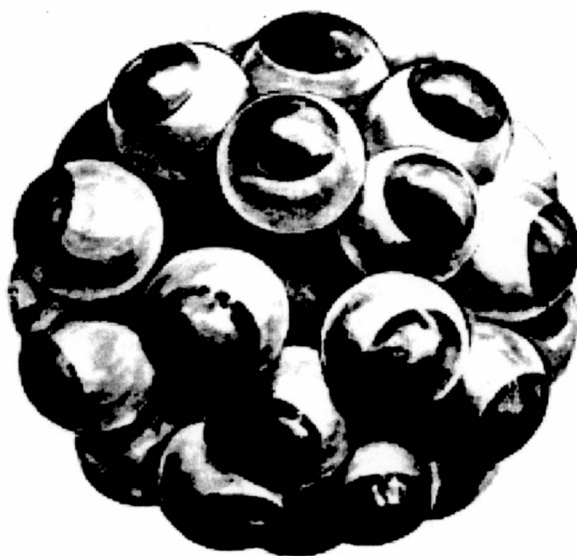


FIGURA 4: Esquema de una miscela de caseína propuesto por Slattery y Evard. Las porciones claras de las submiscelas corresponden a α s1-caseína y β -caseína, mientras que en las oscuras se encuentran los hidratos de carbono de la κ -caseína.

Los componentes monoméricos interactúan en el Aparato de Golgi de las células de la glándula mamaria, donde se forman las submiscelas. Cuando alcanzan el lumen glandular la miscela ya se encuentra formada. La función biológica de estos complejos proteicos es estabilizar una estructura que transporte proteínas y sales aptos para la nutrición.

2.2. Proteínas del suero

La fracción que permanece soluble a pH 4.6 se denomina proteínas del suero y constituyen aproximadamente el 20 % de las proteínas de la leche. Son en general proteínas globulares que pueden ser sintetizadas en la glándula mamaria o provenir del suero: β -lactoglobulina (β -Lg) (9 %) y α -lactoalbúmina (α -La) (4 %) se sintetizan en las glándulas mamarias, mientras que las inmunoglobulinas (0.6-1 g/l) (2%), albúmina bovina (0.1-0.4 g/l) (1%), y diversas enzimas son de origen sérico.

Dependiendo del método de remoción de las miscelas de caseína pueden quedar cantidades variables de caseínas en esta fracción (menor al 8%). Además restos de caseínas formados por la acción de enzimas endógenas de la leche bovina pueden estar presentes en la fracción soluble: proteosa-peptonas y caseíno macropéptido.

β -Lg: constituye el 50 % de las proteínas del suero. Es una proteína globular que presenta estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, por lo cual es resistente a la acción de proteasas e hidrólisis ácida. Esta propiedad determina que en su mayor proporción sea absorbida en el intestino en forma intacta. Sin embargo, es sensible a agentes desnaturalizantes (solventes, temperatura, presión, guanidina, urea, detergentes, etc) por lo cual pueden sufrir agregación, precipitación o coagulación. Esto alterará sus propiedades funcionales, bioquímicas y organolépticas en los productos lácteos.

Posee dos puentes disulfuro y una cisteína libre a través de la cual tiende a formar dímeros espontáneamente. Esta propiedad le permite además asociarse a las caseínas durante su calentamiento (Reddy 1988). Existe únicamente como monómero fuera del

rango de pH 3.5-7.5. La reducción de estos puentes disulfuro altera su plegamiento , pero no su inmunorreactividad (Takahashi 1990).

Pertenece a la familia de las lipocalinas, las cuales comparten en la posición 19 de su extremo N-terminal un residuo de triptofano. Esta porción presenta una estructura en forma de barril con 8-10 cadenas β antiparalelas (Flower 1996). Similares plegamientos han sido descritos en proteínas de diferentes especies animales y constituyen dominios en los cuales se han identificado epitopes alergénicos. Esta estructura terciaria le permite unir ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos de cadena larga y compuestos aromáticos, principalmente retinol (Papiz 1986). Esta podría ser la función biológica de este componente: transporte de vitaminas.

Presenta dos isoformas: β -Lg variante A y variante B. Presentan sustituciones de aminoácidos puntuales, suficientes para modificar su comportamiento alergénico (Malik 1988).

Esta proteína no es sintetizada por las glándulas mamarias de humanos.

α -La: constituye el 25 % de las proteínas del suero. Es una proteína globular que presenta 4 puentes disulfuro. Sin embargo en su forma natural se encuentra como monómero. Es el sustrato específico de la enzima galactosil-transferasa para la síntesis de la lactosa.

Presenta una estructura muy compacta y estable. Se desnaturaliza a pH ácido y bajo esta forma es capaz de unir Ca^{++} .

Su secuencia de aminoácidos presenta una alta homología (75 %) con la α -La humana (Findlay 1972).

En la tabla 2 se resumen algunas características de los principales componentes proteicos de la leche de vaca:

TABLA 2- Características de los principales componentes proteicos de la leche bovina

| Componente | PM (kDa) | pI (calculado) | Concentración (g/l) |
|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------------|
| α 1-caseína | 23.61 | 4.96 | 12-15 |
| α 2-caseína | 25.22 | 5.32 | 3-4 |
| β -caseína | 23.98 | 5.19 | 9-11 |
| κ -caseína | 19.00 | 5.64 | 3-4 |
| β -Lg | 18.36 | 5.19 | 2-4 |
| α -La | 14.17 | 5.4 | 1-1.5 |

3. Signos clínicos y mecanismos patogénicos

Los signos clínicos con que puede presentarse una alergia alimentaria son muy variados e incluso inespecíficos:

- **signos clínicos asociados a mucosas y piel:** gastrointestinales (vómitos, diarrea, cólico), cutáneos (eccema, urticaria, dermatitis, prurito), y respiratorios (tos, estornudos, rinitis, bronquitis, edema de glotis, congestión nasal, rinoconjuntivitis, asma), oculares (eritema periocular, prurito, lagrimeo).
- **reacciones generalizadas:** angioedema y shock anafiláctico.

El sistema primariamente afectado sería el gastrointestinal ya que es el órgano blanco inicial del alergeno. Los síntomas gastrointestinales (náuseas, dolor abdominal, vómitos, diarreas) originados por mecanismos IgE-dependientes constituyen el 10-15 % de los cólicos infantiles (Powell 1978), mientras que el 50 % de las diarreas inducidas por alimentos son debidas a mecanismos de hipersensibilidad contra antígenos de leche de vaca, de soja, o antígenos presentes en la leche materna. Es muy frecuente observar desde los primeros años una dermatitis atópica. Es un proceso crónico con intenso prurito, eritema, descamación de la piel y generalmente asociado con asma y rinitis alérgica que se

observa en el 30 % de los pacientes con alergia alimentaria (Sampson-Scanlong 1989). Otro proceso mediado por la IgE es la gastroenteropatía eosinofílica alérgica que se caracteriza por un infiltrado de eosinófilos en la pared intestinal, con hipereosinofilia periférica. Se caracteriza por el tiempo que tarda en remitir la sintomatología (aproximadamente 3 meses) luego de la eliminación de la dieta del alergeno sensibilizante (Powell 1978).

Las proteínas de la leche pueden originar daños en la mucosa intestinal generando una enteropatía, aunque su severidad es muy variable: desde una atrofia de las vellosidades hasta cambios leves de la mucosa. Se observa principalmente un infiltrado de linfocitos, eosinófilos, depósito de proteína básica mayor del eosinófilo, mayor índice mitótico celular (por la mayor velocidad de destrucción de los enterocitos), etc. Este daño crónico en la mucosa intestinal en general es indistinguible con el observado en otras patologías que cursan con distrofias como en la enfermedad celíaca. Luego de un desafío con un alergeno alimentario se observa un incremento en los niveles de histamina plasmática, sin incremento del número de basófilos circulantes, activación de complemento, incremento en los niveles de la proteínas catiónica del eosinófilo, etc (Suomalainen 1994). La fuente de esta histamina son principalmente los mastocitos tisulares. Pero en individuos alérgicos se observa una mayor liberación de histamina de basófilos y mastocitos por mecanismos independientes de la IgE, respecto a individuos no atópicos. El responsable de este fenómeno es el factor liberador de histamina secretado por células mononucleares. Por lo tanto en las reacciones anafilácticas adversas a alimentos juegan un rol preponderante, además de mastocitos y basófilos, células como macrófagos, células endoteliales, etc.

Se han detectado alteraciones en las funciones y secreción de citoquinas por parte de linfocitos provenientes de individuos alérgicos a leche bovina, en comparación con linfocitos de individuos normales y de pacientes con otras intolerancias alimentarias. Se han realizado estudios de proliferación y secreción de citoquinas a partir de células mononucleares de sangre de cordón, sangre periférica y de lámina propia de duodeno. La medición de citoquinas en sobrenadantes de cultivos se realizó a partir de clones T específicos aislados mediante el empleo de diferentes alérgenos y mitógenos T (Conavalina A, fitohemaglutinina). En general se observó que estas células secretan cantidades variables de IFN- γ , menores cantidades de TNF- α (Parronchi 1991, Hauer 1997, Sutas 1997,

Szepfalusi 1997, Osterlund 1999), y mayores niveles de IL 4, IL 5 e IL 10 (Ebner 1995, Hauer 1997, Sutas 1997, Szepfalusi 1997). Los clones productores de IFN- γ fueron de fenotipo CD4⁺-CD8⁻ y CD4⁻-CD8⁺, lo que indicaría que las células T CD8⁺ también cumplen un rol inmunopatogénico importante (Nakajima 1996).

En la patogenia de la alergia alimentaria no sólo intervienen mecanismos IgE-dependientes, sino que se han detectado complejos inmunes entre antígenos alimentarios y anticuerpos, células T específicas con patrones de secreción de citoquinas correspondientes a TH1, etc. Sin embargo en individuos no sensibilizados también se han identificado estos mecanismos, como en el caso del Síndrome Alérgico Oral asociado a la ingestión de frutas y vegetales. Es una urticaria de contacto que afecta la mucosa orofaríngea con prurito y edema de labios, garganta, lengua, etc (Amelot 1987).

4. Diagnóstico

La historia clínica y examen físico orientan sobre el origen de las reacciones adversas a alimentos. Datos de laboratorio y de pruebas cutáneas brindan información adicional para confirmar el diagnóstico e instaurar el tratamiento.

La pruebas empleadas actualmente para el diagnóstico de una alergia alimentaria son:

- restricción dietaria: se suprime de la dieta al alérgeno o alimento sospechoso de inducir la patología, durante 15 días o el tiempo que demore la desaparición de los signos de atopía. Luego se lo expone nuevamente al alimento en cantidades crecientes a distintos tiempos y se observa si los síntomas aparecen como consecuencia de su ingesta. Se puede producir a los minutos, horas o incluso días. Es la prueba con mayor sensibilidad y especificidad para hallar una asociación directa entre el alimento causante de las reacciones adversas y la sintomatología del paciente. Se realiza a doble ciego y con placebo.
- prueba cutánea: se emplea el prick test como prueba de screening la que de resultar positiva debe ser confirmada.

- RAST-EAST-ELISA: son las pruebas de elección para la detección de IgE sérica por su sensibilidad (se pueden lograr sensibilidades similares a la de las pruebas cutáneas), especificidad y reproducibilidad.
- Immunoblotting: brinda información sobre la especificidad de la IgE sérica. Esta información muy importante al momento de elegir el sustituto lácteo a emplear.

5. Tratamiento

Una vez establecido el diagnóstico el único método efectivo de prevención y tratamiento existente consiste en la eliminación estricta del alérgeno de la dieta y emplear sustitutos lácteos para mantener la integridad intestinal y un normal crecimiento del niño (Heyman 1988; Agata 1993; Hanifin 1991). Para llegar a esta instancia es necesaria la identificación del alérgeno responsable de la patología y del individuo susceptible, ya que un factor muy importante en la instauración de la alergia es la exposición temprana de la mucosa al alérgeno. Por lo tanto cuanto más preciso y temprano sea el diagnóstico, mejor será el pronóstico.

Al momento de iniciar el tratamiento es importante conocer qué alimentos son los adecuados para cada individuo sensibilizado. Las proteínas de la leche bovina son empleadas muy frecuentemente como aditivos en numerosos alimentos y no siempre su presencia está indicada en la etiqueta. Por otro lado se pueden encontrar componentes de la leche de vaca como adulterantes o contaminantes en numerosos alimentos.

La leche humana constituye el alimento óptimo para el recién nacido no sólo por su composición en nutrientes, sino también por la variedad de componentes (hormonas, factores de crecimiento, nucleótidos, aminoácidos, lactoferrina, citoquinas, macrófagos, granulocitos, linfocitos, inmunoglobulinas, etc.) que favorecen el crecimiento y desarrollo del niño, la maduración del sistema gastrointestinal y del sistema inmune (Jain 1991, Palkowitz 1994, Saarinen 1999). Además las células y moléculas del sistema inmune presentes en la leche materna compensan la inmadurez transitoria del sistema inmune de mucosas del intestino. Además la leche y el calostro podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la absorción de los alérgenos alimentarios a través de las inmunoglobulinas

secretorias que contienen (IgG e IgA) (Renz 1991, Strobel 1992). Además el nivel de IgA secretoria de la madre influye sobre la instauración de signos de atopía en el chico. Se ha observado que en casos en que se detectan niveles bajos de IgA secretoria materna la sintomatología en el chico es más incipiente (Soothill 1973).

El efecto preventivo de la lactancia materna en algunos casos es variable. Algunas de las causas de esta variabilidad es que en distintas madres la leche tenga distintas concentraciones de inmunoglobulinas (IgA) y de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-13) (Bottcher 2000), o a la presencia de antígenos alimentarios ingeridos por la madre y que se secretan en la leche. La leche humana carece de α -caseína y β -Lg (Restani 1999), proteínas que han sido descritas como los alérgenos mayores de la leche bovina (Docena 1996, Spuergin 1997, Restani 1999, Belloni-Businco 1999). Por lo tanto la presencia de estos antígenos en la leche humana podría constituirlos en alérgenos potenciales.

En madres con una dieta libre de leche de vaca y huevo durante el embarazo y el período de lactancia, se ha observado que el nivel de anticuerpos específicos contra componentes de la leche bovina, en especial β -lactoglobulina y α s-caseína, está marcadamente disminuido (Lovegrove 1996, Falth-Magnusson 1987). Por lo tanto constituiría el alimento hipoalérgico ideal para niños alérgicos a la leche de vaca.

El problema se presenta cuando se suspende la lactancia materna y se deben introducir alimentos sólidos. Solamente el cambio de alimentación puede desencadenar una sintomatología muy similar a una atopía (diarrea, cólicos, etc.). Por lo tanto para estos casos la detección de IgE específica resulta muy importante para un diagnóstico diferencial.

Como terapia sustitutiva en general se emplean, en primera instancia, productos lácteos de otro origen, básicamente leche de soja, ovina o caprina, o leche de vaca "maternizada" o "humanizada". En los casos que no sean efectivas se recurre a formulaciones derivadas de aminoácidos o hidrolizados proteicos.

Existen en el mercado dos tipos de hidrolizados proteicos:

- **extensivos:** se reduce marcadamente la antigenicidad de las proteínas mediante tratamientos enzimáticos agresivos; son bien tolerados por los pacientes aunque su aporte nutritivo suele alterarse y su alta osmolaridad suele ocasionar procesos diarreicos.

- **parciales:** por hidrólisis enzimática más suave se generan péptidos de mayor tamaño respecto a los antes mencionados, suelen ser efectivos aunque existen reportes en los cuales se refieren signos clínicos de atopía, incluso de anafilaxia, en individuos altamente sensibilizados por la existencia de actividad alérgica residual.

Las características inmunoquímicas y la alergenidad de estas formulaciones varían considerablemente al comparar los distintos tipos de sustitutos. La reducción de su alergenidad dependerá de la fuente proteica empleada, del grado de hidrólisis alcanzado, de la especificidad de las enzimas empleadas, de la conformación del epítopo antigénico, del procesamiento post-hidrólisis empleado para la remoción de las proteasas y restos peptídicos, etc. Además de los métodos enzimáticos se emplean procesos térmicos y de ultrafiltración para eliminar restos de componentes alérgicos.

Existen numerosos estudios de tolerancia de distintos tipos de sustitutos lácteos (leche de soja, leche ovina, hidrolizados enzimáticos, fórmulas a base de aminoácidos, etc.) por individuos atópicos a la leche bovina. No se observan resultados concluyentes acerca de cuál es el más adecuado, o menos alérgico, para incluir en el tratamiento ya que en muchos casos se observan reacciones anafilácticas (Bock 1990; Businco 1989; Ellis 1991; Halken 1993; Saylor 1991). Por métodos inmunoenzimáticos se ha detectado la presencia de IgG e IgE específicas séricas en pacientes alérgicos contra componentes de fórmulas hipoalérgicas (Isolauri 1995, Bauer 1989, Lau 1989, Pahud 1984, Rugo 1992; Wahn 1992). La causa de esta falta de tolerancia a las fórmulas lácteas podría deberse a contaminaciones con proteínas del suero o caseínas (Isolauri 1995), o a la presencia de restos peptídicos con epítopos alérgicos que no han sido adecuadamente eliminados (Restani 1995) o por un diagnóstico erróneo en cuanto a la reactividad específica de la IgE sérica.

En base a la bibliografía existente se podría concluir que los hidrolizados extensivos son los más aptos para la protección de los niños a la sensibilización con proteínas de leche.

La aplicación de la inmunoterapia requiere de mayores estudios para comprobar su efectividad ya que no todos los estudios han demostrado su eficacia en la desaparición de los síntomas, negativización de la prueba cutánea, disminución de la IgE específica o

incremento del umbral necesario para la aparición de los signos en la reexposición al alimento.

Capítulo I -Alergia a leche bovina

Objetivos específicos



Objetivos específicos

Para la alergia a proteínas de leche bovina se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar la composición proteica de leche bovina, leches de diferentes especies, e hidrolizados proteicos. Optimizar una metodología de preparación de extractos proteicos que sean aptos para su empleo en métodos de diagnóstico.
- Obtención de antisueros y anticuerpos monoclonales para su aplicación al desarrollo de métodos de diagnóstico, métodos de cuantificación de componentes antigénicos y caracterización de propiedades estructurales de los componentes de la leche bovina.
- Desarrollar y optimizar métodos inmunoenzimáticos para detección y cuantificación de IgE sérica. Desarrollo de métodos de screening y confirmatorios.
- Desarrollar y optimizar inmunoensayos para la cuantificación de proteínas de leche bovina en sustitutos empleados en el tratamiento de la patología.

Capítulo I -Alergia a leche bovina

Resultados



| | |
|--|-----|
| 1. Análisis de la composición proteica de la leche bovina y sustitutos lácteos | 94 |
| 1.1. Leche bovina | 94 |
| 1.2. Sustitutos lácteos | 95 |
| 2. Determinación de IgE total por ELISA | 99 |
| 3. Determinación de IgE específica- Caracterización de la alergenicidad de la leche bovina | 100 |
| 3.1. ELISA indirecto | 101 |
| 3.2. EAST | 102 |
| 3.3. Immunoblotting | 103 |
| 4. Determinación de IgG específica | 107 |
| 5. Aislamiento y análisis de los agregados de caseína | 107 |
| 6-.Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales | 111 |
| 7- Caracterización parcial de epitopes | 114 |
| 8. Determinación de IgE específica sérica por ELISA de captura | 116 |
| 9- Composición alérgica de sustitutos lácteos | 117 |

1. Análisis de la composición proteica de la leche bovina y sustitutos lácteos

Los extractos proteicos obtenidos a partir de leche de vaca y sustitutos lácteos fueron caracterizados en su contenido de proteínas totales, proteínas de leche bovina y proteínas alergénicas. Para tal fin se emplearon métodos de cuantificación de proteínas (Lowry, Bradford, ELISA), métodos electroforéticos (SDS-PAGE) e inmunoenzimáticos (immunoblotting, ELISA, EAST, dot blot).

1.1. Leche bovina

El contenido de proteínas totales en la leche en polvo descremada comercial, determinado por el método de Lowry o Bradford, fue de 35 g/100 g. La identificación de los principales componentes proteicos se realizó por SDS-PAGE comparando las bandas observadas en el extracto proteico obtenido de la leche con las de las distintas fracciones comerciales, proteínas purificadas y aislados proteicos. En la **figura 5** se muestran los perfiles proteicos obtenidos en condiciones desnaturalizantes no reductoras, observándose bandas con pesos moleculares relativos entre 14 kDa a mayor de 150 kDa. Las principales fracciones que se pueden identificar en base a los pesos moleculares relativos por SDS-PAGE son α ₁-caseína (23 kDa), β -caseína (25 kDa) y κ -caseínas (zona de 19 kDa), β -Lg (18 kDa), α -La (14.6 kDa) y seroalbúmina bovina (66 kDa) (**calles 1 á 7**). En las calles correspondientes a fracciones monoméricas de caseína se pueden observar bandas con PM superiores, correspondientes a agregados de caseína. En la **calle 5** se muestra la corrida electroforética correspondiente a κ -caseínas. Se pueden observar varias bandas, lo cual se debe a los distintos grados de glucosilación de este componente. En general las caseínas presentan bandas muy difusas lo que indica que se trata de fracciones heterogéneas. En base a los PM las α ₁-caseína deberían migrar más que las β -caseína bajo estas condiciones. Si embargo, esto no ocurre por la mayor fosforilación de las β -caseína que les infiere una mayor carga negativa.

Agregados de caseína fueron aislados por cromatografía y tratados con β -mercaptoetanol, ditioteritol y yodoacetamida, urea 3, 6, y 9 M. Estos tratamientos permitieron alterar parcialmente el plegamiento de estas estructuras e identificar sus componentes individuales, principalmente

unidades monoméricas de α y β caseína principalmente, y numerosas bandas correspondientes a κ -caseína (figura 5, calle 10).

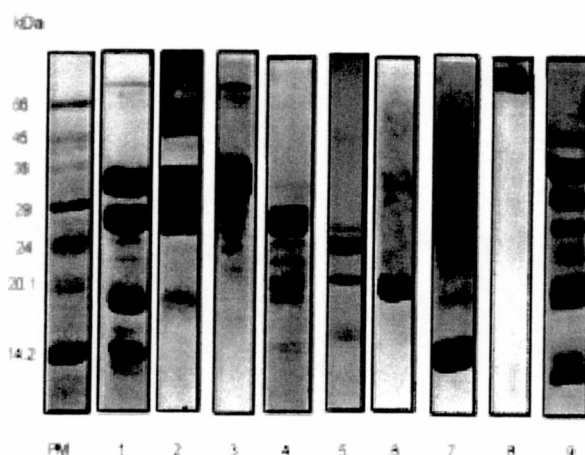


FIGURA 5: Análisis por SDS-PAGE de componentes de leche bovina: MW: marcadores de peso molecular (MW), calle 1: leche bovina descremada, calle 2: caseína comercial, calle 3: α -caseína, calle 4: β -caseína, calle 5: κ -caseína, calle 6: β -lactoglobulina, calle 7: α -lactoalbúmina, calle 8: agregados de alto PM aislado por exclusión molecular, calle 9: miscelas tratadas con urea 9 M y β -mercaptoetanol 5 %. Tinción con Coomassie Blue.

1.2. Sustitutos lácteos

Se analizó la composición proteica de leches de otras especies (oveja, cabra), de soja e hidrolizados extensivos y parciales de leche bovina y una formulación a base de aminoácidos. En la **tabla 2** se muestran los contenidos de proteínas totales determinados por el método de Lowry, y el de proteínas antigénicas, mediante la aplicación de un ELISA competitivo secuencial empleando el antisuero de conejo anti-proteínas de leche bovina.

Como puede observarse el contenido de proteínas en los extractos obtenidos a partir de leches de vaca, cabra y oveja es elevado (del orden de los mg/ml) y suficiente como para que desencadenen signos de atopía en individuos sensibilizados. En los extractos obtenidos a partir de hidrolizados proteicos se detectaron cantidades menores de proteínas, principalmente en los hidrolizados extensivos. La leche de soja comercial (Nursoy), que es un hidrolizado parcial obtenido a partir de proteínas de soja, y el extracto proteico obtenido a partir de porotos de soja tienen un contenido de proteínas del orden de los mg/ml.

TABLA 2. Cuantificación de proteínas totales y de leche bovina

| Sustituto lácteo | Proteínas totales Lowry | | Prot. De leche bovina ELISA mg/ml | Prot. ELISA/Prot. Lowry % |
|------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| | mg/ml | g/100 g producto | | |
| Leche de vaca | 5.1 | 35 | 4.73 | 92,7 |
| Leche de oveja | 20.3 | | 0.60 | 75.6 |
| Leche de cabra | 18.4 | | 0.59 | 73.9 |
| NAN HA | 1.5 | 45 | 0.80 | 53.3 |
| KAS 1000 | 3.2 | 32 | 0.18 | 5.6 |
| Pregestemil | 1.35 | 5.32 | $3.4 \cdot 10^{-4}$ | 0.025 |
| BEBA 1 HA | 1.32 | 8.80 | $3.18 \cdot 10^{-3}$ | 0.24 |
| BEBA 2 HA | 1.28 | 8.53 | 0.013 | 1.01 |
| Humana HA | 1.22 | 8.13 | $2.26 \cdot 10^{-3}$ | 0.18 |
| Aptamil HA | 0.74 | 4.93 | $9.31 \cdot 10^{-3}$ | 1,26 |
| Neocate | 5.25 | | | |
| Nursoy | 3.3 | 33.1 | 0.46 | 13.9 |
| Extr. de soja | 4.65 | | $5.46 \cdot 10^{-2}$ | 1,17 |

El ELISA de inhibición detectó cantidades menores de proteínas respecto al método de Lowry en los mismos extractos. Esto puede explicarse por la presencia de sustancias interferentes que reaccionan con el reactivo de Folin, y pueden generar valores finales de DO sobreestimados (lípidos, ácidos, guanina, xantina, etc) o subestimados (timol, glicina, ácidos, etc) respecto a los que se obtendrían con soluciones proteicas puras. Además, no todas las proteínas extraídas pueden comportarse como antígenos, por lo cual se estarían dosando en defecto por ELISA. La ventaja del empleo de un método inmunoenzimático es el bajo límite de detección alcanzado. Pueden ser cuantificadas cantidades del orden de los ng/ml. Además al emplear un antisuero obtenido contra proteínas de leche de vaca los componentes que se están cuantificando provienen de esta especie o son proteínas de otras especies que presentan epitopes de reactividad cruzada.

Esto último es lo que ocurre con las proteínas detectadas por este ensayo en las leches de cabra y de oveja. Está descrita una gran homología entre las caseínas (componentes principales) de estas especies. Para los casos de los extractos proteicos obtenidos a partir de los hidrolizados se obtuvieron valores por ELISA muy inferiores. La acción enzimática sobre las proteínas del sistema degrada a los epitopes reactivos presentes en proteínas de origen bovino. Con los hidrolizados parciales se obtuvieron concentraciones proteicas variables y esto dependerá de la fuente proteica empleada y del procedimiento aplicado. Estos resultados indican que en todos los casos existirían componentes residuales en los que los epitopes reactivos permanecen sin degradar. En el caso particular de leche de soja (proteína de origen vegetal) el dato obtenido por ELISA de inhibición puede explicarse de dos maneras: existencia de componentes proteicos de reactividad cruzada entre la soja y la leche bovina, o por la presencia de proteínas de leche bovina contaminantes o adulterantes de la leche de soja, que pudieran haber sido incorporadas durante su procesamiento industrial.

En la **figura 6** se muestran los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE para las leches de vaca, oveja y bovina. A juzgar por los PM la composición proteica es muy similar entre ellas observándose 4 fracciones principales: α y β caseínas, β -Lg y α -La.

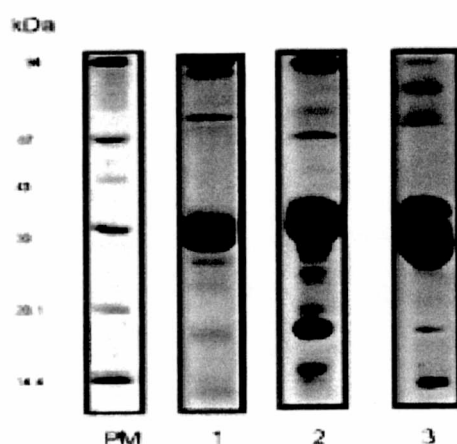


FIGURA 6: Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos de leches de diferentes especies animales. calle 1: leche bovina, calle 2: leche de cabra, calle 3: leche de oveja. Tinción con Coomassie Blue.

Como puede observarse sólo existirían diferencias cuantitativas relativas entre los componentes individuales. En todos los casos los componentes mayoritarios son las caseínas, que también tienen la propiedad de formar agregados de elevado peso molecular

En la **figura 7** se pueden observar los perfiles proteicos correspondientes a los hidrolizados de leche bovina obtenidos por SDS-PAGE. Los hidrolizados parciales contienen restos de proteínas intactas provenientes del suero y de las caseínas. En el hidrolizado NAN HA, que es un hidrolizado obtenido a partir de proteínas de suero, se detectaron además de proteínas de suero restos de α -caseína (línea 2). En el hidrolizado parcial de caseína KAS 1000 se pueden observar numerosos componentes sin procesar, mientras que en los hidrolizados extensivos el número de bandas es marcadamente inferior, por lo cual la hidrólisis enzimática y térmica a la que son sometidos sería más efectiva en la eliminación de proteínas. En la línea 7 se pueden observar una banda que por su PM corresponde a BSA. Este resultado fue confirmado mediante un immunoblotting de este extracto revelado con un antisuero anti-BSA obtenido en ratones. En este mismo extracto se observa la presencia de péptidos residuales (bandas difusas de bajo PM).

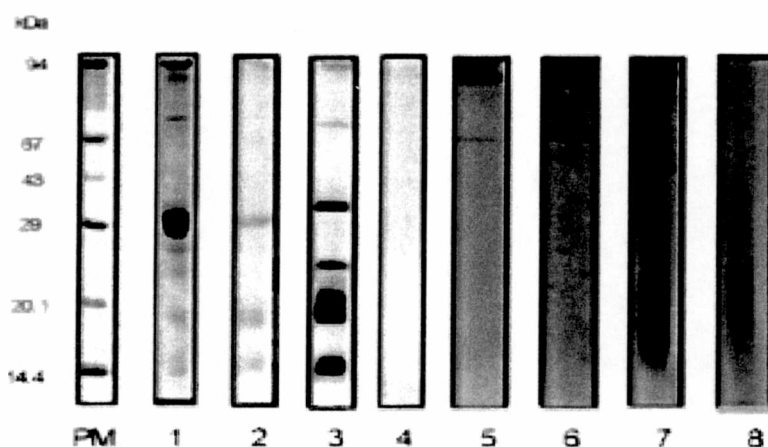


FIGURA 7: Análisis por SDS-PAGE de extractos obtenidos a partir de hidrolizados proteicos de leche bovina. PM: marcadores de pesos moleculares, calle 1: leche bovina, calle 2 : NAN HA, calle 3: KAS 1000, calle 4: Pregestemil, calle 5: BEBA 1 HA, calle 6: BEBA 2 HA, calle 7: Humana HA, calle 8: Aptamil HA.

En la **figura 8** se muestran los resultados obtenidos por SDS-PAGE correspondientes a extractos proteicos preparados a partir de distintas variedades de porotos de soja (**calles 1 á 4**). La composición proteica es muy similar entre las distintas muestras observándose bandas en las zonas de 7, 14, 16, 20-30, 37-45, 67, 70 y 94 kDa. En la **calle 5** se presenta la corrida electroforética correspondiente a extracto obtenido a partir de leche de soja comercial (Nursoy). Se pueden observar un mayor número de componentes con PM menores, los cuales serían producto de las degradación enzimática de proteínas de mayor PM.

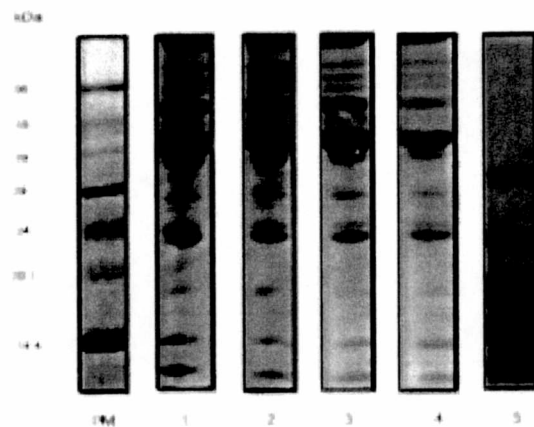


FIGURA 8: Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos obtenidos a partir de distintas variedades de soja. PM: marcadores de PM, **calle 1:** variedad Asgrow 4656, **calle 2:** Asgrow 4004, **calle 3:** Don Mario 43, **calle 4:** Caminera 32, **calle 5:** leche de soja comercial. Tinción con Coomassie blue.

2. Determinación de IgE total por ELISA

Para la determinación de los valores de IgE total en los sueros de los pacientes a analizar se desarrolló un ELISA de captura y se analizaron sueros de pacientes de distintas edades con historia clínica de atopía y de individuos normales. En base a los resultados hallados se establecieron los rangos de normalidad de los niveles de IgE total según la edad del individuo (**tabla 3**). Para la optimización del ensayo se emplearon distintas marcas de anticuerpo de captura (anti cadena ϵ humana monoclonal y policlonal), diluciones del suero, tiempo y temperaturas de

incubación y conjugados (anti cadena ϵ humana monoclonal y policlonal conjugados a peroxidasa o fosfatasa alcalina).

TABLA 3: Valores de referencia de IgE total

| Edad (años) | IgE total (U/ml) | |
|----------------|----------------------|---------------------------|
| | Atopía poco probable | Atopía altamente probable |
| 0 á 3 | menor de 10 | mayor de 30 |
| 3 á 6 | menor de 15 | mayor de 60 |
| mayor de 6 | menor de 20 | mayor de 100 |

Mediante la aplicación de este ensayo se analizaron sueros correspondientes a individuos no atópicos (60), alérgicos a leche bovina (80) y a otros alérgenos no relacionados (45). En los sueros de los individuos normales los niveles de IgE total fueron normales según la edad, mientras que con los sueros de los pacientes alérgicos (en base a las historias clínicas) se obtuvieron valores de IgE total superiores a los normales en el 92.5 % de los sueros (74/80).

3. Determinación de IgE específica- Caracterización de la alergenidad de la leche bovina

A partir de la caracterización de la composición proteica de los distintos extractos obtenidos se desarrollaron métodos inmunoenzimáticos para identificar la presencia de IgE específica en el suero de los pacientes. Se desarrollaron ensayos de screening (ELISA, EAST y dot blot) y confirmatorios (immunoblotting). En todos los casos se analizaron los resultados conjuntamente con las historias clínicas individuales.

Fueron empleadas distintas fases sólidas: plásticos con alta capacidad de pegado (ELISA), papeles de celulosa activados con bromuro de cianógeno (EAST), papeles de nitrocelulosa (dot-blot e immunoblotting).

3.1. ELISA indirecto

Para la detección de IgE específica por ELISA se desarrollaron dos tipos de ensayos:

- ELISA indirecto: la fase sólida se sensibilizó con los distintos extractos proteicos. Este ensayo detecta la presencia de IgE específica contra la totalidad de los alérgenos de cada extracto.
- ELISA de captura: la fase sólida se sensibilizó con los anticuerpos monoclonales obtenidos contra proteínas de leche bovina. Mediante este ensayo se pueden detectar especificidades individuales de IgE según las características del anticuerpo monoclonal empleado.

En ambos casos las mejores condiciones de sensibilización se obtuvieron empleando 1 μ g de proteína (antígeno o anticuerpo) por fosa (100 μ l) e incubando durante 1 hora a 37 °C o 12 horas a 4 °C. Para el ELISA indirecto la proteína en fase sólida se encuentra en exceso y no se obtienen densidades ópticas (DO) finales elevadas cuando se analizan sueros de individuos no atópicos. Es decir que los blancos obtenidos no interfieren en la interpretación de los resultados positivos. Para el caso del ELISA de captura se ensayaron distintas concentraciones de antígeno (proteínas de leche bovina) y con 10 μ g/100 μ l se alcanza la saturación del sistema. Dado que se emplearon anticuerpos monoclonales contra las caseínas de la leche bovina el antígeno a ser capturado fue tratado con urea (9M) y mercaptoetanol (5%) para disgregar las miscelas.

La capacidad de saturación de las placas de microelisa es del orden de los mg/ 100 μ l de proteína.

Posteriormente se ensayaron distintos sistemas de bloqueo: seroalbúmina bovina, gelatina, hemoglobina, Tween 20 y suero de caballo. Las menores DO se obtuvieron con suero de caballo al 5 % en buffer fosfato. Este mismo sistema se empleó para diluir los sueros y los conjugados.

Fueron analizados sueros de individuos normales no atópicos, de pacientes alérgicos a la leche bovina y a otros alérgenos no relacionados. Se probaron distintas diluciones de los mismos (suero sin diluir y diluidos 1/2, 1/4 y 1/10) obteniéndose los mejores resultados con los sueros sin diluir para el ELISA indirecto y diluido 1/2 para el ELISA de captura. En cuanto a las condiciones de tiempo-temperatura de incubación se determinó que se requiere entre 6 y 12 horas



de incubación a temperatura ambiente para obtener resultados finales de DO en la zona de mayor sensibilidad de la curva de cuantificación.

El revelado de la IgE unida al antígeno se realizó empleando distintos conjugados: anti cadena ϵ humana monoclonal o policlonal conjugados a peroxidasa o fosfatasa alcalina de distintas marcas comerciales. También se empleó el sistema de amplificación avidina-biotina para incrementar la señal final obtenida. Las mejores condiciones se obtuvieron empleando un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina durante 6 horas a temperatura ambiente para el ELISA indirecto y el sistema de amplificación anti IgE biotinilado monoclonal (2 horas a 37 °C) y estreptavidina-peroxidasa (1 hora a 37 °C) para el ELISA de captura.

3.2. EAST

Se construyó una curva dosis-respuesta empleando un “pool” de sueros con IgE específica para proteínas de leche de vaca y se la comparó con la obtenida para el sistema proteico de *Dermatophagoides*. Con las condiciones de reacción seleccionadas para ambos sistemas las curvas tienen un comportamiento similar, es decir que se observa un paralelismo entre ellas. De esta manera la cuantificación de la IgE específica para proteínas de leche bovina se obtiene interpolando la curva de *Dermatophagoides* con el valor de DO obtenido. Así se obtiene el resultado en clases.

Se analizaron los sueros correspondientes a individuos normales, alérgicos a leche de vaca y alérgicos a otros alérgenos. En ninguno de los sueros correspondientes a individuos no atópicos se detectó la presencia de IgE específica contra componentes de leche bovina (0/60), mientras que en el 100 % (180/180) de los sueros de alérgicos a leche bovina se detectó la presencia de IgE específica contra proteínas de leche de vaca. En la **tabla 4** se detallan los resultados hallados al analizar la presencia de IgE específica sérica contra componentes proteicos individuales: el 83.9 % (151/180) de los sueros mostró reactividad IgE anti-caseínas, en el 16.1 % (29/180) de los sueros se reveló la presencia de IgE específica anti β -Lg, mientras que el 6.6 % (12/180) presentó IgE anti α -La.

La especificidad de los ensayos fue evaluada mediante el empleo de sueros (45) con niveles de IgE total elevados e IgE específica para otros alérgenos (drogas, pólenes, *Dermatophagoides*, hongos, etc). En el 17.8 % de los casos (8/45) se detectó la presencia de IgE específica contra proteínas de leche.

También se ensayó un suero con IgE total superior a 20.000 UI/ml correspondiente a un Síndrome de hiper IgE que no reveló la presencia de IgE específica

TABLA 4. Análisis de IgE específica correspondiente a los sueros de los pacientes atópicos a la leche bovina.

| IgE específica Clase | % de pacientes | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| | Leche | Caseína | β -Lg | α -La |
| 4 | 32.8 (59/180) | 17.8 (32/180) | 0 | 0 |
| 3 | 63.3 (114/180) | 53.3 (96/180) | 5.0 (9/180) | 2.2 (4/180) |
| 2 | 3.9 (7/180) | 12.8 (23/180) | 6.7 (12/180) | 3.3 (6/180) |
| 1 | 0 | 0 | 4.4 (8/180) | 1.1 (2/180) |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total: | 100 (180/180) | 83.9 (151/180) | 16.1 (29/180) | 6.6 (12/180) |

Por lo tanto los resultados obtenidos mediante la aplicación de estos métodos sugieren que las caseínas se comportarían como el alérgeno principal de la leche bovina.

3.3. Immunoblotting

En la **figura 9** se presenta el análisis por immunoblotting correspondiente a leche descremada, empleada como antígeno, frente a antisuero obtenido en ratón, “pool” de sueros provenientes de pacientes alérgicos a leche bovina y “pool” de sueros de individuos no atópicos.

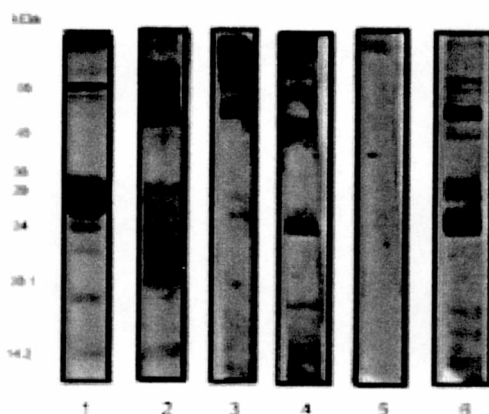


FIGURA 9: Análisis por inmunoblotting de la inmunorreactividad de componentes de leche bovina. Calle 1: SDS-PAGE del extracto proteico de leche bovina en condiciones no reductoras, **calle 2:** inmunoblotting revelado con el antisuero de conejo anti-proteínas de leche bovina, **calle 3:** IgG inmunoblotting revelado con un “pool” de sueros de pacientes atópicos, **calle 4 :** IgE inmunoblotting revelado con un “pool” de sueros de pacientes atópicos, **calle 5:** IgE inmunoblotting revelado con un “pool” de sueros de pacientes, en condiciones reductoras, **calle 6:** IgE inmunoblotting revelado con un “pool” de sueros de pacientes no atópicos.

El antisuero de conejo reveló las principales fracciones proteicas observadas por SDS-PAGE (**calle 2**), lo que confirma que fueron transferidas a la membrana de nucleoporo y que presentan un comportamiento antigénico. El “pool” de sueros positivos mostró reactividades IgG frente a agregados de caseína, fracciones monoméricas de caseína y las principales proteínas del suero, β -Lg y α -La (**calle 3**). Cuando se analizó la capacidad de las proteínas de la leche de unir IgE sérica se observó reactividad principalmente en las zonas correspondientes a los agregados de caseína de alto peso molecular (**calle 4**). Cuando la muestra se analizó en condiciones reductoras (β -mercaotoetanol 5%) se observó que una marcada disminución de las reactividades en las zonas correspondientes a los agregados de alto PM. Se observaron bandas en zonas de menor PM, principalmente en las zonas de las caseínas (**calle 5**), aunque en zonas de elevado PM se continúan observando bandas. Al analizar las proteínas separadas y transferidas con el “pool” de

sueros negativos no se detectó reactividad IgE en ningún componente proteico (**calle 6**), mientras que las zonas de las caseínas y de β -Lg fueron reconocidas por anticuerpos de isotipo IgG (**calle 7**). También se emplearon como controles negativos sueros de pacientes alérgicos a alergen no relacionados con la leche bovina y no se detectó reactividad de IgE (**calle D**).

En la **figura 10** se muestran los perfiles de reactividad para IgG e IgE obtenidos por immunoblotting para distintos sueros de pacientes alérgicos a la leche bovina. Sólo se muestran algunos immunoblottings ya que los demás sueros mostraron perfiles de reactividad similares. En las regiones de PM mayor de 200 kDa, 60-70 kDa y en las correspondientes a las fracciones de caseína se encuentran componentes capaces de unir tanto IgG como IgE. Sólo algunos sueros mostraron reactividades en las zonas de la β -Lg y la α -La.

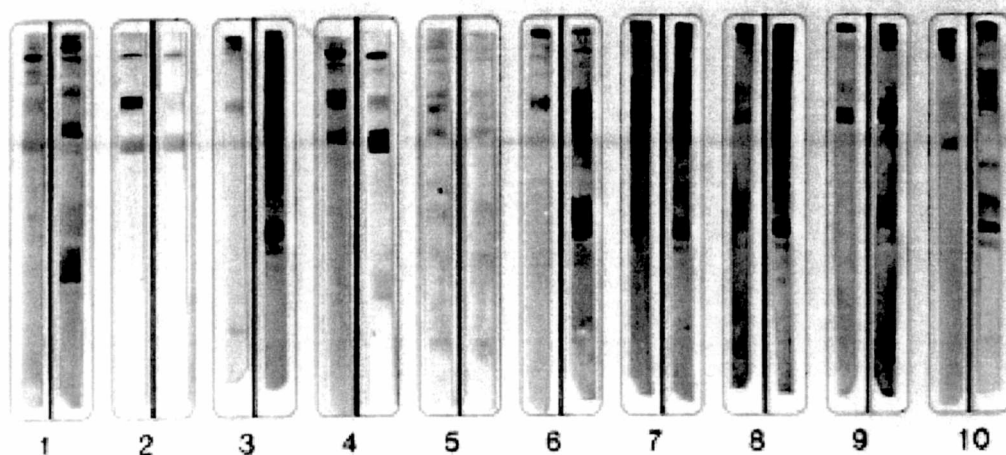


FIGURA 10: Análisis por immunoblotting correspondiente a sueros de pacientes atópicos. Immunoblots correspondientes a IgE (izquierda) e IgG (derecha) de leche descremada en condiciones no reductoras, revelados con suero de 10 pacientes atópicos representativos.

En general se observó que los perfiles de reactividad de IgG difieren de los de IgE. La reactividad para IgG se presenta principalmente en las regiones de PM (200 kDa, 60-70 kDa y fracciones de caseína, algunos sueros también revelan β -Lg o α -La. Para el caso de IgE se observa que el perfil de reactividad es muy variable entre los distintos sueros observándose

bandas en las distintas zonas. No obstante todos los sueros revelan las bandas correspondientes a los agregados de caseína. Algunos sueros muestran reactividad contra α y β caseína monoméricas (sueros 4, 7 y 8), y pocos, contra β -Lg y α -La (sueros 3 y 5). Hemos observado que la mayoría de los sueros que mostraron ELISA y EAST positivo para caseína fue capaz de reconocer a la α -caseína y β -caseína.

Estos resultados sugieren que el alérgeno principal del sistema son los agregados de caseína, aunque no permiten concluir qué componente presenta la mayor reactividad. Dado que en la zona 60-70 kDa también se observó reactividad IgE en numerosos sueros, y en esa zona se encuentra la seroalbúmina bovina (66 kDa), se realizaron immunoblotting y dot-blot con BSA revelando con el suero de ratón anti-proteínas de leche, un antisuero contra BSA obtenido en conejo, un "pool" de sueros positivos y "pool" de sueros negativos (figura 11).

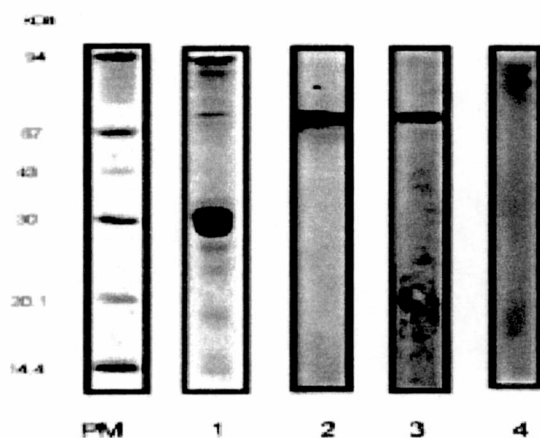


FIGURA 11: Análisis por immunoblotting de la reactividad de seroalbúmina bovina. Calle 1: SDS-PAGE del extracto de leche de vaca; calles 2 á 4 immunoblotting de BSA revelados con antisuero anti-BSA obtenido en conejo (calle 2), antisuero anti-proteínas de leche obtenido en ratón (calle 3), "pool" de sueros de pacientes atópicos a proteínas de leche o de individuos normales (calle 4).

Se observa reactividad contra la BSA con los antisueros obtenidos en ratón y en conejo (calles 2 y 3), mientras que al emplear el "pool" de sueros humanos positivos o el "pool" de sueros humanos negativos no se observó reactividad IgE en la zona correspondiente a la BSA (calle 4 reúne ambos resultados).

Por lo tanto para la detección de la IgE específica se emplearon como pruebas de screening EAST y ELISA, mientras que las pruebas confirmatorias fueron el immunoblotting y el ELISA de captura, pruebas con las que además se puede obtener información sobre las especificidades de reconocimiento.

4. Determinación de IgG específica

Se analizó la presencia de anticuerpos IgG específicos de proteínas de leche bovina por ELISA indirecto. Se halló la presencia de IgG específica en el 94 % (47/50) de los sueros provenientes de individuos normales, y en el 91.4 % (128/140) de los sueros de pacientes alérgicos a leche bovina.

Estos resultados indican la inmunogenicidad de las proteínas de leche de vaca y la imposibilidad de emplear esta prueba para diagnóstico de la patología.

5. Aislamiento y análisis de los agregados de caseína

Dado que los principales componentes de la leche de vaca capaces de unir la IgE sérica son los agregados de caseína de alto PM se aplicaron distintas metodologías para su aislamiento. La más eficiente en cuanto a rendimiento y pureza fue la cromatografía de exclusión molecular empleando como relleno Sephacryl S-300. En la **figura 12** se muestra el perfil de elución obtenido a partir de una muestra de leche descremada bovina. Las distintas fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE, constatándose que con el volumen muerto (V_m) de la columna eluyen los agregados de alto PM de caseína (pico 1). Las demás fracciones proteicas eluyen a volúmenes mayores por su menor tamaño y PM: en el pico 2 eluyen componentes con PM entre 30 y 90 kDa, agregados de menor tamaño y monómeros de caseína, mientras que en el pico 3 se pueden observar las fracciones de menor PM correspondientes a α -La y β -Lg.. En la **figura 1 calle 8** se mostró la banda correspondiente a los agregados de alto PM aislados.

La fracción en la cual se detectó la presencia de agregados de alto PM por SDS-PAGE se analizó posteriormente por cromatografía FPLC de exclusión molecular. Como puede apreciarse en la **figura 13** se obtuvo un único pico.

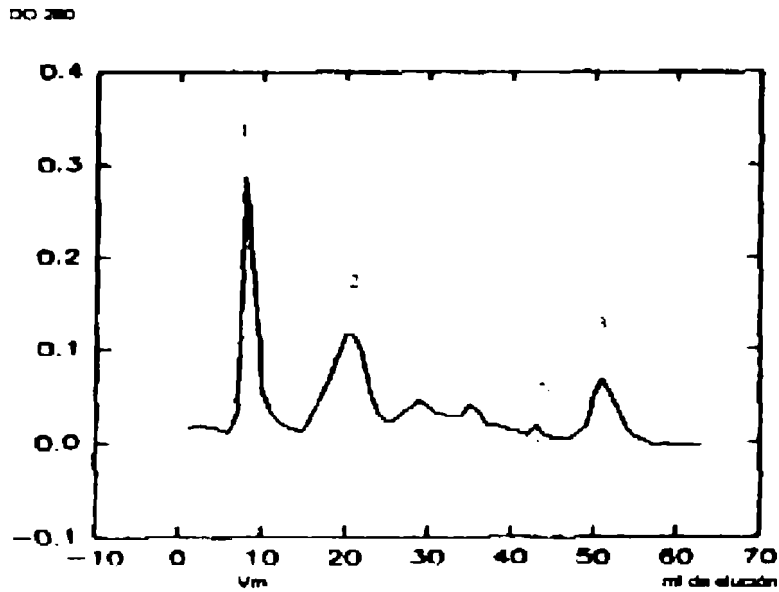


FIGURA 12: Perfil de elución correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300). Muestra: leche descremada (concentración 25 mg/ml) volumen sembrado: 17 ml). Buffer de elución: buffer fosfatos PBS pH 7.4; flujo de corrida: 24 ml/hora. V_m : volumen muerto de la columna.

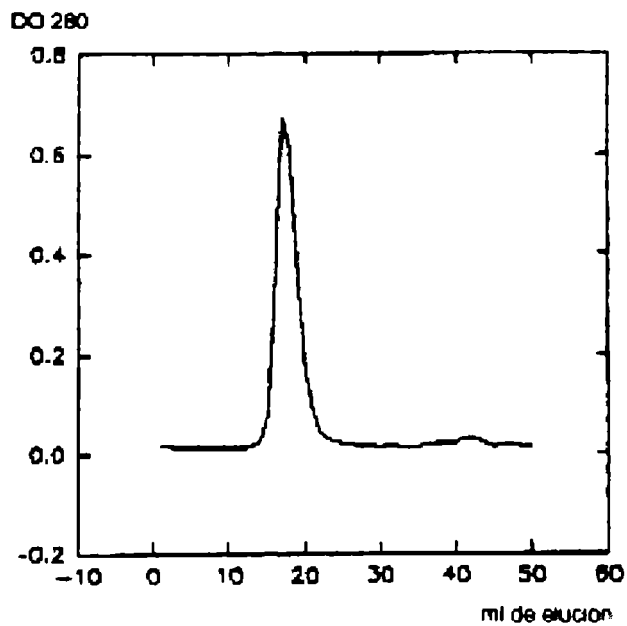


FIGURA 13: Perfil de elución de cromatografía FPLC (Sephacryl S-300) Muestra: fracción obtenida en el pico 1 de la cromatografía de exclusión molecular. Buffer de elución: buffer PBS pH 7.4; flujo de corrida: 1 ml/min.

Cuando esta fracción aislada fue tratada con β -mercaptoetanol y urea en distintas concentraciones, tiempos y temperaturas se observó que los agregados están constituidos por componentes con PM relativos correspondientes a las caseínas. Bajo estas condiciones no se logró alterar completamente la estructura de estos agregados.

La incubación en presencia de β -mercaptoetanol 5% y urea 9 M durante 12 horas a 4 °C permitió disgregar estos complejos, aunque en forma parcial. Se observa por SDS-PAGE bandas con PM relativos en las zonas de α -caseína, β -caseína y κ -caseína (figura 5 calle 9). En la figura 14 se muestran los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE al tratar a los agregados con diferentes agentes. La incubación durante 12 horas a 4°C en presencia de urea 9M y ditioneitol/yodoacetamida como agente reductor, sería la condición más energética para alterar las interacciones por las cuales los monómeros de caseína se agregan para estabilizarse. No obstante se pueden observar restos de agregados en las zonas de PM elevados.

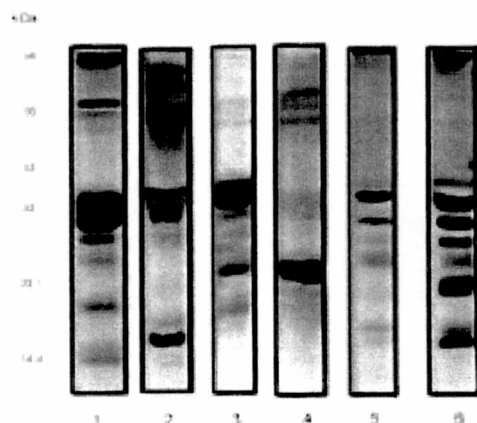


FIGURA 14 Análisis por SDS-PAGE de agregados de caseína tratados con distintos agentes caotrópicos. Calle 1: extracto de leche bovina sin tratar, calle 2: leche bovina tratada con urea 6 M, calle 3: leche bovina tratada urea 9M, calle 4: leche bovina tratada con mercaptoetanol 5 %, calle 5: leche bovina tratada con urea 9M y mercaptoetanol 5 %, calle 6: leche bovina tratada con urea 6M y ditioneitol/yodoacetamida.

En la figura 15 se muestra el perfil de elución de estos agregados tratados con urea y mercaptoetanol al aplicar una cromatografía de intercambio aniónico por FPLC (Q-Sepharosa).

En el pico 1 eluyen restos de agregados de alto PM que no fueron alterados con el tratamiento aplicado. En el pico 2 eluye κ -caseína, mientras que en el pico 3-4 se eluyen α y β -caseína, según el análisis de las fracciones eluidas por SDS-PAGE. Posteriormente se descartó la presencia de β -Lg mediante el empleo de un antisuero obtenido en ratones contra β -Lg por immunoblotting.

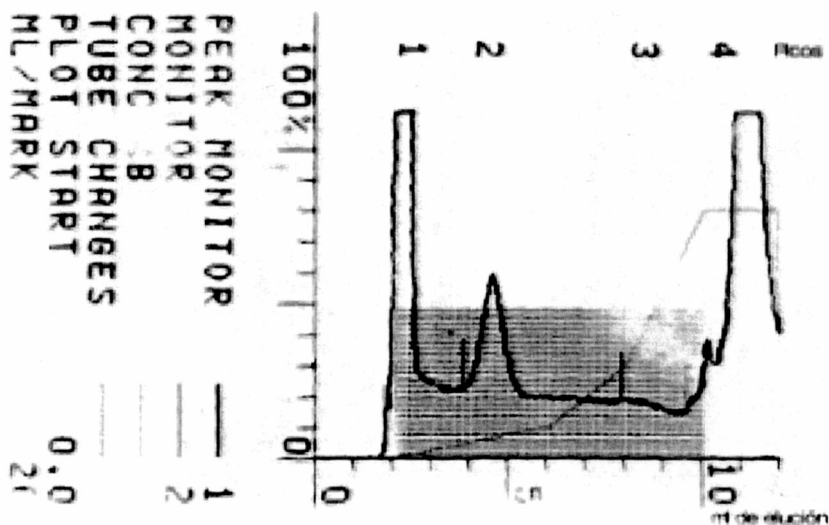


FIGURA 15: Perfil de elución correspondiente a una cromatografía por FPLC (Q-Sepharosa). Muestra: fracción aislada por exclusión molecular tratada con urea 6 M y β -mercapto-etanol 0.5%. **Buffers de elución:** A: PO_4HNa_2 0.01M, urea 6M y β -mercaptoetanol pH 8; B: PO_4HNa_2 0.01M urea 6M y β -mercaptoetanol pH 8 ClNa 1M. **Flujo de corrida:** 2 ml/min.

Cuando a estos agregados tratados con β -mercaptoetanol y urea se los enfrentó con sueros de pacientes atópicos, por la técnica de immunoblotting, se observó principalmente la presencia de bandas con PM relativos correspondientes a monómeros de caseína (**figura 16, calles 1 á 8**). La presencia de componentes del suero fue descartada (β -Lg como monómero y dímero, y α -La) mediante dot-blot de inhibición e immunoblotting de inhibición. Se empleó un suero clase 4 para RAST que por immunoblotting se determinó que reconoce caseínas y componentes del suero de la leche bovina. Como puede apreciarse la preincubación del suero con β -Lg no altera el perfil de reactividad del immunoblotting (**calle C**). Cuando se empleó como

inhibidor caseína comercial, la mayoría de las bandas disminuyen su intensidad (**calle D**), principalmente en las zonas correspondientes a α y β caseína. La capacidad de unión de los componentes de los agregados de caseína a la IgE sérica se analizó por immunoblotting empleando sueros de pacientes atópicos a la leche de vaca. En la **figura 16 (calles 1 á 8)** sólo se muestran los resultados de algunos sueros analizados. Se puede observar que en la mayoría de los casos componentes con PM entre 60 y 70 kDa, y fracciones monoméricas de α y β caseína fueron capaces de unir IgE sérica. Además se pueden observar bandas en la zona de 18-20 kDa que podrían tratarse de κ -caseína.

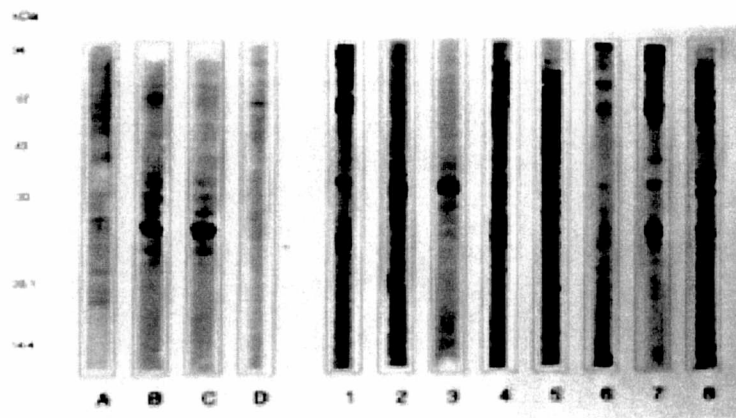


FIGURA 16: Análisis por immunoblotting de la reactividad IgE de sueros correspondientes a individuos atópicos. Calles A a D fueron reveladas con un suero RAST clase 4 para leche, enfrentado a A: leche descremada, B, C, y D: fracción de alto PM tratada con urea y mercaptoetanol; calle C corresponde al suero mencionado adsorbido con β -Lg y calle D, con caseína. Calles 1 á 8 corresponden a distintos sueros atópicos enfrentados a proteínas de la fracción de alto PM tratada con urea y β -mercaptoetanol.

6.-Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales

A partir de los ratones inmunizados con leche bovina descremada se realizó la fusión con las células NSO cuando el título de anticuerpos específicos, determinado por ELISA indirecto, fue el apropiado (entre 1/10.000 y 1/20.000). El mismo esquema de ELISA se empleó para realizar el “screening” o búsqueda de fosas en las que crecían hibridomas productores de

anticuerpos específicos. Se realizaron diversas fusiones y se seleccionaron en cada una alrededor de 20 hibridomas (con DO superiores a 2.0). Los sobrenadantes de los hibridomas crecidos fueron analizados por ELISA e inmunoblotting, empleando como antígenos leche de vaca y fracciones. Algunos hibridomas fueron congelados hasta su posterior estudio, mientras que otros fueron clonados por dilución límite. Se comprobó la monoclonalidad de los hibridomas crecidos por observación directa al microscopio y ELISA. Tres anticuerpos monoclonales fueron seleccionados para su análisis, y expandidos in vivo. A partir del líquido ascítico obtenido se aisló, por precipitación isoelectrónica, y purificó, por FPLC de intercambio iónico, cada anticuerpo monoclonal.

El análisis de la especificidad de los anticuerpos se realizó por ELISA, empleando diferentes fracciones purificadas e inmunoblotting con proteínas de leche bovina. En la **figura 17** se muestran los perfiles de reactividad correspondientes a los sobrenadantes de cultivo obtenidos por inmunoblotting. Se pueden observar reactividades en las zonas correspondientes a β -Lg (**calles 3 y 10**), caseínas y componentes de elevado PM. Entre las fracciones de caseína reconocidas se observan reactividades contra α -caseína (**calles 1,2,3,4,7,11,12,13**), β -caseína (**calles 5,6,8,9,12**), y κ -caseína (**calles 2,14**). No observamos reactividades en las zonas de α -lactoalbúmina y seroalbúmina.

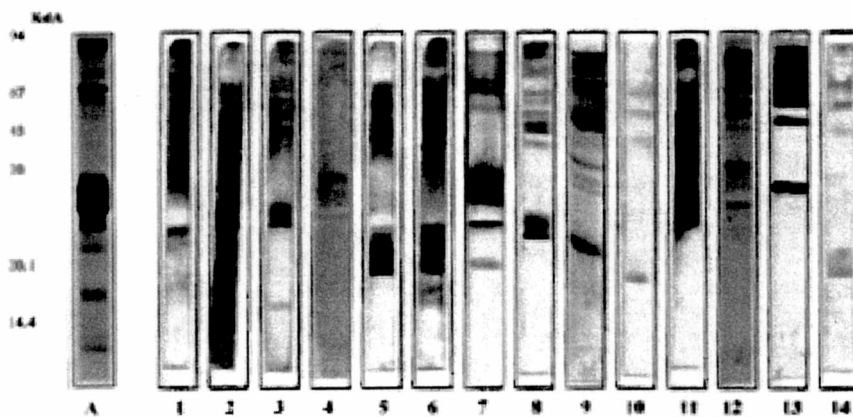


FIGURA 17. Análisis por inmunoblotting de los sobrenadantes correspondientes a los hibridomas seleccionados. Calle A: SDS-PAGE del extracto antigénico de leche bovina empleado; calles 2 a 14: inmunoblottings de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas.

De los anticuerpos clonados se seleccionaron 3 que reconocen: α s-caseína, β -caseína y κ -caseína (alergenos mayores de la leche bovina según nuestros resultados).

Debido a que estos monómeros de caseína forman agregados de distinto peso molecular, y las caseínas comparten numerosos epitopes, se obtuvieron perfiles de reactividad por inmunoblotting muy complejos. Por otro lado el análisis de sus especificidades por ELISA indirecto empleando fracciones comerciales también resultó dificultoso, por las impurezas presentes en estas fracciones.

La purificación de componentes proteicos a partir de leche bovina se realizó por electroelución a partir de electroforesis SDS-PAGE preparativas. Los componentes aislados fueron empleados en dot-blot y ELISA indirecto. Estos ensayos junto al inmunoblotting, empleando como antígeno miscelas de caseína tratadas con urea y ditiotretol/iodoacetamida, permitieron establecer la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales seleccionados (**figura 18**). Mediante estas técnicas se determinó que el anticuerpo monoclonal denominado **1D5-I** reconoce α -caseína, el **2A1-I** reconoce β -caseína y el **3B5-I** reconoce κ -caseína.

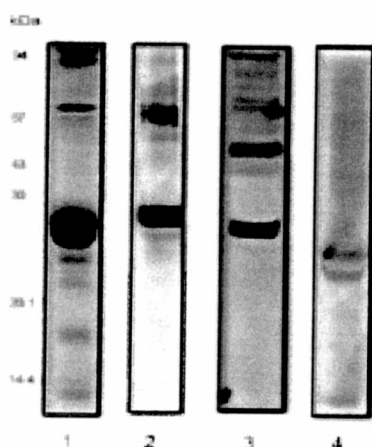


FIGURA 18: Análisis por inmunoblotting de la especificidad de los anticuerpos monoclonales clonados. Calle 1: extracto proteico de leche bovina (SDS-PAGE), calles 2 á 4: inmunoblotting de miscelas de caseínas tratadas con urea-ditiotretol revelados con los anticuerpos monoclonales. Calle 2: 1D5-I, calle 3: 2A1-I, calle 4: 3B5-I.

La determinación del isotipo de cada uno de los anticuerpos monoclonales se realizó por ELISA de captura y precipitación en medios gelosados empleando antisueros anti-isotipo de ratón obtenidos en cabra. En la **figura 19** se muestran las bandas de precipitación obtenidas por inmunodifusión doble en gel de agarosa. Como se puede observar los 3 anticuerpos están constituidos por cadena pesada de isotipo γ_1 . El mismo resultado se obtuvo por ELISA de captura (resultado no mostrado).

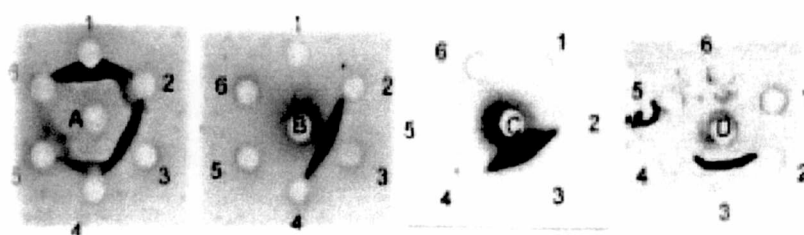


FIGURA 19. Doble inmunodifusión radial (Ouchterlony). 1: antisuero a-IgG2a, 2: antisuero a-IgG2b, 3: antisuero a-IgG1, 4: antisuero a-IgG3, 5: antisuero a-IgG3 (2x), 6: sin sembrar. A: suero de ratón, B: 1D5-I, C: 2A1-I, D: 3B5-I

7- Caracterización parcial de epitopes

Con el fin de estudiar el tipo de interacciones que se producen entre los monómeros de caseína para formar las miscelas, se analizó la variación en la reactividad de los anticuerpos monoclonales por inmunoblotting empleando extractos de leche bovina y miscelas de caseína (aisladas por cromatografía de exclusión a partir de leche bovina) sometidos a distintos tratamientos con agentes caotrópicos para alterar su conformación. Se empleó: ditiotreitól 10 mM y iodoacetamida 25 mM, mercaptoetanol 5%, mercaptoetanol 5% y urea 3M, 6M o 9M (**figura 20**). Se pudo observar que a pesar de los tratamiento aplicados no se logró alterar completamente la formación de los agregados. Asimismo, las variaciones observadas en los perfiles de reactividad antes y después de cada tratamiento indicarían la importancia de los enlaces disulfuro e hidrofóbicos en la estabilización de estas estructuras supramoleculares.

Estos mismos resultados fueron obtenidos al revelar los inmunoblotting con sueros de pacientes alérgicos, lo cual indicaría la antigenicidad y alergenidad de los epitopes reconocidos

en las caseínas. Además el hecho que los epitopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales mantienen su reactividad al tratar en forma energética a los agregados de caseína, indica la estabilidad conformacional de estas estructuras, no pudiendo concluir si se trata de epitopes conformacionales o secuenciales.

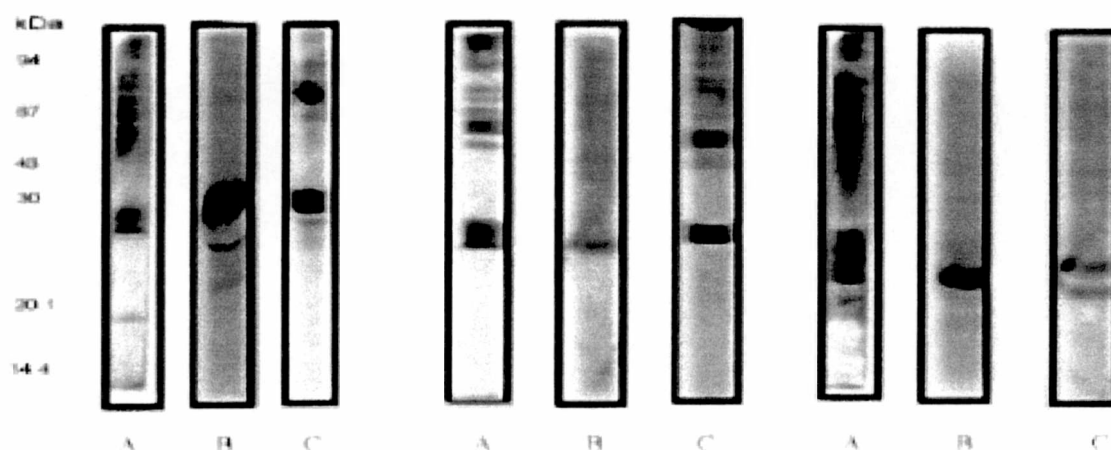


FIGURA 20: Análisis por inmunoblotting de miscelas de caseína sometidas a distintos tratamientos químicos. Calles A: extracto proteico de leche bovina revelados con un antisuero policlonal y los anticuerpos monoclonales contra leche bovina 1D5-I, 2A1-I y 3B5-I, **calles B:** extracto de leche tratado con mercaptoetanol y urea revelados con los anticuerpos monoclonales, **calles C:** extracto de leche tratado con urea y ditioneitol-yodoacetamida revelados con los anticuerpos monoclonales.

Para confirmar que el anticuerpo 3B5-I no reconoce en la κ -caseína hidratos de carbono, éstos fueron oxidados empleando peryodato de sodio como fue anteriormente descrito. Se emplearon como muestras κ -caseína comercial, agregados de caseína y leche descremada, previamente tratados con urea y mercaptoetanol. Posteriormente se revelaron los inmunoblotting con el anticuerpo monoclonal y se observó que perfiles de reactividad no se modificaron con respecto a los inmunoblotting de las muestras sin oxidar. En la **figura 21** se muestran los inmunoblotting correspondientes a leche descremada tratada con urea y mercaptoetanol. Estos resultados indicaría que el epitope reconocido no contiene hidratos de carbono.

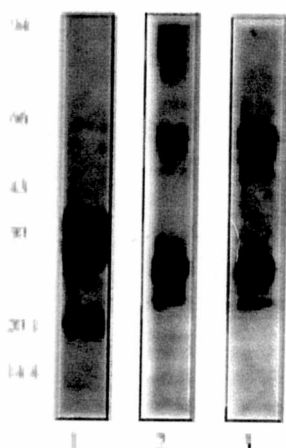


FIGURA 21: Immunoblottings de leche bovina tratada con urea y mercaptoetanol revelados con 3B5-I. Calle 1: SDS-PAGE de la muestra de leche-urea-mercaptoetanol, calle 2: immunoblotting de la muestra sin tratar, calle 3 : immunoblotting de la muestra tratada con peryodato de sodio

8. Determinación de IgE específica sérica por ELISA de captura

Los sueros positivos para leche de vaca por EAST, ELISA e immunoblotting fueron analizados por ELISA de captura empleando los 3 anticuerpos monoclonales descriptos.

En el 73 % de los sueros se detectó la presencia de IgE específica que reconoce α s-caseína, mientras que β -caseína fue reconocida por el 69 % y κ -caseína, por el 40 % los sueros provenientes de pacientes alérgicos a la leche bovina.

De los sueros que fueron reactivos contra caseína el 100 % reconoció α s-caseína. Sólo el 40 % reconoció únicamente a este alergeno, mientras que el 80 % reconoció α s- y β -caseína, y el 40 % mostró reactividad contra α s-, β - y κ -caseína.

Estos resultados también sugieren que las caseínas constituyen el alergeno principal del sistema, siendo α s-caseína el componente mayormente reconocido por los sueros de los pacientes alérgicos.

9- Composición alérgica de sustitutos lácteos

Se analizó el contenido de componentes alérgicos en diversos sustitutos lácteos empleados en el tratamiento de la patología. La detección e identificación de proteínas capaces de unir IgE sérica proveniente de pacientes con alergia a la leche bovina fue realizada por dot-blot, ELISA, EAST e immunoblotting.

En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos por EAST empleando sueros clase 3 o mayor para leche de vaca. A pesar de desconocer si los pacientes de los cuales provienen los sueros se encontraban en tratamiento la reactividad detectada indica la presencia de proteínas acopladas a la fase sólida capaces de unir IgE. Se puede observar que cada suero reconoce con distinta intensidad a las proteínas de cada extracto. Estos resultados indicarían además la existencia de anticuerpos IgE con diferente especificidad y/o afinidad en cada paciente, situación que este tipo de ensayo no permite resolver. Tampoco se puede discernir sobre la identidad de las proteínas que contienen a los epitopes reconocidos por la IgE, o si se trata de proteínas intactas o residuales, que fueron clivadas por el tratamiento enzimático aplicado a la leche bovina.

En los casos de las leches de cabra y oveja estos resultados no nos permiten afirmar si las reactividades observadas corresponden a reacciones de identidad (pacientes sensibilizados con proteínas de estas especies) o a reacciones cruzadas (pacientes no tratados con leche de cabra u oveja). Lo mismo ocurre con la reactividad observada para la leche de soja. No se puede concluir si el reconocimiento es debido a anticuerpos IgE específicos de proteínas de soja, o se debe a la presencia de anticuerpos anti-proteínas de leche bovina que reconocen componentes presentes en la soja y que dan reactividad cruzada con proteínas de origen bovino. Dado que se trata del sustituto lácteo más empleado en nuestro medio la reactividad observada podría deberse a la presencia de anticuerpos específicos contra componentes de soja, es decir que el individuo alérgico se pudo haber sensibilizado con proteínas de soja. De todas formas estos resultados indican que la soja contiene componentes capaces de unir a la IgE sérica de pacientes alérgicos.

TABLA 4. Detección de IgE específica en el suero de pacientes alérgicos por EAST

| Muestras | IgE específica (clase) | | | | | |
|-------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | "Pool" de sueros positivos | Suero 1 | Suero 2 | Suero 3 | Suero 4 | Suero 5 |
| L bovina | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 4 |
| L ovina | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 |
| L. caprina | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| NAN HA | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| KAS 1000 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| Pregestemil | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| BEBA HA 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BEBA HA 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Humana HA | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Aptamil HA | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| L. de soja | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Neocate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Por lo tanto, y dado que este ensayo sólo permite detectar reactividad de IgE sérica, se realizó inmunoblotting empleando como antígenos a los distintos extractos proteicos

En la **figura 22** se muestran los perfiles de reactividad revelados con el antisuero obtenido en conejo contra proteínas de leche bovina.

Los extractos de leche de oveja y cabra muestran reactividades muy similares a la leche bovina, lo cual indica la gran homología existente entre los componentes proteicos de la leche de las distintas especies animales (**líneas 1, 2 y 3**). El antisuero reconoce componentes antigénicos del suero y caseínas. El hidrolizado parcial de proteínas de suero NAN HA muestra reactividad en las zonas con PM correspondientes a agregados de alto PM, caseínas y β -Lg (**línea 4**) lo cual indica que este hidrolizado de proteínas del suero contiene componentes sin procesar, del suero y caseínas. En la **línea 5** se muestra la reactividad del antisuero frente al hidrolizado parcial de caseína KAS 1000. También se pueden observar componentes con PM correspondientes a las caseínas intactas, que mantienen su capacidad de formar agregados. Los hidrolizados BEBA HA 1 y 2 muestran bandas en las zonas correspondientes a caseínas y agregados de 45-70 kDa

aproximadamente (líneas 7 y 8); Pregestemil, Humana y Aptamil no revelaron la presencia de componentes antigénicos residuales (líneas 6, 9 y 10). Por lo tanto estos resultados indicarían la presencia de componentes sin degradar, componentes contaminantes (caseínas en hidrolizados de proteínas del suero y viceversa), y residuos peptídicos que contienen epitopes inmunorreactivos.

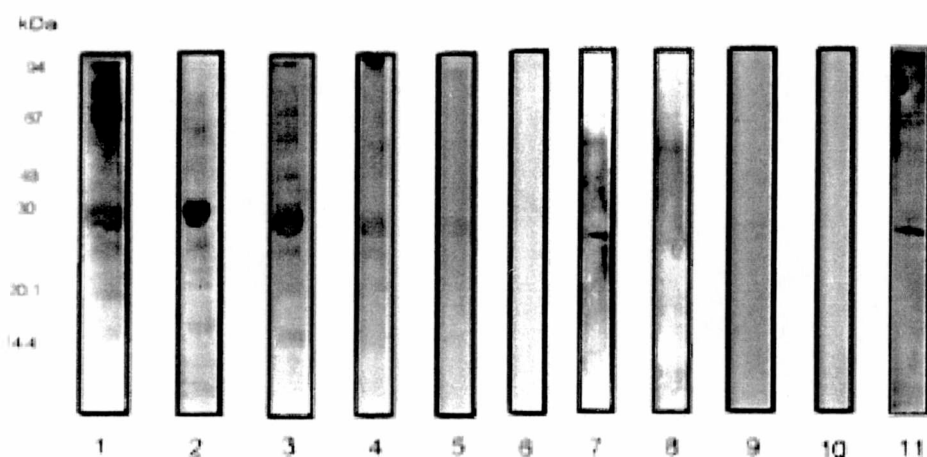


FIGURA 22: Análisis por inmunoblotting de la reactividad del antisuero contra proteínas de leche bovina frente a los diferentes sustitutos lácteos.

Calle 1: leche bovina, **calle 2:** leche ovina, **calle 3:** leche caprina, **calle 4:** NAN HA, **calle 5:** KAS 1000, **calle 6:** Pregestemil, **calle 7:** BEBA 1 HA, **calle 8:** BEBA 2 HA, **calle 9:** Humana, **calle 10:** Aptamil, **calle 11:** soja.

En la **figura 23** se muestran los perfiles de reactividad IgE obtenidos por inmunoblotting empleando un “pool” de sueros provenientes de individuos alérgicos a la leche bovina. Las reactividades observadas con los extractos de las leches de vaca, oveja y cabra son muy similares, reconociéndose componentes del suero, caseínas y agregados de caseínas capaces de unir a la IgE con los sueros empleados (líneas 1, 2 y 3). Los hidrolizados parciales de suero (línea 4) y de caseína (línea 5) muestran reactividad IgE en las zonas de las caseínas. Por lo tanto NAN HA no contiene restos de β -Lg capaz de unir IgE. Se descartó la posibilidad de que la banda observada a la zona de 35-40 kDa se tratara de dímeros de β -Lg revelando con un antisuero obtenido en ratones inmunizados con β -Lg (resultado no mostrado). KAS 1000 contiene restos de caseína sin hidrolizar que son reconocidos por la IgE y además presenta bandas muy difusas en la zona de PM inferior a 30 kDa que correspondería a componentes peptídicos de degradación. Los

extractos obtenidos a partir de los hidrolizados extensivos (líneas 6-10) no revelan reactividades IgE, por lo cual se podría concluir que se han destruido los epitopes alérgicos.

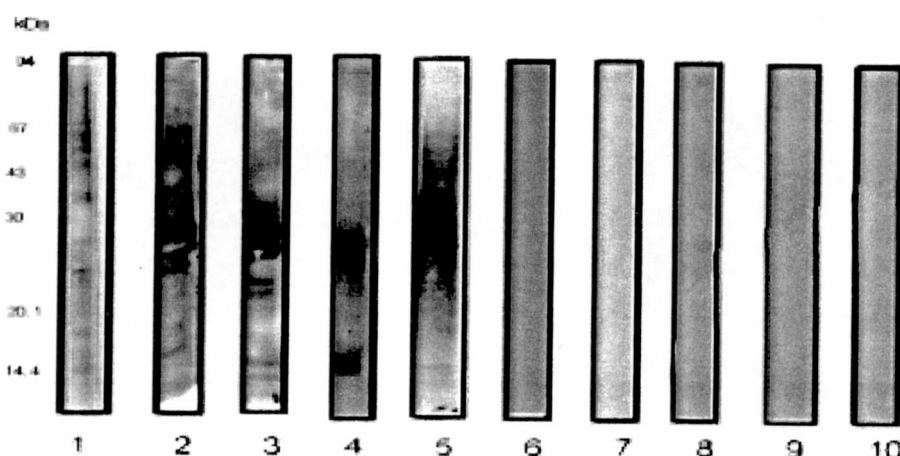


FIGURA 23: Análisis por inmunoblotting de la reactividad IgE frente a diferentes sustitutos lácteos. Calle 1: leche bovina, calle 2: leche ovina, calle 3: leche caprina, calle 4: NAN HA, calle 5: KAS 1000, calle 6: Pregestemil, calle 7: BEBA 1 HA, calle 8: BEBA 2 HA, calle 9: Humana, calle 10: Aptamil.

En las **figuras 24, 25 y 26** se muestran los resultados del análisis de la reactividad de los componentes proteicos presentes en los diferentes sustitutos al enfrentarlos a los anticuerpos monoclonales por inmunoblotting.

El anticuerpo **1D5-I** reconoce α s-caseína en vaca, cabra y oveja, pero además reconoce un componente de aproximadamente 14 kDa en las leches de cabra y oveja (**figura 24**). Podría tratarse de un componente degradado de la α s-caseína y que contiene a los epitopes inmunorreactivos compartidos con la α s-caseína bovina (**calles 2 y 3**). En la **calle 4** correspondiente a la NAN HA se puede observar bandas en la zona de la α s-caseína y en la zona de 14 kDa, que serían componentes de degradación a partir de α s-caseína, contaminantes del hidrolizado de proteínas del suero. Con el extracto de KAS 1000 se observan reactividades en la zona de α -caseína y de PM menores, que podrían tratarse también de péptidos derivados de la hidrólisis de este componente. En los casos de los hidrolizados extensivos, no se observaron reactividades por lo cual el epítopo reconocido por este anticuerpo habría sido degradado.

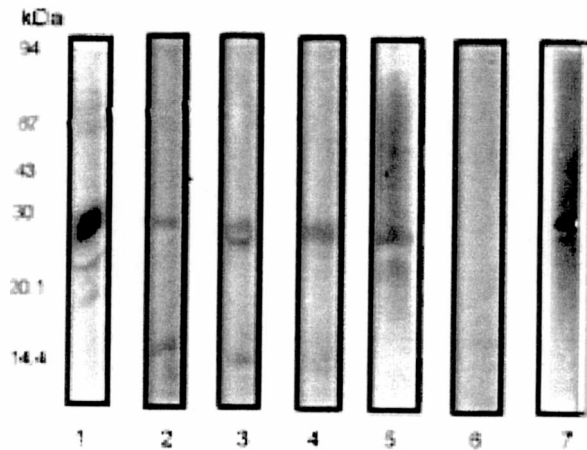


FIGURA 24: Análisis por inmunoblotting de la reactividad del anticuerpo monoclonal 1D5-I frente a diferentes sustitutos lácteos. Calle 1: leche bovina, calle 2: leche ovina, calle 3: leche caprina, calle 4: NAN HA, calle 5: KAS 1000, calle 6: Pregestimil, BEBA 1 HA, BEBA 2 HA, Humana o Aptamil, calle 7: extracto de proteínas de soja.

En la figura 25 se muestra el inmunoblotting revelado con el anticuerpo 2A1-I.

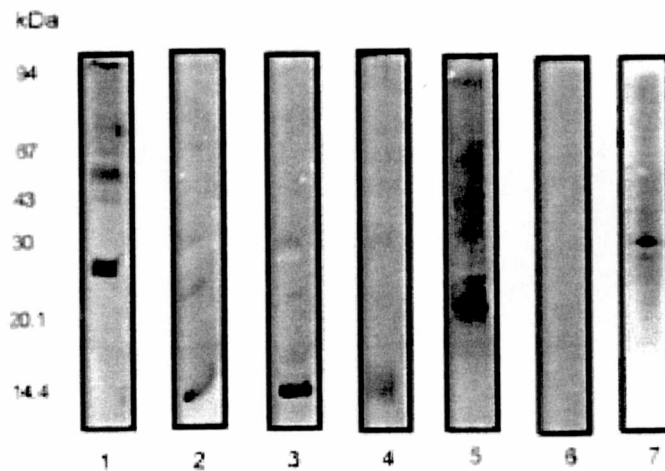


FIGURA 25: Análisis por inmunoblotting de la reactividad del anticuerpo monoclonal 2A1-I frente a diferentes sustitutos lácteos. Calle 1: leche bovina, calle 2: leche ovina, calle 3: leche caprina, calle 4: NAN HA, calle 5: KAS 1000, calle 6: Pregestimil, BEBA 1 HA, BEBA 2 HA, Humana o Aptamil, calle 7: extracto de proteínas de soja.

Puede observarse que este anticuerpo monoclonal reconoce epitopes presentes en β -caseína de leche bovina, ovina y caprina. En la leche de oveja reconoce además componentes con PM menores, mientras que la leche de cabra contiene proteínas con PM en las zonas de 14 y 18 kDa capaces de ser reconocidas por este anticuerpo. Se trataría de componentes de degradación provenientes de la β -caseína. En NAN HA se observan bandas en las zonas de β -caseína, agregados de alto PM y de 14 kDa, que serían restos contaminantes de caseínas; con el extracto de KAS 1000 se observan numerosas bandas en zonas de agregados de elevado PM, β -caseína y PM menores lo cual indicaría la deficiente degradación enzimática de este componente proteico. Con los demás hidrolizados no se observan reactividades, resultado que indicaría la destrucción de los epitopes reactivos.

El resultado obtenido empleando el anticuerpo monoclonal 3B5-I, que reconoce κ -caseína es mostrado en la **figura 26**.

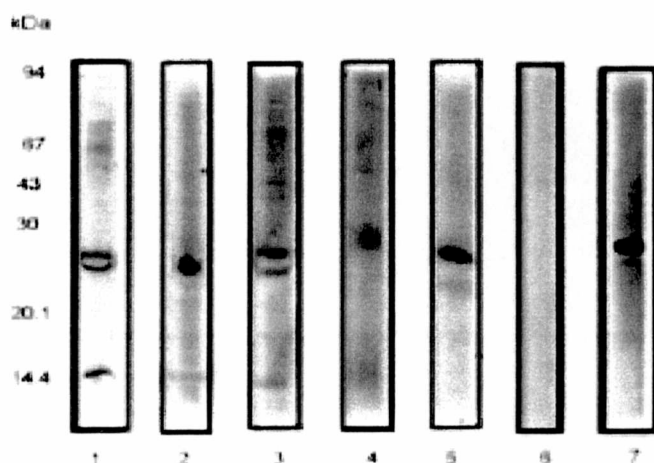


FIGURA 26: Análisis por inmunoblotting de la reactividad del anticuerpo monoclonal 3B5-I frente a diferentes sustitutos lácteos. Calle 1: leche bovina, calle 2: leche ovina, calle 3: leche caprina, calle 4: NAN HA, calle 5: KAS 1000, calle 6: Pregestimil, BEBA 1 HA, BEBA 2 HA, Humana o Aptamil, calle 7: extracto de proteínas de soja.

En las leche de vaca, oveja y cabra reconoce componentes con PM elevados, de 18 kDa y de menor PM, correspondientes a los agregados de alto peso molecular que contienen κ -caseína y a la κ -caseína nativas. Estos componentes también son reconocidos en los extractos obtenidos a partir de NAN HA y KAS 1000, mientras que en los otros hidrolizados no se visualizan bandas.

Por lo tanto el empleo de estos anticuerpos monoclonales también reveló la presencia de componentes de reactividad cruzada entre las leche de vaca, oveja y cabra; la presencia de componentes de caseína nativos en hidrolizados parciales de proteínas de suero o de caseína, que mantienen la capacidad de agregarse; la presencia de proteínas contaminantes (hidrolizados de proteínas de suero contienen caseínas); y la ausencia de epitopes reactivos en los hidrolizados extensivos analizados. Las bandas de PM aproximado de 14 kDa o menor frecuentemente observadas podrían corresponderse a diversos componentes de degradación, provenientes principalmente de la caseína, que migran con el frente de corrida durante la electroforesis.

En la **figura 27** se muestran los resultados del análisis por immunoblotting de los extractos proteicos obtenidos a partir de los porotos de soja revelados con el antisuero de conejo, los anticuerpos monoclonales y el “pool” de sueros de pacientes alérgicos. Como puede observarse un componente de 30 kDa de PM es reconocido por los 3 anticuerpos monoclonales (se muestra uno solo de ellos en la **calle 4**), por el antisuero en conejo (**calle 3**) y por el “pool” de sueros humanos empleados (**calle 5**). En este último caso además se observan reactividades para PM mayores.

A partir de los resultados obtenidos mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales y el antisuero concluiríamos que la proteína de soja mencionada presenta epitopes que dan reactividad cruzada con proteínas de origen bovina, caseínas. Además este componente presenta propiedades alérgicas ya que es capaz de unir IgE sérica. En este caso las demás reactividades obtenidas podrían deberse a la presencia de anticuerpos específicos provenientes de individuos sensibilizados a proteínas de soja.

Dado que existiría la posibilidad que estos anticuerpos estuvieran reaccionando contra proteínas de leche presentes como contaminantes en fórmulas comerciales obtenidas a partir de soja, se realizaron los immunoblotting empleando como fuente proteica porotos de soja

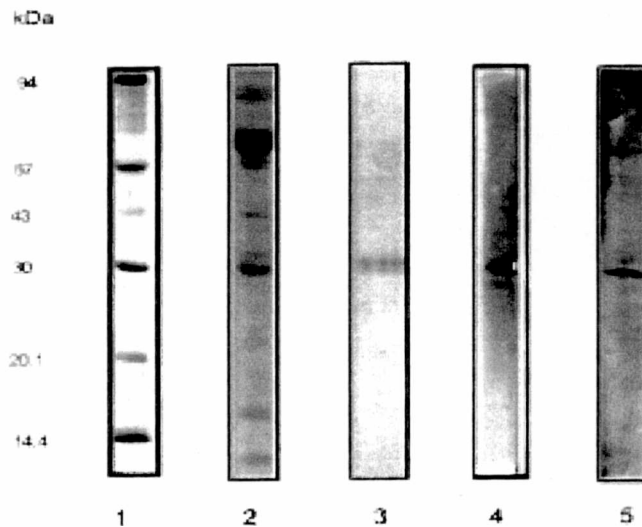


FIGURA 27: Análisis por inmunoblotting de la antigenicidad y alergenicidad de proteínas de soja. Calle 1: marcadores de PM, calle 2: SDS-PAGE de extracto proteico de leche de soja, calle 3: inmunoblotting con suero de conejo anti leche bovina, calle 4: inmunoblotting con anticuerpos monoclonales contra leche bovina (1D5-I, 2A1-I, 3B5-I), calle 5: inmunoblotting con un “pool” de sueros de pacientes alérgicos a leche bovina.

En conclusión, mediante el empleo de EAST se pudo detectar actividad alérgica total en todos los extractos proteicos obtenidos a partir de los sustitutos lácteos analizados, excepto para la formulación a base de aminoácidos. Posteriormente, y empleando inmunoblotting, se pudieron identificar componentes individuales antigénicos y alérgicos, componentes residuales y contaminantes en hidrolizados parciales, componentes de reactividad cruzada en extractos proteicos provenientes de distintas especies, y no fue posible detectar componentes alérgicos en la fórmula a base de aminoácidos o en hidrolizados extensivos. En este último caso sólo por EAST fue posible detectar reactividad IgE, lo cual indicaría que a pesar de estar compuestos por péptidos muy pequeños, el tamaño es suficiente como para contener epitopes. También podría deberse a una mayor sensibilidad del EAST o a un efecto de dilución de los anticuerpos específicos en el “pool”.

La reactividad alérgica *in vivo* de los sustitutos no se ensayó por la escasa edad de los pacientes de los cuales se obtuvieron los sueros, y porque además no tenemos un parámetro para evaluar *a priori* el poder alérgico de los mismos de manera de evaluar posibles riesgos al realizar la prueba cutánea. Por lo tanto sólo se contrastaron los resultados obtenidos mediante la aplicación de pruebas *in vitro* con las historias clínicas de cada paciente.

Tampoco se realizó supresión dietaria y reto alimentario por la imposibilidad de seguimiento de los pacientes.

Capítulo I -Alergia a leche bovina

Discusión



- **Caracterización de la composición proteica de leche bovina, leches de diferentes especies, e hidrolizados proteicos. Optimización de una metodología de preparación de extractos proteicos que sean aptos para su empleo en pruebas cutáneas y métodos inmunoenzimáticos de diagnóstico.**

Se han identificado los principales componentes proteicos de la leche de vaca a partir de técnicas electroforéticas (SDS-PAGE, dot-blot e immunoblotting) y cromatográficas (FPLC de intercambio iónico) empleando leche bovina, aislados proteicos y fracciones comerciales purificadas. Los extractos proteicos se prepararon por extracción con buffers acuosos (buffers fosfatos pH 7.4) y se trataron con cloroformo para la eliminación de los lípidos interferentes. Para la separación e identificación de componentes proteicos se emplearon geles de poliacrilamida al 12.5 %.

Para la cuantificación de proteínas totales se aplicaron métodos colorimétricos (Bradford y Lowry), mientras que el contenido de proteínas de leche bovina se determinó mediante la aplicación de un método inmunoenzimático. La alergenicidad de estas proteínas se analizó por EAST, ELISA e immunoblotting empleando sueros de pacientes alérgicos a la leche bovina.

Actualmente los sustitutos más empleados para el tratamiento son los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de la soja y de leche bovina. Sin embargo existen evidencias que indican que un 10-20 % de los chicos alérgicos a la leche de vaca no toleran los hidrolizados de soja (Businco 1992, Whittington 1977, Perkkio 1981) y en otros casos se han descrito reacciones anafilácticas producidas por la ingestión de hidrolizados extensivos de proteínas de leche de vaca (Businco 1989, Saylor 1991, Sampson 1992).

Mediante el ELISA competitivo hemos detectado reactividades en leches de otras especies y en hidrolizados parciales y extensivos de leche bovina, lo cual indicaría la presencia de epitopes de reactividad cruzada y de restos de proteínas antigénicas sin degradar, que en un individuo sensibilizado podrían desencadenar reacciones alérgicas. El empleo de EAST permitió detectar reactividad IgE en todos los sustitutos analizados, excepto en la formulación a base de aminoácidos. Sin embargo, mediante el immunoblotting, se detectaron componentes proteicos peptídicos con capacidad de unión a la IgE sérica en leches de otras especies y en hidrolizados

parciales. Los hidrolizados extensivos contienen epitopes reactivos con capacidad antigénica y alérgica, en componentes peptídicos cuyo PM no permite visualizarlos por esta técnica.

Los resultados hallados mediante el empleo de distintos métodos inmunoenzimáticos indicarían una posible reactividad cruzada entre componentes proteicos presentes en extractos obtenidos a partir de soja y caseína de origen bovina. En los sueros de pacientes alérgicos a la leche bovina se detectó la presencia de anticuerpos de isotipo IgG e IgE capaces de unir una proteína de 30 kDa proveniente de la soja. Estos resultados no confirmarían una reactividad cruzada entre ambos sistemas dado que no contamos con la certeza que estos pacientes no han sido tratados con proteínas de soja. Sólo las reactividades observadas con el antisuero obtenido en conejos inmunizados con leche de vaca, y con los anticuerpos monoclonales específicos de caseínas de leche bovina, nos permitiría afirmar que se trata de epitopes inmunorreactivos compartidos por proteínas de ambos sistemas. Sin embargo existen trabajos en los que se demuestra que la leche de soja es un sustituto adecuado para ser empleado en niños con alergia a leche de vaca (Businco 1993, American Academy of Pediatrics 1998).

También en la literatura se pueden hallar análisis de derivados lácteos de otras especies animales (cabra, oveja, yegua, camello, búfalo, etc). Dependiendo del individuo, se ha observado una mayor tolerancia por parte de individuos alérgicos (Webber 1989, Ellis 1991), a pesar de la homología hallada en la secuencia de aminoácidos entre proteínas de leche de vaca y de otros mamíferos (Spuergin 1997, Restani 1999). Se han descrito homología de secuencias de hasta un 98 % entre las α -caseína de cabra, oveja y vaca lo cual es consecuencia de un origen filogenético común (Spuergin 1997). Las zonas fosforiladas son las regiones más conservadas en la estructura de las caseínas. Al comparar los patrones electroforéticos de extractos proteicos obtenidos de las leches de las 3 especies analizadas pudimos observar que las α y β -caseínas presentan el mismo patrón de migración, mientras que la κ -caseína tiene mayor movilidad cuando es de origen bovino. Esto podría deberse a un distinto grado de glicosilación post-traducciona l entre las diferentes especies. Para el caso de la leche de camello no se ha descrito reactividad cruzada entre sus proteínas y las de vaca, aunque la composición en aminoácidos es muy similar (Farah 1993, Restani 1999). Dado que resulta un alimento muy exótico para ser empleado como fuente proteica no se han detectado individuos sensibilizados a estas proteínas.

Nuestros resultados también indican la presencia de proteínas homólogas en leches de vaca, oveja y cabra (especies más comunmente empleadas en nuestro medio), y la presencia de IgE sérica capaz de reconocer fracciones alergénicas, principalmente caseínas, aún en individuos que no han sido expuestos a leche de oveja y cabra. Es decir que se trata de anticuerpos específicos de proteínas bovina que dan reactividad cruzada con componentes de cabra y oveja. Por lo tanto las leche de cabra y oveja no serían recomendables como sustituto de la leche bovina (Spuergerin 1997, Bellioni-Businco 1999).

La β -caseína bovina presenta una alta homología de secuencia con la β -caseína humana, no obstante numerosos sueros humanos contienen IgE específica capaz de reconocer a este componente en la leche bovina. Esto podría explicarse por la formación de epitopes conformacionales al agregarse los distintos monómeros para formar las miscelas.

Por lo tanto los extractos proteicos obtenidos a partir de las diferentes fuentes mencionadas poseen un contenido de proteínas alergénicas adecuado como para ser empleados en el desarrollo de pruebas *in vivo* e *in vitro* para diagnóstico de la alergia a leche bovina.

- **Obtención de antisueros y anticuerpos monoclonales para su aplicación al desarrollo de métodos de diagnóstico, métodos de cuantificación de componentes antigénicos y caracterización de propiedades estructurales de los componentes de la leche bovina.**

Para el desarrollo de métodos de detección de IgE específica sérica e inmunoensayos para cuantificación e identificación de componentes proteicos en extractos antigénicos se prepararon anticuerpos monoclonales y antisueros específicos en distintos animales, empleando distinto tipo de inmunógenos (extractos crudos, aislados proteicos y proteínas purificadas)

La presencia de contaminaciones cruzadas (principalmente de α , β y κ -caseínas) en fracciones comerciales purificadas, también descrito por otros autores (Restani 1996, Plebani 1997), dificultó los siguientes puntos:

- ❖ interpretación de los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE para la identificación de los componentes individuales en los extractos proteicos
- ❖ interpretación de dot-blot, EAST, ELISA e immunoblotting para la identificación de componentes antigénicos y alergénicos
- ❖ obtención de antisueros específicos
- ❖ determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos

Este inconveniente fue parcialmente resuelto mediante el aislamiento y purificación de proteínas por electroelución y cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico. Además se debió recurrir al empleo de diferentes agentes caotrópicos para alterar el plegamiento de las caseínas y las interacciones entre las mismas. La formación de agregados, principalmente por formación de puentes disulfuro intra e intercatenarios, e interacciones hidrofóbicas, dificultaron su purificación y el análisis de las especificidades de los anticuerpos monoclonales por immunoblotting. Asimismo la presencia de epitopes conservados entre las diferentes caseínas, dificultó en un principio su caracterización.

Las características estructurales de las caseínas hacen muy compleja su purificación por métodos cromatográficos.

- **Desarrollo y optimización de métodos inmunoenzimáticos para detección y cuantificación de IgE sérica. Desarrollo de métodos de screening y confirmatorios.**

Los extractos antigénicos caracterizados y los distintos tipos de anticuerpos obtenidos fueron empleados para el desarrollo de diferentes formatos de inmunoensayos para diagnóstico de la alergia a leche bovina, mediante la detección de IgE específica. La IgG específica no nos permite diferenciar entre un individuo alérgico y uno no alérgico ya que en la mayoría de los individuos normales se detectó la presencia de IgG específica.

Como pruebas de screening de la patología se emplean prueba cutánea y RAST, mientras que la prueba confirmatoria por excelencia es la supresión dietaria y el desafío doble ciego con el alergen sospechoso de inducir las reacciones alérgicas. En nuestro medio no se realiza el desafío

doble ciego por la imposibilidad del seguimiento del paciente. Además está descripto que en pacientes de corta edad la validez del prick test es muy limitado por la inmadurez de la piel, y se aconseja que en aquellos casos en que se realice, el resultado sea validado por comparación con la prueba de restricción dietaria y reexposición con el alérgeno en forma de doble ciego (Bock 1978, Sampson 1988). El reto oral continúa siendo la prueba más confiable para diagnóstico de una alergia alimentaria por su mayor sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo (Niggemann 1999). Sin embargo empleando ciertos alimentos, y bajo determinadas limitaciones, la prueba cutánea es muy útil como herramienta predictiva de reacciones alérgicas (Menardo 1985).

El screening de alergia a leche bovina lo realizamos por determinación de IgE total (ELISA) y específica por EAST, mientras que como método confirmatorio se aplicó el immunoblotting, método que además identifica al alérgeno individual sensibilizante. Por lo tanto los resultados hallados por las pruebas *in vitro* desarrolladas no pudieron ser correlacionados con pruebas *in vivo*, dado que no se realizó prick test ni desafío oral con el extracto proteico de leche bovina. La especificidad de los ensayos desarrollados fue evaluada por comparación con las historias clínicas individuales y mediante el empleo de sueros provenientes de individuos sensibilizados a otros alérgenos.

De los resultados obtenidos por aplicación de los métodos desarrollados sobre 140 sueros provenientes de pacientes alérgicos a leche bovina surge que la caseína, y en especial sus agregados de alto peso molecular, constituyen el alérgeno principal del sistema. En general no hemos observado que un único componente fuera reconocido como antigénico o alérgico, aunque la α -caseína fue reconocida por el 73 % de los sueros. La IgE sérica estaría reconociendo epitopes secuenciales y conformacionales presentes en las miscelas y en las fracciones monoméricas de caseína. El hecho que la α -caseína sea reconocida en mayor porcentaje por los sueros humanos podría deberse a que no se ha hallado un componente similar en la leche humana. Sin embargo en la leche humana se encuentra un componente con un alto grado de homología de secuencia con la β -caseína bovina, y esta fracción fue reconocida por la IgE sérica en el 71 % de los sueros analizados. Esta elevada reactividad podría deberse a la existencia de epitopes conformacionales en la β -caseína cuando ésta forma parte de las miscelas. Dado que la mayoría de los sueros que presentaban IgE específica contra α -caseína reconocían

simultáneamente a la β -caseína se podría concluir que habría un cosensibilización entre las distintas fracciones de caseína como otros autores han sugerido (Wal 1998).

Dado que la leche humana no contiene β -Lg, esta proteína ha sido considerada como el principal alérgeno de la leche bovina durante mucho tiempo (Goldman 1963, Gjesing 1986, Hoffman 1975). Sin embargo, y a partir de estos resultados, tratamientos realizados en pacientes con hidrolizados de proteínas del suero no arrojaron los resultados esperados. Se observaron reacciones anafilácticas luego de la ingestión de estos alimentos. Actualmente, y en base al empleo de una metodología diferente, diferentes estudios han resaltado el comportamiento alérgico de las caseínas, en especial las α 1-caseínas (Savilahti 1992, Restani 1995, Docena 1996, Spuergin 1996).

Inclusive la alérgenicidad de la β -Lg ha sido parcialmente eliminada mediante la aplicación de nuevos tratamientos en la industria láctea (McLaughlan 1981), a pesar que se trata de un componente resistente al pH ácido y a la acción de enzimas proteásicas. Por otro lado las caseínas mantienen su capacidad de unión a la IgE por su mayor resistencia a la desnaturalización térmica (Restani 1995), aunque presentan una mayor sensibilidad a las enzimas y al pH ácido.

En base a nuestros resultados obtenidos por EAST, immunoblotting e immunoblotting de inhibición las mezclas de caseína constituyen el alérgeno principal del sistema ya que más del 80% de los sueros analizados fueron capaces de reconocer a esta fracción. Hemos detectado por immunoblotting y ELISA de captura IgE sérica capaz de reconocer componentes con PM correspondientes a las α , β , κ y caseínas.

Las mezclas de caseína fueron aisladas y purificadas por métodos cromatográficos. Su estructura fue alterada por empleo de diferentes agentes caotrópicos, y mediante el uso de sueros de pacientes y anticuerpos monoclonales se comprobó que la mezcla presenta epitopes inmunorreactivos conformacionales y secuenciales. En los monómeros de caseína los epitopes serían principalmente secuenciales por su estructura terciaria poco definida (Spuergin 1996). En base a estos resultados podemos concluir que las principales interacciones que estabilizan a los monómeros de caseína en la formación e agregados son de naturaleza hidrofóbica y puentes disulfuro. Nuestros resultados se adecuan al modelo planteado por Slattery y Evard (1973), en el cual se postula la existencia de estructuras supramoleculares formadas por submezclas en las

cuales la κ -caseína se encuentra en la superficie de cada una de ellas interactuando con el medio acuoso que las rodea.

La distribución de las diferentes fracciones de caseína dentro de las miscelas, y las interacciones entre las mismas, determinan las propiedades funcionales que las constituyen en elementos fundamentales en la formulación de numerosos alimentos.

La detección de IgG específica no tiene valor diagnóstico ya que también se ha detectado en individuos normales. Por lo tanto tampoco debería asignársele un rol inmunopatogénico (May 1977, Fallstrom 1986, Ebner 1995), aunque algunos trabajos describen la formación de complejos inmunes que por sus características se depositan en la membrana del glomérulo renal y generan un estado de anuria. Uno de los sueros aquí analizados pertenecía a un paciente que refería estados de anuria al ingerir leche de vaca. Por EAST e immunoblotting detectamos IgG e IgE específica, con patrones de reactividad diferentes por immunoblotting.

Hemos hallado por immunoblotting diferente perfil de reconocimiento antigénico al analizar la reactividad IgG e IgE séricas. Para explicar este resultado se podría plantear la hipótesis de un origen diferente de estos anticuerpos, ya que podrían ser secretados por clones de LB sistémicos o de clones provenientes de mucosas que contactan a los alérgenos. Para confirmarlo habría que aislar estos clones, expandirlos y enfrentarlos con distinto tipo de antígenos para identificar la especificidad de reconocimiento de la inmunoglobulina de superficie.

- **Caracterización de sustitutos empleados en el tratamiento de la patología.**

El empleo de antisueros, anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes alérgicos a la leche bovina permitió identificar determinantes antigénicos en extractos proteicos obtenidos a partir de distintos sustitutos empleados en el tratamiento de la patología. La aplicación de SDS-PAGE e immunoblotting reveló la presencia de componentes proteicos nativos y restos peptídicos provenientes de la leche de vaca. Existen trabajos en los cuales se reporta la presencia de proteínas intactas en hidrolizados parciales, extensivos e inclusive en fórmulas derivadas de aminoácidos (Isolauri 1995), como así también, la presencia de anticuerpos IgE capaces de

reconocer epitopes presentes en restos peptídicos (Plebani 1990). Esto podría explicar las reacciones severas observadas durante algunos tratamientos con hidrolizados proteicos (Bock 1989, Ellis 1991, Aggett 1993, Businco 1993). Los hidrolizados extensivos de caseína parecerían ser más seguros que los de proteínas de suero, ya que estos últimos contienen restos de caseína capaces de ser reconocidos por distintos anticuerpos. Estos resultados indicarían además la dificultad en el aislamiento de las caseínas y la presencia entre las proteínas del suero de restos peptídicos provenientes de las caseínas que contienen determinantes antigénicos (Plebani 1997, Gortler 1995, Restani 1995). Otro de los inconvenientes en el empleo de hidrolizados extensivos es su sabor amargo y la diarrea originada por su hiperosmolaridad.

Dado que los diferentes procesos de obtención de las fórmulas hidrolizadas probablemente no afectan por igual a todos los determinantes antigénicos presentes en las proteínas, y además no todos los hidrolizados presentan la misma composición proteica, el empleo de antisueros sería más seguro para la caracterización de la actividad antigénica residual en las fórmulas hidrolizadas. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de identificar al componente proteico individual, y la IgE sérica permite detectar la presencia de epitopes B.

Nuestros resultados obtenidos por EAST indican la presencia de restos peptídicos capaces de unir IgE sérica aún en hidrolizados extensivos, aunque por immunoblotting no haya sido posible visualizar componentes proteicos o peptídicos.

A partir de los resultados obtenidos por EAST, en donde pudimos observar un reconocimiento diferencial de cada suero por los distintos sustitutos (EAST), la elección de la fórmula hipoalérgica a emplearse en el tratamiento debería basarse en un diagnóstico preciso. Es decir que el perfil de reconocimiento alérgico individual juntamente con el conocimiento de la composición proteica, y principalmente alérgica, de los diferentes sustitutos permitirían inferir acerca de cuál de ellos presenta la menor probabilidad de desencadenar reacciones alérgicas en el paciente. Asimismo, se debería realizar una prueba cutánea con el sustituto elegido de manera de evaluar su poder alérgico *in vivo*.

Se han descrito numerosos epitopes inmunorreactivos en las distintas proteínas alérgicas de la leche bovina. En prácticamente todas las moléculas se han hallado epitopes secuenciales y conformacionales, generalmente en regiones hidrofóbicas inaccesibles a las

enzimas. Además la respuesta inmune humoral se caracteriza por una gran variabilidad en las especificidades de reconocimiento (Wal 1998). Por lo tanto el desarrollo de nuevos sustitutos hipoalergénicos que aseguren un normal crecimiento del niño y eviten la instauración de procesos crónicos (asma) requerirá de mayores estudios.

El control de la hipoalergenicidad de una fórmula basado únicamente en los PM de los restos peptídicos presentes no asegura la reducción o eliminación de los determinantes antigénicos/alergénicos. Se requiere además de métodos inmunoenzimáticos que evalúen la capacidad *in vitro* de unión a anticuerpos y pruebas *in vivo*.

Los resultados hallados con los extractos proteicos de leche de cabra y oveja indicarían que no son alternativas seguras para el tratamiento. Se demostró mediante distintos inmunoensayos que existe una importante reactividad cruzada entre distintos componentes proteicos. Aunque otros autores hayan reportado resultados similares (McLaughlan 1981, Hill 1984, Gjesing 1986), el comportamiento *in vivo* y las implicancias clínicas pueden ser diferentes. La leche de cabra es deficiente en diferentes vitaminas por lo cual no sería apta como único alimento (Coveney 1985). A pesar que las caseínas tienen un muy bajo porcentaje de homología de secuencia las regiones fosforiladas constituyen dominios conservados entre las α 1-, α 2- y β -caseínas de diferentes especies. Estas regiones han sido reconocidas como epitopes inmunorreactivos resistentes a la degradación enzimática y podrían estar implicados en las reacciones cruzadas observadas en individuos que no han sido expuestos a leche de cabra y oveja (Otani 1987, Meisel 1989, Enomoto 1990, Kim 1993).

Respecto a las fórmulas en base a proteínas de soja, desde hace años se conoce la antigenicidad y alergenidad de sus proteínas. Entre el 5-30 % de pacientes alimentados con este tipo de sustitutos se sensibilizan a proteínas de soja (Hill 1984, Sampson 1988, American Academy of Pediatrics 1989). La causa puede ser que las lesiones en la mucosa intestinal producidas por la intolerancia a las proteínas de leche de vaca facilitan la absorción de otras proteínas en forma intacta (Whittington 1977). Sin embargo en nuestro medio es el sustituto más empleado en el tratamiento. La presencia de componentes de reactividad cruzada entre proteínas de soja y de leche bovina podría explicar el elevado porcentaje de pacientes que no toleran a estos sustitutos.

Las proteínas de leche humana no son capaces de unir IgE sérica, aunque se debe considerar que proteínas de leches de otras especies pueden ser absorbidas sin alterarse por la mucosa del intestino y estar presentes en la leche humana y en sangre (Businco 1993, Lovegrove 1996, Rumbo 1998). En estos casos se debe considerar que estos componentes pueden ser responsables de la sensibilización y desarrollo de reacciones alérgicas en individuos predispuestos que ingieran leche materna. La sensibilización a edades tempranas es un factor desencadenante de procesos atópicos muy importante. Por lo tanto el empleo de leche humana proveniente de madres con una dieta libre de leche bovina durante tiempos prolongados, en combinación con un retraso en la ingesta de sólidos y el control de factores ambientales, ayudaría a disminuir la incidencia y/o severidad de enfermedades atópicas. Inclusive un período más prolongado de amamantamiento influiría sobre otros hábitos en el recién nacido (dieta casi exclusiva de leche materna, mayor contacto con el recién nacido, etc). Evitando el contacto de los elementos del sistema inmune del recién nacido con proteínas antigénicas se logra retrasar o disminuir la incidencia de reacciones adversas a proteínas alimentarias.

En un futuro la tecnología alimentaria introducirá proteínas recombinantes modificadas en alimentos alternativos artificiales, en las cuales los epitopes B o alergénicos hayan sido eliminados o modificados. De todas formas no podrán reemplazar las propiedades nutritivas y fisiológicas que posee la leche materna sobre el recién nacido.

Capítulo II -Alergia al látex



| | |
|---------------------------------------|-----|
| 1. Generalidades | 140 |
| 2. Composición química el látex | 141 |
| 3. Extractos proteicos | 144 |
| 4. Signos clínicos y grupos de riesgo | 146 |
| 5. Diagnóstico y tratamiento | 147 |
| Objetivos específicos | 149 |
| Resultados | 149 |
| Discusión | 149 |

Capítulo II -Alergia al látex

Introducción



1. Generalidades

Las reacciones alérgicas causadas por productos que contienen látex se han constituido en los últimos años en un problema sanitario y ocupacional muy importante que afecta a la población general, especialmente a la vinculada con la Salud. Este notable incremento en la exposición a proteínas de látex tiene su origen en los problemas de bioseguridad originados por la expansión que han tenido enfermedades infecciosas tales como HIV y hepatitis B (Slater 1992, Jaeger 1992, Slater 1994). Este hecho ha originado una gran demanda de productos manufacturados a partir de látex natural, lo cual derivó en cambios introducidos en los procesos industriales para satisfacer dicho requerimiento. Estos cambios originaron variaciones en las propiedades de los productos finales.

El látex natural se obtiene del árbol *Hevea brasiliensis*, perteneciente a la familia de las *Euphorbiaceas*. Más de 200 especies lo producen, pero ésta es la que ha sido más explotada, por su mayor rendimiento en la producción de látex natural (Cornish 1999). Es una especie oriunda del Amazonas, pero a partir del siglo XVIII fue llevada a Inglaterra, hecho que determinó que su explotación sufriera grandes cambios. A partir que Goodyear descubriera que al mezclar el látex natural con sulfuros y someterlos a elevadas temperaturas cambiara sus características físicas (mayor elasticidad, más fuerte, etc.) se lo comenzó a utilizar con fines industriales. Se realizaron distintos tipos de estudios en cuanto a las condiciones para su cultivo en extensiones mayores (principalmente en colonias inglesas de Africa y Asia), estudios de los procesos químicos de vulcanización (calentamiento a alta temperaturas en presencia de sulfuros), estudio y selección de variantes genéticas, la manipulación genética y clonado, el agregado de diferentes aditivos químicos para obtener distintos tipos de productos manufacturados con distintas calidades en cuanto a su elasticidad, resistencia a la ruptura, al pasaje de corriente, termoestabilidad, etc. Estos avances le dieron un gran impulso a la explotación industrial de esta especie para la obtención de látex natural y posteriormente, de productos manufacturados de uso masivo. Actualmente los cultivos más extensos y las principales plantas industriales de procesamiento se encuentran en el sudeste asiático (Malasia, Tailandia, Indonesia, Sri Lanka).

2. Composición química el látex

El látex natural es el líquido intracelular de un conjunto de células anastomosadas (células laticíferas) que se extienden formando una red debajo de la corteza del árbol. Se lo extrae realizando cortes en diagonal en la corteza a distintas alturas, dejando fluir el líquido hasta que coagule espontáneamente. Este proceso se repite cada 1-3 días. El látex así obtenido puede congelarse para evitar su coagulación espontánea, o puede ser recogido sobre anticoagulantes, entre los cuales el más empleado es el amoníaco que además actúa como bactericida. Según la concentración del amoníaco se pueden tener látex amoniacados de alto contenido en amoníaco (0.7 %) o de bajo contenido (0.22 %), al que además se le deben agregar otros anticoagulantes.

El látex es una emulsión dispersa en agua donde el componente que se encuentra en mayor proporción es un polímero hidrocarbonado: cis-1,4 poliisopreno que por su gran hidrofobicidad, y para mantener su estabilidad en el medio acuoso citosólico, se agrega y forma partículas de distinto tamaño (5 nm-3 μ de diámetro). Estas partículas se estabilizan en el medio citosólico rodeándose de lípidos, fosfolípidos y proteínas.

En la fase dispersa también se encuentran, y en proporciones variables según la especie vegetal que lo produzca, gomas, taninos, alcaloides, distintos tipos de lípidos, etc. En la fase acuosa las proteínas constituyen el 1-3,5 % del total de los componentes del látex, tienen pesos moleculares entre 5 y 100 kDa y se las puede encontrar libres en el citosol, rodeando las partículas de poliisopreno y en el interior de los organoides subcelulares o lutoides (Slater 1992, Kekwick 1996, Theissen 1997). Se conocen alrededor de 30 proteínas, muchas de las cuales han sido caracterizadas en cuanto a su PM, pI y función, pero sólo 8 han sido secuenciadas y clonadas. Estas proteínas no están disponibles para el diagnóstico o tratamiento, pero han sido muy útiles para el estudio de sus características funcionales, bioquímicas, inmunoquímicas, moleculares (mapeo de epitopes), etc. (Rozynek 1998, Breiteneder 1999, Oh 1999, Beezhold 1999). A las proteínas secuenciadas se les ha asignado la nomenclatura para alergenios establecida por la IUIS. En la **tabla 5** se presentan algunas características relevantes de estas proteínas.

TABLA 5. Características principales de las proteínas más relevantes del látex natural.

| Proteína | PM (kDa) | PI | Localización subcelular | Secuencia |
|------------|-----------|---------|-----------------------------|----------------|
| Hev b1 | 14.6 | 8.45 | Partículas grandes de látex | Attanyaka 1991 |
| Hev b2 | 35.1 | 10 | Organoides | Chye 1995 |
| Hev b3 | 23 | 4.8 | Partículas chicas de látex | Scheiner 1999 |
| Hev b4 | 50-57 | 4.5 | Organoides | |
| Hev b5 | 16 | 3.5 | Citosol | Akasawa 1996 |
| Hev b6 | 4.7-14-20 | 4.9-7.4 | Organoides | Brockaert 1990 |
| Hev b7 | 42.9 | 4.8 | Citosol | Sowka 1998 |
| Hev b8 | 10-15 | - | Citosol | |
| Hevamina | 30 | 8.7 | Organoides | |
| Chitinasas | 28 | - | Organoides | |

Hev b6 corresponde a 3 componentes: Hev b6.01 o proheveína (20 kDa), Hev b6.02 o heveína (4.7 kDa) y Hev b6.03 o fragmento C-terminal (14 kDa). Estos últimos se forman por maduración post-traducciona en los lutoides. Son los componentes más abundantes de estos organoides y están en una relación 30:1 la heveína al fragmento C-terminal

A estas proteínas se les atribuyen principalmente 3 funciones:

-estructural: rodean y estabilizan las partículas de látex, actúan como anticoagulantes naturales. Por ejemplo: Hev b1, Hev b3, Hev b4, Hev b6.02, hevamina.

-enzimas de biosíntesis: intervienen en la biosíntesis del poliisopreno a partir de sus precursores. Por ejemplo: Hev b1 o factor de elongación REF (cataliza la adición de 2 unidades de isopreno al precursor terpénico), Hev b3. Se localizan en la superficie de las partículas de poliisopreno, donde se produce la reacción de polimerización.

-enzimas de defensa: degradan componentes presentes en hongos y parásitos. Por ejemplo: Hev b2, Hev b5, Hev b6, Hev b7, hevamina, chitinasas clase I y II.

Distintas evidencias han permitido inferir acerca del rol fisiológico que cumple el sistema de las células laticíferas en las especies productoras de látex; sería un sistema de defensa del vegetal que opera frente microorganismos infecciosos. Reacciones cruzadas entre proteínas del látex y proteínas de otros vegetales (banana, kiwi, papa, castañas, espinaca, arroz, frutilla, etc.),

asociación entre fenómenos de atopía por contacto de productos manufacturados con látex y la ingesta de ciertos vegetales, secuencias aminoacídicas con un alto grado de homología con proteínas de defensa de otros vegetales, permitieron asignarle a algunas de las proteínas del látex natural una función biológica de defensa. En general catalizan la degradación de componentes presentes en la pared de hongos y parásitos. Algunos ejemplos son los siguientes:

- Hev b2: hidroliza β -1,3 glucanos característicos de hongos, actividad que también se observa en tomate y tabaco.
- Hev b5: 40-50 % de homología con proteínas de papa y kiwi cuya expresión se induce cuando el vegetal se encuentra infectado con microorganismos.
- Hev b6.02: con capacidad de unir y clivar la quitina, propiedad también observada en proteínas de trigo y papa.
- Hev b6.03: presenta un 74-79 % de homología con la región C-terminal de proteínas inducibles de papa y tomate.
- Hev b7: con actividad esterasa y fosfolipasa A2, similar a la de proteínas de la papa y tomate.
- Hev b8: muestra alta homología con componentes de la banana.
- Hevamina: degrada quitina y peptidoglucanos, tiene actividad lisozima y una alta homología con chitinasas de la palta.
- SRPP (Small Rubber Particle Protein): es una proteína aislada recientemente, con homología de secuencia con la Hev b1 y con una proteína inducible de la especie vegetal *Phaseolus vulgaris*. No se ha demostrado hasta ahora que sea una proteína inducible, pero sí que interviene en la biosíntesis del polímero junto a la Hev b1.

Una característica de estos sistemas proteicos de defensa en vegetales filogenéticamente distantes es que son proteínas de “stress”, es decir que su síntesis se induce frente a situaciones anormales. Esto estaría ocurriendo con el árbol de *Hevea brasiliensis* ya que se encuentra constantemente bajo este tipo de estímulos: es cultivado en zonas geográficas y climáticas que no son las autóctonas para la especie, se le realizan cortes periódicos en su tronco, además los métodos de recolección han variado (en frecuencia y época del año), son variedades genéticas seleccionadas y clonadas para aumentar el rendimiento en la producción de látex, se las estimula con hormonas, etc. Por lo tanto estos factores inducen cambios permanentes en la composición

proteica del látex natural, principalmente incrementando el contenido de estas proteínas de “stress”. Por tratarse de proteínas alergénicas, resistentes al calor y aditivos químicos agregados, los productos manufacturados a partir del látex natural se enriquecerán, con el transcurso del tiempo, en este tipo de proteínas.

De las proteínas del látex descritas cualquiera podría comportarse como un alérgeno en un individuo atópico, sin embargo sólo un número limitado ha demostrado ser capaz de unir la IgE sérica y desencadenar los mecanismos inmunológicos de hipersensibilidad. Se han identificado 3 alérgenos principales en la látex natural: Hev b1, Hev b5 y Hev b6, mientras que el resto de los componentes son alérgenos menores o no existen reportes que indiquen su comportamiento alérgico (Ownby 1993, Alenius-Turjanmaa 1994, Alenius 1995, Chen 1997, Rozynek 1998, Ylitalo 1998).

3. Extractos proteicos

Las fuentes de extracción de proteínas más comunes son: látex natural amoniacado y no amoniacado, productos manufacturados, muestras de aire de ambientes en donde se emplean productos de látex (quirófanos, consultorios, fábricas, calles de ciudades muy urbanizadas, etc.) y vegetales que contienen componentes proteicos y glicoproteicos de reactividad cruzada con proteínas del látex natural.

En la bibliografía se han descrito numerosas formas de extraer proteínas a partir del látex natural. Actualmente el procedimiento más empleado consiste en una incubación con un buffer acuoso y separación de las distintas capas por ultracentrifugación. Se obtiene una capa superior cremosa que contiene a las partículas poliisoprenicas, una capa acuosa intermedia que es el líquido citosólico o *C serum* y el *B serum* o capa inferior, que son los lutoides. Si se trabaja con látex natural no amoniacado se debe trabajar en frío para evitar que coagule espontáneamente.

Los productos obtenidos por vulcanización del látex natural (guantes, globos, chupetes, juguetes, preservativos, sondas, elásticos, tetinas, etc.) retienen en la matriz poliisoprenica formada a las proteínas y glicoproteínas. Muchas de estas proteínas permanecen inalteradas en el producto final, mientras que otras se modifican como consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas y las sustancias químicas agregados (Alenius 1991, Lavaud 1992, Alenius 1994, Akasawa 1995, Palosuo 1998). Algunas desaparecen y en otras se crean nuevos epitopes

reactivos (Alenius 1991, Makinen-Kiljunen 1992, Kelly 1993). Consecuentemente no todos los productos son igualmente alergénicos.

Para el aislamiento de alergenos a partir de muestras de aire se emplean aparatos especiales que contienen filtros capaces de retener partículas de diferente tamaño. Esta técnica ha sido empleada para la detección de alergenos en las calles de ciudades muy urbanizadas (por desprendimiento de los neumáticos) y en quirófanos o laboratorios donde se emplean guantes de látex (Brock 1995). Esta vía de sensibilización es muy importante entre trabajadores de la Salud ya que la concentración de aeroalergenos del látex en ambientes donde se han usado guantes con polvo varía de 10 á 208 ng/m³, en comparación con ambientes libres de látex donde los valores no superan los 1.8 ng/m³ (Swanson 1994). Se detectan partículas aerosolizadas de látex hasta una hora después del uso de guantes.

Durante el proceso de vulcanización se forman puentes de sulfuro entre las cadenas poliméricas y como consecuencia el látex natural adquiere propiedades elásticas. Pero con el tiempo el proceso industrial de vulcanización se ha modificado y también las propiedades finales del producto obtenido. Los sulfuros se emplean como agentes primarios de vulcanización y se le adicionan aceleradores de la vulcanización que son donores o carriers de átomos de azufre (thiurams, mercaptobenzodiazoles, carbamatos, etc.), anti-oxidantes para disminuir la degradación del látex (fenoles), preservativos, colorantes, estabilizadores, etc. Por lo tanto la mezcla vulcanizante es muy compleja y varía según la industria. Estos aditivos químicos pueden desencadenar mecanismos de hipersensibilidad Tipo IV ya que se comportan como haptenos, principalmente los aceleradores de la vulcanización. Además muchos de estos aditivos precipitan a las proteínas del látex en la matriz poliisoprélica (alcoholes) y los lavados finales no logran eliminar a estos componentes.

Originariamente a los guantes comerciales se les agregaba talco para facilitar su uso, pero problemas surgidos por el contacto con la piel derivó en su reemplazo por almidón. El gran inconveniente originado por este cambio es la mayor extracción de proteínas de la matriz del guante durante su almacenamiento ya que actúa como "carrier" (Tomazic 1994, Beezhold 1994). Por lo tanto al momento de colocarse los guantes se produce una aerosolización del almidón que contiene a los alergenos de látex en el ambiente. Se ha demostrado que la cantidad de proteínas

que pueden extraerse de guantes libres de polvo es inferior a la detectada en guantes con polvo (Tomazic 1994, Beezhold 1994)

Por lo tanto dependiendo de la fuente de látex empleada por cada industria, las sustancias químicas agregadas y los procesos de lavados será el contenido de proteínas que puedan ser extraídas de los productos y la alergenicidad de los mismos.

4. Signos clínicos y grupos de riesgo

La vía de sensibilización de los individuos atópicos es por inhalación de partículas desprendidas de los productos o por contacto de la piel y mucosas con productos manufacturados. Se pueden desencadenar 2 tipos de patologías:

- **hipersensibilidad Tipo IV o hipersensibilidad retardada:** mediada por células y causada por haptenos (aditivos químicos: vulcanizantes, anticoagulantes, conservadores, antioxidantes, endurecedores, aceleradores, etc.). Se manifiesta básicamente como un eczema de contacto y se ha observado que es el proceso previo a un fenómeno de atopía, ya que altera a la piel como barrera física (Wrangsjö 1988, Slater 1992, Slater 1994).
- **hipersensibilidad Tipo I o hipersensibilidad inmediata:** causada por proteínas y glicoproteínas presentes en látex natural. Al unirse a la IgE presente en mastocitos y basófilos puede desencadenar síntomas leves (dermatitis, urticaria, edema, rinitis), o graves (asma severo, angioedema, shock anafiláctico con hipotensión y broncoespasmo, y muerte) (Slater 1989, Sussman 1991, Slater 1992, Slater 1994).

A partir del conocimiento de los diferentes factores de riesgo se han identificado distintos grupos de riesgo en los cuales la prevalencia de la alergia al látex se encuentra incrementada. Esto puede deberse a prolongadas exposiciones al alérgeno o a las vías de contacto con los productos manufacturados. Los grupos de riesgo descritos son:

- **pacientes poliquirúrgicos:** en general son chicos sometidos a múltiples intervenciones quirúrgicas por la presencia de malformaciones génito-urinarias, trastornos neurológicos o el caso especial de niños con espina bífida o mielomeningocele en los cuales podría existir una predisposición genética, o el principal factor de riesgo es el contacto prematuro con productos de látex. En los primeros días de vida son operados para corregir la malformación en el tubo

neural. La prevalencia de la patología alcanza valores del 60 % (Alenius 1993, Akasawa 1993, Alenius 1994, Hadjiliadis 1995)

- **trabajadores de la Salud:** son en general adultos que están en permanente contacto con productos de látex (principalmente guantes): médicos, odontólogos, bioquímicos, técnicos, enfermeros, etc. Los valores de prevalencia reportados alcanzan el 15 % (Charous 1994, Brugnami 1995).
- **trabajadores de la industria del caucho:** son adultos que están en permanente contacto con el látex natural o con los productos manufacturados. Se han informado datos de prevalencias de hasta un 12 % (Orfan 1994).
- **atópicos:** actualmente se consideran a todos los pacientes atópicos como grupo de riesgo ya que el contacto cotidiano con productos de látex es inevitable, y por lo tanto todo individuo sensibilizado puede desarrollar signos de atopía al exponerse a estos productos. Se debe considerar que en la actualidad estamos expuestos permanentemente a productos manufacturados a partir de látex. Los datos de prevalencia informados para la población general son inferiores al 1 % (Moneret-Vautrin 1993).

5. Diagnóstico y tratamiento

La historia clínica resulta una herramienta muy importante para el diagnóstico de esta patología. Debe incluir antecedentes familiares y personales de atopía, ocupación, hobbies, etc. Además debe estar complementado con pruebas *in vivo* e *in vitro* que pongan de manifiesto la relación entre la atopía y el o los alérgenos sospechosos de inducirla.

Entre las pruebas *in vivo* de diagnóstico se emplean, aunque con poca frecuencia por el riesgo que implican para el paciente, los test de provocación: se colocan un dedo de un guante en la mano o se los hace soplar un globo (Niggemann 1998). Principalmente se emplean pruebas cutáneas a pesar del conocimiento parcial de la composición química de los extractos proteicos de látex empleados. No se encuentran disponibles extractos de látex estandarizados. Está descrito que el prick test es menos sensible y más seguro que la prueba cutánea, pero más sensible que el RAST.

Las pruebas *in vitro* son más seguras para el paciente, pero deben tener la sensibilidad y especificidad adecuadas para detectar la presencia de IgE específica sérica. Además no siempre

se observa una correlación directa entre los resultados obtenidos por las pruebas *in vitro* y la clínica. El prick test, por el escaso volumen de extracto que requiere, y los ensayos inmunoenzimáticos para la detección de IgE específica, por las altas sensibilidad y especificidad que se pueden lograr, son los métodos de elección para el diagnóstico de la patología.

Dado que la Food and Drug Administration (FDA) desaconseja la realización de inmunoterapia y los alérgenos recombinantes no se encuentran disponibles para su empleo *in vivo*, el único tratamiento eficaz hasta el momento es evitar el contacto con productos que contengan látex, lo cual resulta sumamente difícil de lograr, dada la gran cantidad y variedad de productos que contienen látex. Para lograr disminuir la exposición a productos de látex es necesario identificar qué productos contienen proteínas de látex. Se han difundido por diferentes medios listados de aquellos productos que contienen látex, de manera que la población general, y en especial los grupos de riesgo, sepan cuáles no deben contactar. Podemos citar los siguientes productos:

- a) De uso médico: guantes para distintos usos, cintas adhesivas, bandas elásticas, catéteres urinarios (actualmente son de teflon o polímeros sintéticos), bases de electrodos, tubos intestinales, endotraqueales, lazos, bordes de las máscaras de ventilación, drenajes, partes del estetoscopio, torniquetes, peras para insuflar aire, tubos para enemas, equipo para hemodiálisis, elementos de odontología (goma Dique, etc.), tapones de frascos, etc.
- b) De uso cotidiano: guantes, preservativos, globos, elásticos, juguetes, pelotas de tenis, chupetes, tetinas, calzados, etc.

Entre las normas de prevención los pacientes alérgicos deben llevar un brazalete identificador, tener disponible un kit de emergencia que contenga adrenalina, en caso que vayan a ser sometidos a cirugías se los debe pre-mediar y deberá ser la primer cirugía del día.

Capítulo II -Alergia al látex

Objetivos específicos



Objetivos específicos

Para la alergia a proteínas del látex natural se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollo de una metodología para obtención de extractos proteicos a partir de látex natural y productos manufacturados.
- La identificación y caracterización de proteínas alergénicas en el látex natural y en productos manufacturados a partir de látex.
- Desarrollo de métodos de cuantificación de proteínas totales en látex natural y en productos manufacturados.
- Obtención de antisueros específicos para el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos de cuantificación de proteínas antigénicas de látex en productos manufacturados.
- Desarrollo y optimización de métodos de diagnóstico de screening y confirmatorios que permitan detectar la presencia de IgE específica en el suero de pacientes.
- Preparación de extractos proteicos para su aplicación en pruebas cutáneas de diagnóstico.
- Evaluación de la composición proteica, antigénica y alergénica de muestras obtenidas en las distintas etapas de manufacturación de productos finales.
- Evaluación del contenido de proteínas antigénicas y alergénicas del látex en productos comerciales que son contactados por individuos de los distintos grupos de riesgo y de la población general.

Capítulo II -Alergia al látex

Resultados



| | |
|--|-----|
| 1- Análisis de la composición proteica de los extractos obtenidos a partir del látex natural | 153 |
| 2- Análisis de la composición proteica de los extractos obtenidos a partir de productos manufacturados | 156 |
| 3- Determinación de IgE específica | 167 |
| 3.1. ELISA | 167 |
| 3.2. EAST | 168 |
| 3.3. Immunoblotting | 176 |
| 4- Prueba cutánea | 181 |

1- Análisis de la composición proteica de los extractos obtenidos a partir del látex natural

Como fuente de proteínas de látex se empleó principalmente látex natural amoniaco. La presencia de amoníaco como anticoagulante permite su almacenamiento a temperatura ambiente o 4°C, y además es la materia prima empleada por la industria para la manufacturación de diferentes productos.

Para la extracción de proteínas se emplearon diferentes metodologías:

- incubación en presencia de 2% NaCl y posterior centrifugación
- incubación en presencia de 30 % AcH y separación del exudado por filtración y centrifugación
- precipitación proteica con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en distintas concentraciones (30 %, 50 % y 70 %) y resuspensión en 0.1 % NaOH
- precipitación proteica con 15 % ácido tricloroacético y resuspensión en 0.1 % NaOH
- incubación en presencia de buffer fosfatos y posterior ultracentrifugación
- incubación en presencia de buffer fosfatos y diferentes detergentes, y posterior ultracentrifugación.

La eficiencia de extracción proteínas de cada método fue evaluada mediante ensayos de cuantificación de proteínas (Lowry, Bradford y ácido bisincronico) y métodos electroforéticos (SDS-PAGE). Dado que la mayoría de las sustancias adicionadas interfieren en las determinaciones de proteínas por los métodos de Bradford o de BCA (NP40, SDS, Tritón X100, Tween 20, Tween 80, etc.), se empleó el método de Lowry para comparar la eficiencia de extracción de proteínas. A continuación se enumeran los distintos extractos preparados a partir del látex natural:

Extracto 1: látex natural amoniacal con Cl Na 2%

Extracto 2: látex natural amoniacal con AcH

Extracto 3: látex natural amoniacal con TCA

Extracto 4: látex natural amoniacal con 30 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Extracto 5: látex natural amoniacal con 50 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Extracto 6: látex natural amoniacal con 100 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Extracto 7: látex natural amoniacal con buffer fosfatos

Extracto 8: látex natural amoniacal con buffer fosfatos y 1% SDS

Extracto 9: látex natural amoniacoal con buffer fosfatos y 0.5% Tween 80

Extracto 10: látex natural amoniacoal con buffer fosfatos y 0.5 % Tween 20

Extracto 11: látex natural amoniacoal con buffer fosfatos y 0.5 % Nonidet P 40

Extracto 12: látex natural amoniacoal con buffer fosfatos y 0.5 % Tritón X 100

Extracto 13: látex natural amoniacoal con buffer fosfatos y 1 % deoxicolato

En la **tabla 6** se presentan los resultados del contenido de proteínas (obtenidos con el método de Lowry) de los distintos extractos preparados a partir de látex natural amoniacoado.

TABLA 6. Concentración de proteínas de los extractos proteicos obtenidos a partir de látex natural amoniacoado.

| Extractos | Proteínas totales (Lowry) |
|---------------|---------------------------|
| | mg/ml |
| Extracto 1 | 1.1 |
| Extractos 2-6 | 0.9-1.6 |
| Extracto 7 | 3.6 |
| Extracto 8 | 8.9 |
| Extracto 9 | 8.2 |
| Extracto 10 | 3.7 |
| Extracto 11 | 8.6 |
| Extracto 12 | 8.5 |
| Extracto 13 | 5.1 |

Como puede observarse los mejores rendimientos en extracción de proteínas hidrosolubles a partir del látex natural amoniacoado se obtuvieron por incubación del látex natural con buffer fosfatos y posterior separación de la fase acuosa por ultracentrifugación. El agregado de diferentes tipos de detergentes (SDS, Tritón X 100 y NP 40) incrementó la extracción de proteínas ya que interfieren su interacción con las partículas hidrofóbicas de poliisopreno. De esta manera se solubilizan y pasan a la fase acuosa o *C serum*. Se seleccionó al extracto 8 para su empleo en el desarrollo de los distintos inmunoensayos por contener el

máximo nivel de proteínas. Además esta metodología de extracción fue reproducible ya que al aplicarla a muestras de látex de distinta procedencia permitió obtener extractos con el mismo contenido en proteínas.

Este extracto contiene proteínas que en el látex natural se hayan solubles en el citosol de las células laticíferas, proteínas estructurales adosadas a las partículas de poliisopreno y proteínas que se encuentran en el interior de los lutoides, que son liberadas al citosol durante el almacenamiento del látex en presencia de amoníaco.

El análisis de la composición proteica de los distintos extractos fue realizado por electroforesis SDS-PAGE. En la **figura 28** se muestran los perfiles proteicos de los extractos que resultaron con un mayor contenido en proteínas. Mediante el empleo de geles de poliacrilamida de una concentración del 15 % se lograron separar los principales componentes proteicos. Bandas correspondientes a fracciones proteicas pueden observarse en un amplio rango de pesos moleculares, desde 4-6 kDa hasta mayor de 100 kDa. Las bandas más intensas se encuentran en las zonas de 14 y 17 kDa; no obstante, otras bandas intensas se detectaron en las regiones de 20, 27-33 (27,30,31,33), 40-90 (39, 40, 50, 61,91) kDa y en la zona superior del gel.

Al realizar las electroforesis en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol al 5%) no se obtuvieron perfiles proteicos que difieran respecto de los obtenidos en condiciones no reductoras (resultados no mostrados).

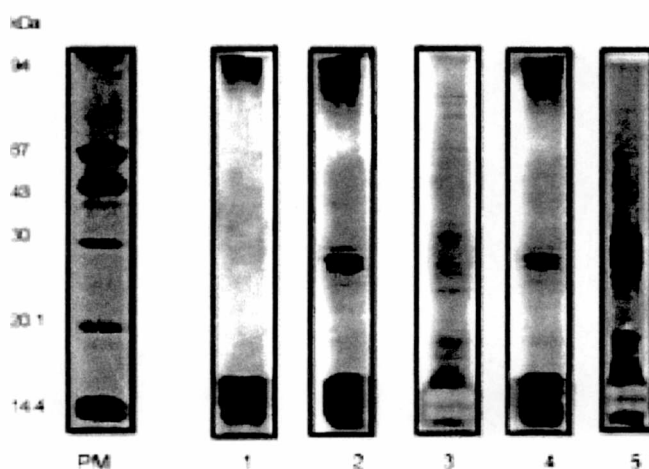


FIGURA 28: Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos obtenidos a partir de látex natural. PM: marcadores de peso molecular; **calle 1:** látex natural amoniacado sin SDS; **calle 2:** látex natural no amoniacado, con SDS; **calle 3:** látex natural amoniacado con SDS; **calle 4:** látex natural amoniacado con NP40; **calle 5:** látex natural amoniacado con Tritón X100 (coloración con plata).

Se puede observar que las bandas en las zonas de 14 y 17 kDa son importantes en todos los extractos mostrados. Sólo habrían diferencias relativas en estos componentes al comparar los distintos detergentes empleados. Las principales diferencias se observan en el resto del perfil, principalmente en la región de 30-60 kDa, donde se hallarían componentes importantes desde el punto de vista alergénico como la hevamina (30 kDa). Los principales alérgenos descritos para el sistema (Hev b1, Hev b5 y Hev b6) estarían presentes en los extractos obtenidos, a juzgar por los PM relativo de las distintas bandas observadas.

Por lo tanto consideramos que el extracto obtenido en presencia de SDS resulta el más apto para el desarrollo de los diferentes métodos inmunoenzimáticos y para la realización de las pruebas cutáneas en pacientes.

2- Análisis de la composición proteica de los extractos obtenidos a partir de productos manufacturados

Como fuentes alternativas para la obtención de proteínas de látex se emplearon diferentes productos manufacturados. Se analizaron distintas marcas de un mismo producto, diferentes lotes de una misma marca y distintos productos de un mismo lote.

Se extrajeron las proteínas hidrosolubles por incubación del producto con buffer fosfatos en presencia de 1% SDS. Se prepararon extractos a partir de los siguientes productos: guantes de distinto tipo (hipoalergénicos, de cirugía, de uso doméstico, etc), catéteres, chupetes, profilácticos, preservativos, gomas elásticas, juguetes de goma, tetinas, etc.

Por la detectabilidad del método de Lowry fue necesario concentrar algunos extractos proteicos, por liofilización y posterior resuspensión en un menor volumen de agua destilada para su análisis.

En la **tabla 7** se muestran los valores del contenido proteico de los distintos extractos obtenidos por el método de Lowry. Se puede observar una gran variabilidad en el contenido de proteínas al comparar los distintos productos.

TABLA 7. Concentración de proteínas de los extractos proteicos obtenidos a partir de productos.

| Productos | Proteínas totales (Lowry) µg/ml | Proteínas totales µg/g producto | Proteínas totales µg/unidad |
|-------------------|--|--|--|
| Guantes | 90-1510 | 46-3560 | 86-3680 |
| Chupetes | 85-125 | 158-210 | 296-367 |
| Globos | 420-1282 | 39-194 | 56-216 |
| Preservativos | 77-657 | 76-874 | 61-1554 |
| Tetinas | 290 | 62 | 24 |
| Bandas elásticas | 167 | 330 | 84 |
| Elásticos | 1606 | 47 | |
| Catéter de teflon | 12 | 29 | 36 |
| Goma Dique | 2060 | 330 | 1020 |
| Juguetes | 566-886 | 225-525 | 122-460 |

Las sustancias vulcanizantes agregadas durante su procesamiento interfieren en la determinación de proteínas por el método de Lowry ya que se obtienen valores de concentración de proteínas sobreestimados o subestimados dependiendo del tipo de producto analizado y del aditivo químico incorporado. Se introdujo una variante al método de Lowry que posibilita eliminar dichas interferencias, consiste en precipitar las proteínas mediante el empleo de ácido tricloroacético y ácido fosfotúngstico. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en medio alcalino (el agregado de deoxicolato favorece la resuspensión) y se le cuantifican proteínas por el método de Lowry (**tabla 8**).

Con el fin de cuantificar proteínas provenientes del látex natural en productos manufacturados se desarrolló un ELISA competitivo secuencial. Para tal fin se preparó un antisuero en conejos sometidos a un plan de inmunización empleando como inmunógeno el extracto proteico obtenido a partir de látex natural amoniacoado en presencia de SDS. Se eligió como dilución de trabajo para el ELISA competitivo (70 % de unión máxima) una dilución 1/110.000 del antisuero.

Para lograr una mayor sensibilidad en el ensayo se realiza un pre-incubación del antisuero, en una dilución 1/110.000 (70 % de unión máxima), con la muestra a analizar. Luego esta mezcla pre-incubada se agrega a las fosas que contienen al antígeno acoplado a la fase sólida. Los anticuerpos específicos anti-proteínas de látex que no formaron complejos inmunes con los antígenos de la muestra se unen al antígeno en fase sólida, lo cual se revela mediante el agregado de un conjugado específico. Para optimizar el ensayo se probaron: distintos tiempos y temperaturas de pre-incubación, distintas concentraciones de antígeno sensibilizante, distintas concentraciones de conjugados, distintos sistemas conjugados, distintas condiciones de tiempo-temperatura de cada incubación.

Para construir una curva de calibración que permita cuantificar las concentraciones de proteínas de látex en las muestras se empleó el extracto de látex obtenido en presencia de SDS. Se le dosó el nivel de proteínas totales por el método de Lowry modificado (para eliminar posibles sustancias interferentes) empleando seroalbúmina bovina como estándar de referencia. Por lo tanto la curva se construyó pre-incubando cantidades conocidas de proteínas de látex (10 pg/ml y 1 mg/ml) con el antisuero. Luego se continuó como fue descripto.

Para linearizar los datos obtenidos de DO correspondientes a las muestras empleadas en la curva standard se aplicó el sistema logit-log. Luego con los valores logit de cada muestra a analizar y por interpolación en la zona recta de la curva, se obtuvieron las concentraciones de proteínas de látex.

El límite de detección del ensayo, aplicando un análisis t de Student, fue de 1 ng/ml, aunque la sensibilidad real fue de 100 ng/ml. Esta característica del inmunoensayo posibilitó el análisis de las muestras sin la necesidad de concentrarlas, lo cual redundó en una mayor exactitud en el valor final obtenido.

Los resultados del contenido de proteínas en los distintos productos obtenidos mediante la aplicación de los métodos de Lowry modificado y ELISA son presentados en la **tabla 8**. Comparando esta tabla con la anterior podemos apreciar que en general los valores de concentración proteica obtenidos mediante el método de Lowry modificado son menores al obtenido mediante la aplicación del método de Lowry sin modificar. Estos resultados indicarían que las sustancias químicas agregadas durante el proceso de vulcanización producen una interferencia aditiva en el valor de concentración proteica obtenida por el método de Lowry.

Por otro lado, el método de ELISA también arrojó valores muy inferiores de concentración de proteínas respecto al Lowry, y esto podría deberse a distintas razones: aquí

las sustancias pro-vulcanizantes adicionadas no son reconocidas por el antisuero por lo cual no se obtienen valores sobreestimados; estas sustancias además podrían interferir en la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, por lo cual las proteínas de látex presentes en los productos no serían reconocidas por los anticuerpos específicos de la misma manera que las proteínas presentes en el látex natural; este método sólo cuantifica proteínas provenientes del látex natural ya que el antisuero empleado fue obtenido inmunizando conejos con el extracto proteico obtenido a partir de látex amoniacado. Es decir que el método de Lowry podría estar dosando proteínas presentes en los productos y que no provienen del látex natural, o que hayan sustancias interferentes que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteau.

TABLA 8. Concentraciones de proteínas de látex en productos manufacturados y extractos comerciales.

| Productos | Conc. proteínas (Lowry mod.) µg/ml | Conc. proteínas (ELISA) µg/ml | Cantidad de proteínas µg/g | Cantidad de proteínas µg/unidad |
|-----------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Profilácticos (marca nacional) | 154-386 | 150-310 | 405-586 | 557-820 |
| Profilácticos importados | 43-295 | 29-201 | 38-740 | 65-1406 |
| Guantes de cirugía | 56-380 | 10-118 | 35-405 | 110-1800 |
| Guantes hipoalergénicos | 66-733 | 55-605 | 133-2099 | 798-31488 |
| Guante "sintético" | 23.4 | 22.1 | 99.3 | 1193 |
| Guantes de uso doméstico | 113-1140 | 110-1175 | 372-2970 | 11160- 83123 |
| Bandas elásticas | 164 | 150 | 232 | 65 |
| Catéter de PVC | 4 | 0.1-1 | | |
| Goma Dique (odontología) | 1055 | 896 | 186 | 569 |
| Chupetes (nac. E importados) | 68-119 | 55-126 | 131-162 | 296-367 |
| Globos | 345-1015 | 250-681 | 21-150 | 20-178 |
| Elásticos | 1991 | 1560 | 39 | |
| Juguetes | 431-750 | 212-658 | 104-348 | 56-155 |

Se puede observar una gran variabilidad en los valores de concentración proteica obtenidos para distintas marcas de un mismo producto y al comparar los distintos productos entre sí. En general el proceso industrial al cual se somete el látex natural no difiere mayormente con respecto al producto final que se desea obtener. La variabilidad entre los distintos procesos reside en los productos químicos adicionados, en las cantidades relativas de los mismos y en los procesos de lavados finales a que son sometidos los productos. Estos lavados son los más eficientes para eliminar a las proteínas del látex. Otra fuente de variabilidad en cuanto al contenido de proteínas en el producto manufacturado es la materia prima. Dependiendo del tipo de látex empleado (amoniacado o no amoniacado, centrifugado o no) y de la zona geográfica del cual proviene, será el contenido cuantitativo y cualitativo en proteínas del látex procesado.

Por lo tanto el producto final obtenido tendrá una cantidad de proteínas de látex muy variable al comparar distintos productos, distintas marcas de un mismo producto e inclusive distintos lotes de un mismo producto. El método de cuantificación inmunoenzimático desarrollado presenta un límite de detección muy bajo (del orden de los ng/ml) y una elevada especificidad, por lo que podemos identificar aquellos productos que contienen proteínas de látex, aún cuando las mismas se encuentren en cantidades ínfimas.

Para que un antígeno se comporte como un alérgeno y desencadene signos clínicos de atopía se requieren cantidades muy pequeñas de proteínas. Esto *a priori* no se puede asegurar ya que dependerá del grado de sensibilización del individuo, del tipo de producto al que se encuentra expuesto y de la vía de sensibilización. Algunos de los productos analizados contienen cantidades del orden de los mg/unidad, por lo cual se los puede considerar riesgosos si son contactados por un individuo alérgico al látex.

Los catéteres actualmente empleados por urología no son manufacturados a partir de látex, sino que son de polímeros sintéticos. Los valores detectados por los métodos de cuantificación de proteínas son muy bajos, y podrían deberse a que estamos trabajando en una zona de la curva donde la sensibilidad no es la adecuada. Al aplicar el método de Lowry modificado la recuperación de cantidades tan pequeñas podría introducir errores adicionales al sistema. Además en la fabricación de estos productos también se emplean sustancias químicas que favorecen la polimerización. Restos de las mismas podrían interferir las reacciones de los métodos.

Con respecto a los guantes hemos observado que en aquellos productos que contienen polvo como lubricante el contenido en proteínas es superior respecto a los que no tienen

polvo. Esto se debe a que el almidón empleado adsorbe proteínas del producto durante su almacenamiento. Por otro lado existen en el mercado productos llamados "sintéticos" y que no contienen látex ("latex free"). En realidad algunos de ellos son guantes de látex recubiertos por una película sintética protectora (cloropreno o Neoprene) y aislante de la piel. Cuando estos guantes son trozados y sometidos a los distintos procedimientos de análisis mencionados podemos detectar cantidades importantes de proteínas de látex, por lo cual estos productos tampoco serían aptos para su uso por pacientes alérgicos. Del mismo modo hemos detectado cantidades significativas de proteínas de látex en guantes llamados "hipoalérgicos" en los cuales sólo se reduce el contenido de proteínas. La cantidad residual de proteínas podría ser suficiente como para sensibilizar a un individuo o desencadenar reacciones alérgicas.

En la **figura 29**, se muestran los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE al analizar los extractos proteicos preparados a partir de distintos tipos de guantes. Se puede observar una gran variabilidad en la composición al comparar los distintos tipos de guantes e inclusive las distintas marcas, lo cual refleja diferencias en el procesamiento industrial.

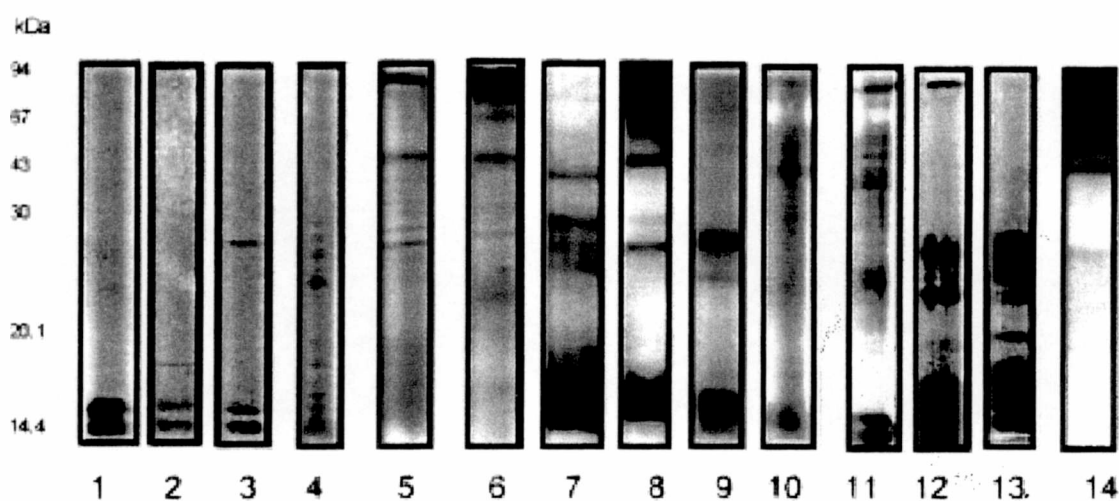


FIGURA 29: Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos obtenidos a partir de guantes de distintos usos. Calles 1 á 7: guantes para cirugía; calles 8 á 11: guantes de uso doméstico; calles 12 y 13: guantes hipoalérgicos, calle 14: guante "sintético" (Coloración con plata).

Como puede observarse los guantes de cirugía mostraron la mayor variabilidad en el contenido de proteínas, detectándose en todos ellos componentes proteicos en las zonas de 14-17 kDa. Por otro lado, los guantes de uso doméstico revelaron componentes en un amplio

rango de PM, observándose también en ellos los componentes de 14-17 kDa. En los guantes llamados "hipoalergénicos" mostrados en las **calles 12 y 13** de la **figura 2** se pueden apreciar bandas muy intensas, principalmente en las zonas de 14, 17 y 30 kDa. En la calle 14 se muestra el perfil proteico correspondiente a un extracto obtenido a partir de guantes sintéticos, en los que se recubre a los guantes de látex con una película sintética (policloropreno) que no contiene proteínas de látex. Sin embargo al trozar al guante se pueden observar proteínas de látex presentes en la matriz poliisoprenica.

También pudimos comprobar las variaciones en el contenido de proteínas de diferentes guantes de un mismo lote y marca (extracto mostrado en la **figura 29, calle 7**). Fueron analizados 10 guantes y se obtuvieron los siguientes valores del contenido de proteínas: 93.2–106.1 µg/g producto por Lowry modificado y 76.2-101.2 µg/g producto por ELISA.

Por lo tanto mediante los inmunoensayos de cuantificación de proteínas de látex y los análisis del contenido proteico de los extractos por SDS-PAGE se puede concluir que los guantes que contienen la menor cantidad de proteínas son ciertas marcas de guantes de cirugía, mientras que los guantes de uso doméstico revelaron el mayor contenido proteico. Respecto a los guantes hipoalergénicos o sintéticos es apreciable la cantidad de proteínas de látex que contienen.

Al analizar la composición proteica por SDS-PAGE de diversos productos manufacturados a partir de látex natural (**figura 30**) también se puede observar una gran variabilidad en los perfiles proteicos. Dado el bajo contenido en proteínas de los extractos y la detectabilidad de la coloración de plata, las muestras debieron ser concentradas para poder visualizar claramente las bandas.

Al comparar los distintos perfiles proteicos se puede observar que las bandas más frecuentes se encuentran en la zona de 30 kDa. En aquellos productos que se cuantificó niveles elevados de proteínas de látex se pudo observar la presencia de componentes proteicos en la zonas de 14-17 kDa. En las **calles 6, 7 y 8** se muestran los perfiles proteicos correspondientes a extractos obtenidos a partir de vegetales en los cuales se han descrito proteínas de reactividad cruzada con componentes de látex.

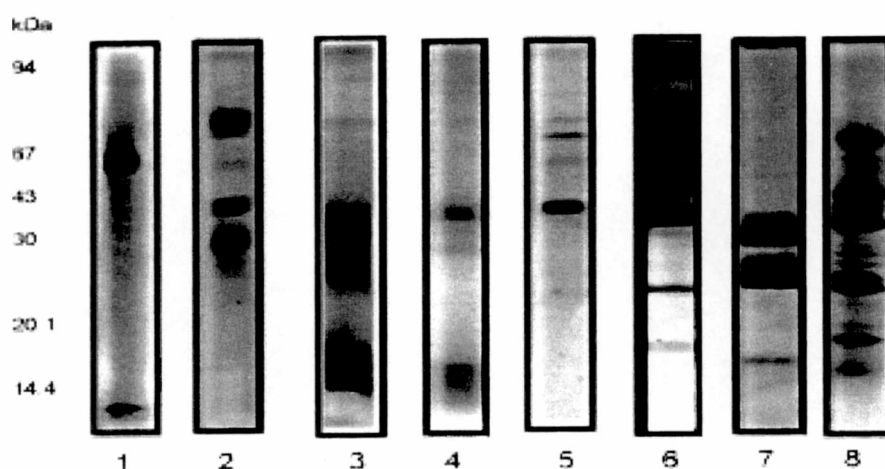


FIGURA 30: Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos obtenidos a partir de distintos productos manufacturados a partir de látex. Calle 1: chupetes, calle 2: tetinas, calle 3: globos, calle 4: goma Dique, calle 5: pelotas de tenis, calle 6: kiwi, calle 7: palta, calle 8: banana. (Coloración con plata).

En las figuras 29 (calles 5, 6, 8, 9 y 11) y 30 (calles 2, 3 y 5) se puede observar una banda de 69 kDa, que no está presente en el látex natural. Se trataría de un neoantígeno que se forma por agregación de componentes de menor PM o por disociación de complejos de elevado PM como consecuencia del procesamiento industrial a que se somete al látex natural.

Los productos manufacturados a partir de látex más frecuentemente contactados por la población son guantes y preservativos. La repetida exposición a los mismos es la responsable de la sensibilización y alergia en aquellos individuos predispuestos. Dado que en el país la única industria que procesa al látex natural es una fábrica de preservativos se decidió analizar la composición de los productos finales, de productos parciales de las distintas etapas industriales de procesamiento y analizar diferentes preservativos que se comercializan en nuestro país y en el exterior.

La determinación de proteínas totales fue realizada empleando el método de Lowry modificado, mientras que el contenido de proteínas de látex se analizó aplicando el ELISA competitivo. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de 9 marcas de preservativos.

TABLA 9. Contenido de proteínas de extractos obtenidos a partir de preservativos

| Preservativos | Lowry modificado | | ELISA cuantitativo | | |
|--------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|-----------|
| | ASTM | | mg/mL | µg/g producto | µg/unidad |
| | mg/mL | µg/g producto | | | |
| Trojan [†] | 0.246 | 736 | 0.201 | 601 | 1250 |
| Ramses [†] | 0.043 | 56 | 0.029 | 38 | 65 |
| Prime* | 0.301 | 622 | 0.196 | 405 | 557 |
| Gold-Circle [†] | 0.121 | 363 | 0.090 | 270 | 475 |
| Tulipan* | 0.386 | 729 | 0.310 | 586 | 820 |
| Amor [†] | 0.047 | 141 | 0.036 | 108 | 172 |
| Syltex* | 0.154 | 462 | 0.150 | 450 | 630 |
| McCondom [†] | 0.165 | 479 | 0.138 | 401 | 581 |
| Life Styles [†] | 0.295 | 824 | 0.265 | 740 | 1406 |

ASTM: American Society for Testing and Materials. [†] Preservativos importados * Preservativos nacionales.

Al comparar la composición proteica de las distintas marcas se puede observar que el procesamiento industrial puede generar productos con un contenido proteico muy diverso (65-1406 µg/unidad). En todos los casos la concentración total de proteínas determinada por el método de Lowry modificado (56- 824 µg/g producto) fue superior a la hallada por el método inmunoquímico (38-740 µg/g producto). La mayor detectabilidad del ELISA competitivo (650 ng/ml) permitió evaluar extractos proteicos con un muy bajo contenido en proteínas. La diferencia entre los resultados hallados por ambos métodos puede deberse también a la presencia de aditivos químicos en los productos manufacturados, que alteran la competición

entre los reactantes (proteínas de látex natural unidas a la fase sólida y proteínas de látex en los productos en fase soluble); además no todas las proteínas presentes en los productos pueden comportarse como antígenos frente al antisuero empleado.

En la **figura 31** se muestra el análisis por SDS-PAGE de la composición proteica de los diferentes extractos proteicos. Dada la baja concentración proteica de las muestras, los extractos tuvieron que ser concentrados para su análisis. Se observan bandas en un amplio rango de PM (7-94 kDa) y una gran variabilidad en los perfiles proteicos obtenidos.

Se pueden observar bandas en las zonas de 7 kDa (línea 8), 14-17 kDa (líneas 5,6,8-10), 30-33 kDa (líneas 2-10), 40 kDa (líneas 4,6,9,10), 69 kDa (líneas 2-4,6-9) y 90 kDa (líneas 3,7,10) de peso molecular. Las bandas más prominentes detectadas en látex natural NRL (14-17, 27-33 kDa y al comienzo del gel) también fueron detectadas en los extractos de los diferentes productos.

A pesar de la dificultad en observar componentes peptídicos por esta técnica una banda débil en la zona de 7 kDa pudo ser observada (línea 8). Además una proteína de 27 kDa, alérgeno importante en pacientes adultos, también fue detectada en algunos productos (figura 1, líneas 2 y 10). Por otra parte un componente de 69 kDa detectado en varios extractos de preservativos no fue revelado por SDS-PAGE en el extracto de látex natural por lo cual se trataría de un neoantígeno.

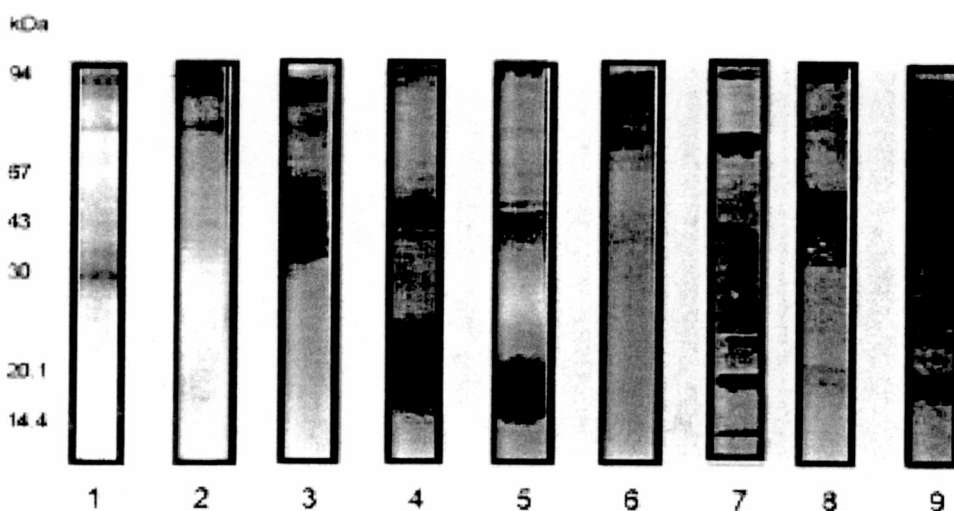


FIGURA 31 - Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos obtenidos a partir de distintas marcas de preservativos. Calle 1: Trojan, calle 2: Ramses, calle 3: Prime, calle 4: Gold Circle, calle 5: Tulipan, calle 6: Amor, calle 7: Siltex, calle 8: McCondom, calle 9: Life Styles. (tinción con plata)

Por lo tanto a pesar de las similitudes en los procesos de vulcanización empleados para el tratamiento del látex natural se obtienen productos manufacturados con una composición proteica muy disímil. La variabilidad en los procesos industriales reside en los aditivos adicionados y lavados realizados. Los productos manufacturados mostraron un contenido proteico inferior al del látex natural, observándose componentes que no se alteran durante su procesamiento, otros que se crean por degradación o agregación, y otros que desaparecen.

Los procesos de lavado a que son sometidos los productos luego de pasar por el horno de vulcanización permiten eliminar un gran número de componentes proteicos. Esto se evaluó mediante el análisis de muestras tomadas en distintas etapas del procesamiento industrial: antes y después de la vulcanización, luego de un lavado con agua/detergente, y luego de un lavado con agua caliente. En la **figura 32** se muestran los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE de los extractos preparados a partir de los distintos productos.

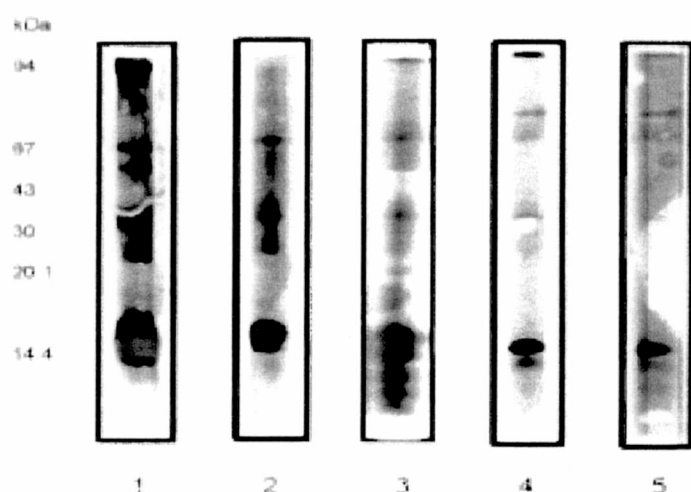


FIGURA 32: Análisis por SDS-PAGE de extractos preparados a partir de profilácticos obtenidos en distintas etapas de su procesamiento industrial. **Calle 1:** látex natural amoniacado (materia prima), **calle 2:** etapa post-vulcanización, **calle 3:** etapa post-lavado con agua/detergente, **calle 4:** etapa post-lavado con agua caliente (producto final).

Se puede apreciar que el contenido de proteínas del producto disminuye gradualmente al avanzar en las sucesivas etapas de procesamiento a que es sometido el látex natural. Se observa que el proceso de vulcanización inicial no elimina los componentes mayoritarios, mientras que al someter el producto a los distintos lavados se logra eliminar principalmente a los componentes de 14 y 30 kDa. Asimismo podemos observar que como consecuencia de

estos lavados aparece la banda de 69 kDa, que correspondería a un neoantígeno. Esta banda también fue observada en otros productos.

Por lo tanto las etapas de lavado serían importantes para la reducción de proteínas residuales en productos manufacturados a partir de látex natural.

3- Determinación de IgE específica

Los extractos proteicos obtenidos a partir de látex natural y productos manufacturados fueron empleados para el desarrollo de inmunoensayos para la identificación de IgE específica en el suero de pacientes. Se desarrollaron diferentes métodos sensibilizando las fases sólidas con los extractos. Se emplearon distintas fases sólidas y formatos: plásticos especiales (ELISA), papeles de celulosa (EAST) y papeles de nitrocelulosa (dot-blot e immunoblotting). Se optimizaron ensayos de screening (ELISA, EAST y dot blot) y confirmatorios (immunoblotting).

Se analizaron sueros de individuos normales, alérgicos a alérgenos no relacionados con el látex y de alérgicos al látex (en base a la historia clínica). A todos los sueros se les cuantificó el nivel de IgE total por ELISA como fue descrito anteriormente.

3.1. ELISA

Se desarrolló un ELISA indirecto acoplado a la fase sólida (plásticos especiales con alta capacidad de unión de proteínas) los distintos extractos que contienen los alérgenos a estudiar para detectar la capacidad de unión de la IgE sérica. Por lo tanto este ensayo permitió identificar la presencia de IgE específica contra la totalidad de los alérgenos.

Para todos los extractos analizados con 1 µg de proteína por fosa (100 µl) el antígeno se encuentra en exceso, por lo cual la presencia de IgG específica no interfiere en la determinación de IgE y los blancos obtenidos al analizar sueros de individuos normales no dificultan la interpretación de los resultados correspondientes a los sueros positivos.

Como sistema de bloqueo y diluyentes de sueros y conjugados, se empleó suero de caballo 5% en buffer fosfatos pH 7.4.

Los sueros analizados se emplearon en diluciones 1/2 ó 1/4. Se emplearon sueros de individuos normales no atópicos, pacientes alérgicos al látex y pacientes alérgicos a otros alérgenos no relacionados con el látex (basicamente drogas).

En cuanto a las condiciones de tiempo-temperatura de incubación se determinó que se requiere entre 6 y 12 horas de incubación a temperatura ambiente para obtener resultados finales de DO en la zona de mayor sensibilidad de la curva de cuantificación.

El revelado de la IgE unida al antígeno se realizó empleando distintos conjugados: anti cadena ϵ humana (monoclonal y policlonal) conjugados a peroxidasa y fosfatasa alcalina; anti cadena ϵ humana biotilado y streptavidina-peroxidasa de rábano. Las mejores condiciones se obtuvieron con un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina 1/2000 durante 6 horas a temperatura ambiente. El revelado se realizó empleando como sustrato p -nitrofenilfosfato de sodio 5.5 mM (30 minutos a 37 °C). La reacción se detiene con NaOH 20mM y se lee DO a 405 nm.

El valor de corte del ELISA del ensayo se obtuvo a partir del análisis de los sueros del grupo control (media + 3 DE.).

Para la optimización del ensayo se probaron distintas concentraciones de l antígeno en fase sólida, distintas diluciones de los sueros y anticuerpos conjugados y distintos tiempos y temperaturas de incubación.

3.2. EAST

La determinación de IgE específica también se realizó por EAST. Se activaron papeles de celulosa con CNBr y se les acopló en forma covalente proteínas de látex proveniente del látex natural y de distintos productos manufacturados.

Los extractos proteicos empleados para detectar la unión de IgE específica fueron látex natural y productos manufacturados. En cada caso se analizó la concentración proteica a emplear de tal forma que no se obtengan blancos elevados que dificulten la interpretación de los resultados y que no se detecte IgE sérica en defecto. Dado que la IgE total se encuentra en concentraciones muy bajas en el suero (del orden de los ng/ml) y la IgE específica representa aproximadamente el 10 % de la IgE total, los sueros fueron analizados sin diluir o diluidos 1/2 e incubados durante 12 horas a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones la concentración de IgG específica es muy superior a la de IgE.

Para la cuantificación de anticuerpos específicos se empleó el sistema descrito de *Dermatophagoides* y se expresó el resultado en clases. Las curvas dosis-respuesta de ambos sistemas (al emplear un "pool" de sueros positivos para cada uno) se comportan en forma paralela por lo cual el comportamiento de los sueros al diluirlos es similar. Esto permite

interpolarse en la curva de *Dermatophagoides* las DO obtenidas con el sistema de látex para la obtención del resultado final en clases.

En la **tabla 10** se presentan los resultados correspondientes a los valores hallados de IgE total (ELISA) y de IgE específica séricas (EAST y ELISA) contra proteínas del látex para la totalidad de los sueros analizados. Los resultados son mostrados por grupos de pacientes.

Para el **grupo I** (pacientes poliquirúrgicos) el 39.3 % (11/28) de los sueros presenta IgE total elevada de los cuales el 52.9% (9/17) presenta IgE específica para proteínas de látex por ambos métodos. Con respecto del **grupo II** (trabajadores relacionados con la Salud), el 38.7 % (35/98) presenta niveles de IgE total superior al normal, de los cuales el 48.6 % (17/35) presenta IgE específica por EAST y ELISA. Para el **grupo III** (pacientes ambulatorios que concurren al Servicio de Alergia) se obtuvieron niveles de IgE total superior al normal en el 74.8 % (92/123) de los casos, de los cuales el 25 % (23/92) presentó IgE específica. De los sueros analizados del grupo control (**grupo IV**) ninguno presentó IgE total elevada ni IgE específica para proteínas de látex. Por lo tanto de los sueros con IgE elevada analizados (144) el 34 % presentó IgE específica para proteínas de látex, lo cual constituye al grupo de individuos atópicos en un grupo de riesgo.

TABLA 10. Resultados del análisis de IgE total y específica de la totalidad de los sueros estudiados.

| Grupos | Número de pacientes | Pacientes con niveles de IgE total | | Pacientes con IgE específica | |
|--------|---------------------|------------------------------------|--------------|------------------------------|-------------|
| | | normal | elevado | RAST | ELISA |
| I | 28 | 11 | 17 (60.7 %)* | 9 (32.1 %)* | 9 (32.1 %)* |
| II | 98 | 63 | 35 (35.7 %) | 17 (17.3 %) | 17 (17.3 %) |
| III | 123 | 31 | 92 (74.8 %) | 23 (18.6 %) | 23 (18.6 %) |
| IV | 60 | 60 | 0 | 0 | 0 |

* Porcentajes referidos al número total de pacientes de cada grupo.

El control de la especificidad de los ensayos se analizaron sueros (28) de pacientes atópicos a alérgenos que no dan reacción cruzada con proteínas de látex (leche, huevo, penicilina, sulfamethoxazol, *Dermatophagoides*, epitelio de gato y perro), según la bibliografía. Estos sueros mostraron IgE total elevada y no se detectó IgE específica para proteínas de látex. Algunos de estos sueros están incluidos en el grupo III.

En las **tablas 11 y 12** se muestran los resultados de los análisis individuales de los sueros en los que se detectó IgE específica para proteínas de látex. En la **tabla 11** se presentan los resultados correspondientes a todos los sueros analizados del grupo I, mientras que la **tabla 12** sólo incluyen los resultados de los sueros positivos para los grupos II y III. Se puede observar que todos los sueros que demostraron la presencia de anticuerpos IgE específicos por EAST (clase 2 á 4) también fueron positivos por ELISA (DO superior al valor de corte del sistema) y viceversa. Además todos los sueros positivos presentan niveles de IgE total superior al normal según la edad.

Se eligieron 10 sueros positivos de los distintos grupos y se les determinó IgE específica mediante el empleo de un kit comercial (CAP System de PHARMACIA). Se trata de un equipo automatizado donde la fase sólida es un plástico sensibilizado con proteínas de látex. Este ensayo está considerado como el método internacional de referencia. En todos los casos se confirmó la presencia de IgE específica para látex. Estos resultados están incluidos en las **tablas 11 y 12**.

Como puede observarse para el grupo I el número total de cirugías a las que son sometidas los pacientes no es tan elevado como en países desarrollados. Este factor podría incidir en la sensibilización de los pacientes, y sería una de las razones por la cual los valores de prevalencia que hemos hallado son menores a los informados en otros países. A todos estos pacientes se les realizó la cirugía reparadora de la malformación del tubo neural en los primeros días de vida. En los sueros en que se realizó la determinación de IgE específica por los 3 métodos (EAST, ELISA y CAP) la coincidencia entre los resultados hallados fue absoluta.

Seis sueros pertenecen a individuos atópicos (IgE total superior al valor normal), sin embargo no refirieron antecedentes de atopía al exponerse a productos manufacturados con látex. En ninguno de ellos se detectó la presencia de IgE específica por los métodos ensayados. Por lo tanto en estos casos la atopía no resulta un factor predisponente para desencadenar fenómenos de alergia.

TABLA 11. Datos de los pacientes pertenecientes al Grupo I

| Paciente | Edad (años) | IgE total (UI/mL) | IgE esp. EAST (clase) | IgE esp. ELISA (OD ₄₀₅) | IgE esp. CAP System (KUI/mL-clase) | Nro. de cirugías | Signos clínicos * |
|---------------|-------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 8 | 1360 | 4 | 1.100 | 1.18-2 | 1 | IA |
| 2 | 4 | 192 | 4 | 0.850 | | 3 | IA |
| 3 | 9 | 116 | 2 | 0.551 | 14.2-3 | 11 | U |
| 4 | 4 | 150 | 2 | 0.485 | 2.56-2 | 2 | NS |
| 5 | 5 | 118 | 2 | 0.610 | | 3 | NS |
| 6 | 12 | 230 | 3 | 0.820 | | 9 | PA |
| 7 | 13 | 112 | 2 | 0.457 | | 3 | NS |
| 8 | 2 | 130 | 3 | 0.801 | | 2 | NS |
| 9 | 5 | 323 | 2 | 0.433 | | 3 | NS |
| 10 | 10 | 1215 | 0 | 0.143 | | 5 | NS |
| 11 | 4 | 72 | 0 | 0.119 | | 3 | NS |
| 12 | 12 | 23 | 0 | 0.120 | | 2 | NS |
| 13 | 5 | 53 | 0 | 0.128 | | 3 | NS |
| 14 | 6 | 135 | 0 | 0.136 | | 2 | NS |
| 15 | 17 | 62 | 0 | 0.144 | | 23 | NS |
| 16 | 1 | 36 | 0 | 0.124 | | 5 | NS |
| 17 | 24 | 42 | 0 | 0.102 | | 15 | NS |
| 18 | 2 | 25 | 0 | 0.120 | | 2 | NS |
| 19 | 14 | 98 | 0 | 0.126 | | 2 | NS |
| 20 | 14 | 85 | 0 | 0.151 | | 4 | NS |
| 21 | 13 | 153 | 0 | 0.162 | | 11 | NS |
| 22 | 5 | 116 | 0 | 0.211 | | 10 | NS |
| 23 | 2 | 119 | 0 | 0.201 | | 2 | NS |
| 24 | 13 | 26 | 0 | 0.198 | | 11 | NS |
| 25 | 6 | 116 | 0 | 0.123 | | 2 | NS |
| 26 | 14 | 25 | 0 | 0.122 | | 4 | NS |
| 27 | 7 | 95 | 0 | 0.151 | | 2 | NS |
| 28 | 10 | 56 | 0 | 0.122 | | 1 | NS |
| Cutoff | | | 0 | 0.279 | 1 | | |

* **Signos clínicos:** IA: anafilaxis intraoperatoria; U: urticaria; PA: asma post-operatoria; NS: sin signos clínicos

TABLA 12. IgE total y específica de los sueros positivos pertenecientes a los Grupos II y III

| Paciente | Edad (años) | IgE total (UI/mL) | IgE esp. EAST (clase) | IgE esp. ELISA (DO 405) | IgE esp. Pharmacia # | Signos clínicos |
|----------|-------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| 1* | 39 | 116 | 3 | 0.807 | | Anafilaxis penicilina |
| 2* | 30 | 118 | 2 | 0.510 | 1.10 - 2 | Dermatitis guantes |
| 3 | 23 | 112 | 2 | 0.861 | | Angioedema, urticaria |
| 4* | 28 | 128 | 3 | 0.522 | 2.96 - 2 | Rinitis |
| 5 | 18 | 182 | 2 | 0.390 | | ND |
| 6 | 45 | 218 | 3 | 0.420 | | ND |
| 7 | 39 | 119 | 2 | 0.453 | | ND |
| 8 | 26 | 128 | 3 | 0.406 | | ND |
| 9 | 45 | 116 | 3 | 0.485 | | ND |
| 10 | 22 | 192 | 3 | 0.820 | | Dermatitis |
| 11* | 30 | 148 | 3 | 1.160 | 3.70 - 3 | Prurito, urticaria |
| 12 | 35 | 65 | 2 | 0.360 | | Asma, rinitis |
| 13 | 40 | 450 | 2 | 0.367 | | Dermatitis, angioedema |
| 14* | 24 | 123 | 2 | 0.431 | 1.55 - 2 | Dermatitis guantes |
| 15* | 22 | 125 | 3 | 0.911 | 3.73 - 3 | Rinitis, prurito |
| 16* | 32 | 324 | 3 | 0.556 | 3.18-3 | Asma |
| 17* | 21 | 255 | 3 | 0.366 | 1.62-2 | Rinitis |
| 1 | 23 | 620 | 2 | 0.675 | | Asma |
| 2 | 5 | 1310 | 2 | 0.483 | | ND |
| 3 | 6 | 1210 | 2 | 0.459 | | Asma |
| 4 | 12 | 198 | 2 | 0.403 | | Rinitis |
| 5 | 35 | 1840 | 3 | 0.516 | | ND |
| 6 | 3 | 160 | 2 | 0.428 | | Urticaria, angioedema globos |
| 7 | 25 | 162 | 2 | 0.429 | | Dermatitis guantes |
| 8 | 17 | 173 | 2 | 0.430 | | ND |
| 9 | 9 | 285 | 3 | 0.789 | | Rinitis, asma |
| 10 | 6 | 243 | 2 | 0.652 | | Rinitis |
| 11* | 27 | 118 | 2 | 0.425 | 1.86 - 2 | Urticaria, angioedema guantes |
| 12* | 48 | 236 | 2 | 0.418 | 3.27-2 | Prurito, urticaria |
| 13 | 42 | 2140 | 3 | 1.130 | | Asma |
| 14 | 18 | 1030 | 3 | 0.920 | | ND |
| 15 | 18 | 196 | 2 | 0.410 | | ND |
| 16* | 38 | 109 | 3 | 0.790 | 3.80-3 | Urticaria, angioedema preservativos |
| 17 | 26 | 116 | 3 | 0.750 | | Urticaria, angioedema |
| 18 | 25 | 243 | 2 | 0.405 | | Asma |
| 19* | 20 | 118 | 2 | 0.410 | 2.41-2 | Prurito, urticaria guantes |
| 20 | 23 | 152 | 2 | 0.423 | | Prurito, urticaria guantes |
| 21 | 18 | 285 | 2 | 0.398 | | Urticariageneraliz. guantes |
| 22* | 50 | 116 | 2 | 0.428 | | Urticaria por banana |
| 23 | 21 | 152 | 2 | 0.398 | | Asma |
| Cutoff | | | 0 | 0.279 | 1 | |

* Sueros de pacientes testificados por prueba cutánea con extracto de látex natural. ND: no se dispone de datos. # IgE específica por CAP System de Pharmacia, expresado en KUI/ml - clase

En los grupos II y II están incluidos sueros de individuos alérgicos a otros alérgenos, algunos de los cuales revelaron la presencia de anticuerpos IgE específicos para proteínas del látex.

Al analizar los datos de prevalencia hallados para estos grupos se debe considerar que entre las proteínas del látex y proteínas de numerosos alimentos existe reactividad cruzada. En pacientes de corta edad, donde la prevalencia de la alergia alimentaria se encuentra incrementada, este hecho debe ser considerado ya que los valores hallados pueden estar sobrestimados. También se ha descrito una marcada reactividad cruzada con profilinas que se hallan en diversas frutas y en pólenes de ciertos vegetales. Dado que en nuestra ciudad la sensibilización a pólenes de diversas plantas es muy marcada en pacientes adultos los métodos aplicados no permitirían diferenciar si los anticuerpos detectados son específicos de proteínas de látex o de otros antígenos relacionados. Por otra parte el grupo III incluye a los pacientes que concurren al Servicio de Alergia para su asistencia, por lo cual el porcentaje de individuos alérgicos es muy elevado.

Para estos grupos también se obtuvo una completa correlación en los resultados hallados por los 3 métodos aplicados (EAST, ELISA y CAP). El 95.5 % de los sueros positivos tuvo una historia clínica compatible con una alergia al látex. Sin embargo, numerosos sueros no mostraron la presencia de IgE específica aunque su historia clínica revela signos de alergia frente a la exposición productos manufacturados. Estos signos clínicos pudieron haber sido originados por mecanismos no dependientes de las IgE

La presencia de proteínas alergénicas del látex en preservativos fue analizada por EAST y ELISA y en las **tablas 8 y 9** se presentan los resultados hallados. El poder alergénico de las proteínas anteriormente descritas fue estudiado mediante su capacidad de unión a IgE sérica (EAST, ELISA e inmunoblotting) y a IgE presente en la superficie de células inflamatorias (prueba cutánea)

Los sueros empleados fueron los siguientes:

- grupo control: individuos no atópicos y sin signos clínicos de alergia al contactar productos de látex (40).
- pool de sueros positivos con IgE específica para proteínas de látex natural (30 sueros).

- sueros de individuos con historia clínica de alergia al exponerse a preservativos (9). Son descriptos en la **tabla 13**.

TABLA 13. Datos de pacientes alérgicos a preservativos de látex.

| Paciente | Edad (años) | Sexo | Prueba cutánea # | IgE total (UI/mL) | IgE esp. látex | | IgE esp. preservat | | Signos clínicos † |
|----------------|-------------|------|------------------|-------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|-------------------|
| | | | | | EAST (clase) | ELISA (DO 405) | EAST (clase) | ELISA (DO 405) | |
| 1 | 19 | F | Positiva | 92 | 3 | 1.56 | 3 | 0.988 | U, P+ |
| 2 | 23 | F | Positiva | 78 | 2 | 0.855 | 2 | 0.822 | O, P |
| 3 | 23 | F | Positiva | 816 | 3 | 0.923 | 2 | 0.755 | P |
| 4 | 17 | F | Positiva | 117 | 3 | 0.610 | 3 | 0.551 | V |
| 5 | 45 | F | Positiva | 155 | 3 | 1.86 | 3 | 0.966 | U, P |
| 6 | 31 | M | Negativa | 25 | 0 | 0.199 | 0 | 0.226 | P,E |
| 7 | 38 | M | Negativa | 18 | 0 | 0.191 | 0 | 0.220 | P |
| 8 | 55 | F | Negativa | 34 | 0 | 0.115 | 0 | 0.210 | O |
| 9 | 41 | F | Negativa | 55 | 0 | 0.223 | 0 | 0.155 | U, P |
| Pool positivo | | | | 1150 | 3 | 2.152 | 3 | 1.210 | |
| Suero Negativo | | | | < 60 | 0 | 0.279 | 0 | 0.305 | |

Prueba cutánea empleando extracto de látex natural. * Se empleó el extracto mostrado en la línea 6 de la figura 3 para sensibilizar la distintas fases sólidas. † Signos clínicos localizados: U: urticaria; P: prurito; O: edema; V: vulvovaginitis; E: eritema. + Este paciente presentó una urticaria gigante

El extracto empleado para el desarrollo de los métodos inmunoenzimáticos fue el obtenido a partir de los preservativos manufacturados en la fábrica que nos proveyó del látex natural. Además este producto es el que mayormente contacta la población en nuestro medio y su contenido en proteínas es muy similar al del látex natural.

Se puede observar que 5 de los 9 sueros analizados mostraron la presencia de anticuerpos específicos por ambos métodos, por lo cual las diferentes formas de sensibilización de proteínas a las fases sólidas no alteran mayormente los epitopes presentes en los alergenos. Además estos 5 sueros pertenecen a pacientes en los cuales la presencia de anticuerpos IgE específicos sensibilizantes fue demostrada *in vivo*. En los 4 sueros restantes con historia clínica de atopía al contacto con preservativos, no fue posible demostrar la presencia de anticuerpos IgE específicos por métodos *in vitro* ni *in vivo* por lo cual en estos los signos clínicos observados no estarían causados por mecanismos de hipersensibilidad Tipo I.

Para analizar la presencia de proteínas alergénicas en los otros preservativos estudiados se desarrollaron ELISA sensibilizando la fase sólida con cada extracto descrito anteriormente. Como fuente de IgE específicas se emplearon los 5 sueros en los que se detectó la presencia de IgE específica y que fueron descritos en la **tabla 13**.

En la **tabla 14** se muestran las DO de los ELISA. Empleando un "pool" de sueros negativos se puede obtener el valor basal de los ensayos, por encima de los cuales se estaría detectando la presencia de IgE específica.

TABLA 14. Determinación por ELISA de anticuerpos IgE específicos para proteínas de látex en diferentes preservativos

| <i>Preservativos</i> | <i>Sueros</i> | | | | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | <i>Pool positivo</i> | <i>Suero negativo</i> | <i>Suero 1</i> | <i>Suero 2</i> | <i>Suero 3</i> | <i>Suero 4</i> | <i>Suero 5</i> |
| Mc Condom | 0.501 | 0.250 | 0.290 | 0.368 | 0.301 | 0.396 | 0.401 |
| Trojan | 0.986 | 0.220 | 1.105 | 0.586 | 0.670 | 0.810 | 0.885 |
| Gold-Circle | 1.015 | 0.231 | 1.218 | 1.050 | 0.905 | 0.981 | 0.996 |
| Life Styles | 1.121 | 0.228 | 1.005 | 0.860 | 0.380 | 0.796 | 0.445 |
| Amor | 0.461 | 0.256 | 0.310 | 0.321 | 0.310 | 0.361 | 0.332 |
| Tulipan | 1.118 | 0.210 | 1.218 | 0.310 | 0.470 | 0.578 | 0.755 |
| Ramses | 0.998 | 0.251 | 1.118 | 0.778 | 0.320 | 0.445 | 0.556 |
| Prime | 0.969 | 0.268 | 1.008 | 0.396 | 0.530 | 0.421 | 0.441 |

Se puede concluir que los sueros de los pacientes con clínica compatible con alergia al látex de los preservativos detectaron componentes con capacidad de unir IgE en todos los extractos de preservativos analizados. Estos resultados reflejan además variaciones en la composición alérgica de cada extracto y en la respuesta inmune humoral de cada individuo.

3.3. Immunoblotting

La caracterización individual de la capacidad de unión de los componentes del látex a la IgE sérica se realizó por immunoblotting empleando como antígenos el extracto proteico obtenido a partir de látex natural amoniaco en presencia de SDS y los obtenidos a partir de diferentes productos manufacturados.

Sueros del grupo de pacientes no atópicos fueron empleados como controles negativos, mientras que el control de transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó empleando un colorante de proteínas (Ponceau S) o revelando el immunoblotting con el antisuero específico obtenido en conejo. Las proteínas separadas y reveladas en los geles SDS-PAGE fueron detectadas en la membrana de nitrocelulosa transferida.

Cuando se empleó como antígeno el extracto obtenido a partir de látex natural amoniaco para analizar las reactividades IgE de los sueros provenientes de los pacientes de los distintos grupos de riesgo se observó que presentan perfiles similares (**figura 33**). Las bandas de mayor intensidad son las de 14 y 17 kDa. Menores reactividades se observan en las zonas de pesos moleculares relativos de 27-33 y 40-67 kDa. Bandas en regiones de PM menor a 10 kDa sólo se observaron con un suero (**línea 3**), y en la región entre 24 y 27 kDa, con los sueros mostrados en las **calles 3 y 9**. Sólo se muestran en la figura los resultados de algunos sueros representativos del total analizado.

Al comparar los perfiles de reactividad IgE entre los diferentes grupos de riesgo se puede observar que en el grupo I todos los sueros revelan proteínas en las zonas de 14-17 kDa y 30-33 kDa; respecto al grupo II también la totalidad de los sueros muestran reactividades contra proteínas con PM en las regiones de 14-17 kDa y 30-33 kDa, pero además detectan componentes con PM de 67, 81 y mayor kDa (**calles 5,6 y 7**). Para el caso de los sueros del grupo III todos revelan proteínas en la zona de 14-17 kDa, aunque también pueden detectarse reactividades en zonas de mayor PM (**calles 11 y 13**). Por lo tanto no observamos patrones de

reactividad diferenciales, por immunoblotting, entre los distintos grupos de riesgo, ni entre pacientes adultos y niños, como describe la bibliografía internacional.

Puede observarse que todos los sueros reconocen componentes en la región de 14 kDa, por lo cual constituiría el alérgeno principal del sistema. Además, todos los sueros que revelaron la presencia de IgE específica por EAST y ELISA mostraron reactividad por immunoblotting.

Los mismos patrones de reactividad se observaron al trabajar en condiciones reductoras o no reductoras (resultados no mostrados).

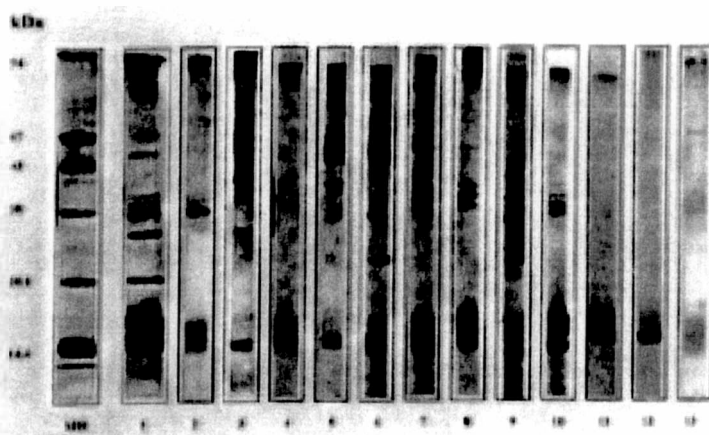


FIGURA 33: Análisis por SDS-PAGE e immunoblotting de la reactividad IgE sérica frente a componentes del látex natural. MW: marcadores de peso molecular; calle 1: perfil proteico por SDS-PAGE de látex amoniacado; calles 2-13 : IgE immunoblottings del extracto de látex revelado con sueros de pacientes del grupo I (2-4), grupo II (5-9) y grupo III (10-13).

La presencia de componentes proteicos con capacidad de unir IgE sérica en productos manufacturados fue analizada en extractos obtenidos a partir de preservativos (**figura 34**). Dada la baja concentración de proteínas y la dificultad en obtener bandas nítidas sólo se realizó el immunoblotting con el extracto mostrado en la **calle 5** de la **figura 34**, para lo cual debió ser concentrado. El revelado con sueros negativos no mostró reactividad alguna (**calle 3**), mientras que el “pool” de sueros positivos para proteínas de látex reveló bandas en las zonas de 14 y 30 kDa (**calle 2**). Se emplearon sueros de pacientes con sintomatología desencadenada por el contacto con profilácticos (**calles 4 á 8**) los que revelaron componentes con PM de 14, 29, 30, 67, 69 y 94 kDa con capacidad de unir IgE. La banda en la zona de 69

kDa observada en el perfil proteico correspondiente al extracto empleado como antígeno sólo fue reconocida por uno de los sueros empleados (**calle 7**). También se emplearon sueros de pacientes con sintomatología asociada al látex y presentan IgE que reconoce componentes de 14 y 30 kDa. Los sueros que no revelaron IgE específica para proteínas de látex presentes en profilácticos por EAST o ELISA tampoco fueron reactivos por inmunoblotting. Por otro lado se analizaron 4 sueros de pacientes con sintomatología asociada al contacto con profilácticos (**tabla 13**) los que no mostraron IgE específica por EAST, ELISA e inmunoblotting. Por lo tanto los signos clínicos observados estarían originados por mecanismos de hipersensibilidad no mediados por IgE.

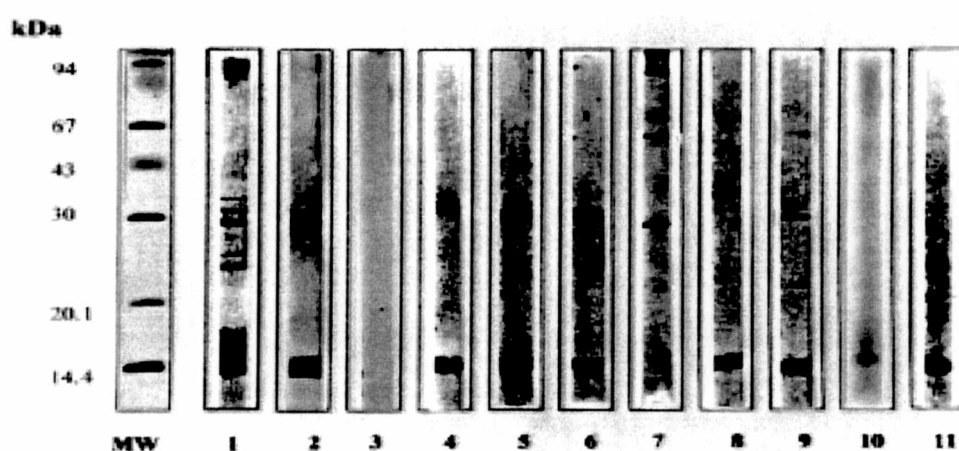


FIGURA 34 – Análisis por inmunoblotting de la reactividad IgE sérica frente a proteínas del látex presentes en preservativos MW: marcadores de peso molecular; **calle 1**: látex natural revelado con un pool de sueros positivos; **calles 2-11**: reactividad IgE de preservativos revelada con: un pool de sueros positivos (**calle 2**), un pool de sueros negativos (**calle 3**); sueros de pacientes alérgicos a preservativos (**calles 4-8**) y sueros de pacientes alérgicos al látex (**calles 9-11**).

En conclusión, la mayoría de las proteínas observadas en los preservativos analizados provendrían del látex natural ya que sueros de individuos alérgicos al látex son capaces de reconocerlas en ambos sistemas. Los epitopes reconocidos en el antígeno de 69 kDa estarían presentes en componentes del látex natural, ya que también fueron reconocidos por el antisuero obtenido contra proteínas del látex natural.

El empleo del antisuero obtenido contra proteínas de látex natural permitió revelar por inmunoblotting la presencia de proteínas residuales en distintos productos manufacturados

(figura 35). En todos los productos analizados se pudieron detectar componentes con PM en la región de 30 kDa, mientras que el componente de 14 kDa mostró una marcada antigenicidad en guantes. Además se observa que la fracción proteica de 69 kDa, también se encuentra presente en numeroso productos y es reconocida por el antisuero. Esto indica que se trataría de un neoantígeno formado a partir de componentes presentes en el látex natural.

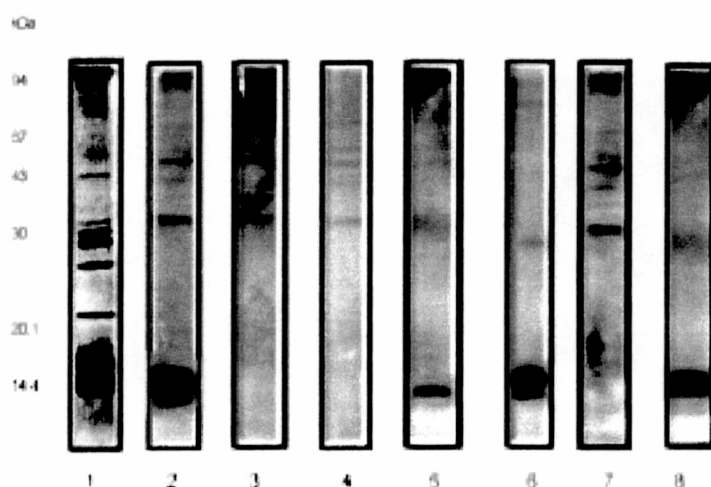


FIGURA 35: Análisis por inmunoblotting de la antigenicidad de distintos productos manufacturados a partir de látex natural. Calle 1: SDS-PAGE de látex natural, calles 2 á 8: inmunoblottings revelados con el antisuero anti-proteínas de látex , calle 2: guantes de cirugía, calle 3: pelotas de tenis, calle 4: tetinas, calle 5: guantes domésticos, calle 6: globos, calle: 7: chupete, calle 8: guante hipoalergénico.

En la figura 36 se muestran los inmunoblotting de diferentes productos revelados con un “pool” de sueros de pacientes alérgicos al látex. Se detectaron componentes capaces de unir IgE con PM en las zonas de 14, 17, 30-43, 60-69 y 94 kDa, lo cual demuestra la alergenidad del neoantígeno de 69 kDa.

Por lo tanto algunas de las proteínas del látex natural son capaces de resistir el proceso de vulcanización, mientras que otras desaparecen o se modifican. Estas proteínas residuales mantienen su capacidad de unir IgE por lo cual pueden desencadenar procesos alérgicos cuando un individuo sensibilizado contacta a estos productos.

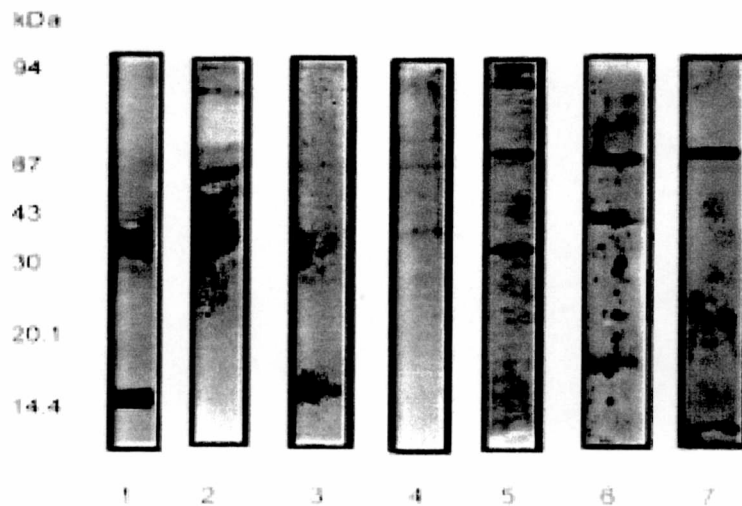


FIGURA 36: Análisis por inmunoblotting de la reactividad IgE de distintos productos manufacturados a partir de látex natural (revelados con un pool de sueros de pacientes atópicos). Calle 1: guante hipoalergénico, calle 2: pelota de tenis, calle 3: globos, calle 4: tetinas, calles 5 á 7: guantes de cirugía.

Prueba cutánea

El extracto proteico obtenido a partir de látex natural fue empleado en prueba cutánea luego de ser caracterizado y empleado en un estudio poblacional preliminar. Se empleó prick test para testificar pacientes de los diferentes grupos de riesgo identificados y en la **tabla 10** se presentan los resultados hallados. No se le realizó prick test a la totalidad de los pacientes por las siguientes razones:

- en el estudio inicial no se realizó prueba cutánea ya que el extracto no había sido caracterizado
- por ser menores de 2 años
- la administración de corticoides o antihistamínicos que invalidan los resultados
- lesiones en la piel que imposibilitan la visualización e interpretación del resultado
- cuando la historia clínica indicara riesgo de reacciones anafilácticas al contactar proteínas de látex

En la **tabla 15** se presentan resultados de IgE específicas para proteínas del látex y pruebas cutáneas con el extracto de látex.

TABLA 15. Datos de prueba cutánea y determinación de IgE específica para proteínas de látex natural

| Grupo | Pacientes # | IgE + * | PC + † | IgE + y PC + | IgE + y PC - | IgE - y PC + | IgE - y PC - |
|-------|-------------|---------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| I | 64 | 24 | 13 | 11 | 5 | 2 | 13 |
| II | 163 | 32 | 14 | 12 | 2 | 2 | 28 |
| III | 186 | 26 | 18 | 6 | 1 | 12 | 52 |
| Total | 413 | 82 | 45 | 29 | 8 | 16 | 93 |

Total de pacientes de cada grupo estudiados hasta la fecha

* IgE específicas positivas para proteínas de látex realizadas por EAST y ELISA. † PC: prueba cutánea por Prick test con el extracto proteico de látex natural

Para el grupo I sólo a 31 pacientes se les realizó determinación de IgE específica y prueba cutánea (PC) ya que muchos de ellos tenían menos de 2 años de edad. Además en algunos casos la historia clínica indicaba reacciones de anafilaxia intraoperatoria. En el grupo de pacientes relacionados con la salud (grupo II) a 44 de 163 pacientes se les realizó ambas pruebas. La mayoría de los sueros fueron obtenidos a partir de estudios poblacionales realizados con otros fines en diversos hospitales, por lo cual no contábamos con una historia clínica adecuada. Para el grupo III, a 71 pacientes de los 186 estudiados se les realizó ambas pruebas. En este grupo las 12 pruebas cutáneas positivas con IgE específicas negativas podrían deberse a reacciones cruzadas entre proteínas de látex y de distintas frutas para las cuales el prick test presenta mayor sensibilidad.

A todos los pacientes se les realizó en forma conjunta un control positivo (histamina), control negativo (solución fisiológica) y otros extractos alérgicos (*Lolium*, *Dermatophagoides*, *Alternaria*, *Ambrosia*).

Por lo tanto los resultados de las pruebas cutáneas demuestran el poder alérgico *in vivo* de las proteínas presentes en el extracto proteico obtenido a partir del látex natural amoniacado, y la especificidad de las pruebas *in vitro* desarrolladas.

El prick test junto a los inmunoensayos de detección de IgE específica sérica (EAST o ELISA) serían aptos para ser empleados como pruebas de screening de la alergia al látex.

Mediante el inmunoblotting se confirmaría la especificidad de los anticuerpos IgE detectados.

Capítulo II -Alergia al látex

Discusión



- **Desarrollo de una metodología para obtención de extractos proteicos a partir de látex natural y productos manufacturados que sean aptos para distintos usos. Caracterización del contenido de proteínas.**

Los extractos proteicos obtenidos por ultracentrifugación a partir de látex natural resultaron ser los de mayor contenido en proteínas. El agregado de diferentes detergentes mejoró la recuperación de proteínas, resultando ser el detergente iónico SDS el más eficiente. A la concentración empleada no interfiere con los métodos de cuantificación de proteínas totales por Lowry y con ácido bisincrónico. Al analizar la composición proteica por SDS-PAGE se observaron componentes proteicos en un amplio rango de PM (14-94 kDa). En base a los PM relativos de las bandas y a la literatura podemos afirmar que este extracto contiene fracciones del *C serum*, de las partículas isoprenoides y de los organoides o *B serum*. Por tratarse de látex amoniacado este extracto contiene proteínas provenientes de los organoides o lutooides (contienen el 25 % de las proteínas totales), los cuales por rotura durante su almacenamiento por tiempos prolongados liberaron su contenido al citosol. Muchas de estas proteínas han sido caracterizadas como importantes alérgenos (Alenius 1995, Kekwick 1996). Las proteínas estructurales adheridas a las partículas de poliisopreno se desprenden por empleo de SDS, por lo cual también pasan a formar parte del *C serum*. Aquí se encuentra uno de los componentes alérgicos principales que es el factor de elongación (REF) o Hev b1.

Por lo tanto el extracto proteico obtenido en presencia de SDS a partir de látex amoniacado tendría una composición cualitativa y cuantitativa en alérgenos adecuada como para ser empleado en el desarrollo de pruebas *in vitro* de detección de IgE específica y pruebas *in vivo* de diagnóstico. Esta metodología de extracción de proteínas resultó ser reproducible ya que al aplicarlo a muestras de látex natural de distinta procedencia se obtuvieron extractos proteicos muy similares. La composición proteica y alérgica de los mismos es comparable a la que se ha reportado en la literatura por otros autores (Alenius 1991, Slater-Chhabra 1992).

Al látex natural que va a ser empleado para la manufacturación de distintos productos se le agregan anticoagulantes y posteriormente la industria lo puede utilizar como látex sólido, para lo cual es secado, o como látex líquido. Se lo concentra en partículas de poliisopreno (por centrifugación), enriqueciéndolo en un 30-60 %, y posteriormente el contenido de

amonio (anticoagulante) es ajustado a un 0.7 % ó 0.22 % (en este caso se le agrega además thiuram y óxido de zinc). Se lo almacena durante un período de 4-6 semanas a temperatura ambiente para que se incremente su estabilidad mecánica y luego es sometido al proceso de vulcanización. La maduración del látex le permite adherirse a los moldes empleados previo al calentamiento. Productos como guantes o preservativos son obtenidos empleando látex líquido como materia prima, mientras neumáticos, tapones, mamaderas, etc. son obtenidos a partir de látex sólido.

Varias décadas atrás transcurrían más de 12 meses desde que el producto era colectado en las plantaciones hasta que llegaba a la industria. En los últimos años los períodos de almacenamiento y transporte del látex natural se han acortado por la gran demanda de materia prima, principalmente desde Europa y Estados Unidos, por lo cual las características del látex también se han modificado. Actualmente la industria del caucho procesa alrededor de 6 millones de toneladas de látex natural por año.

Por lo tanto las preparaciones de látex natural que pueden ser empleadas como fuentes de proteínas son:

- ❖ Látex natural con alto contenido de amoníaco almacenado durante períodos cortos de tiempo. Es el empleado en el sudeste asiático.
- ❖ Látex natural con alto contenido de amoníaco almacenado durante períodos mayores de tiempo. Se lo emplea en USA y Europa.
- ❖ Látex natural amoniado con bajo contenido de amonio. También es empleado en USA y Europa, aunque en menor cantidad ya que se le deben adicionar otros anticoagulantes y conservadores.
- ❖ Látex natural no amoniado. Luego de extraído se lo congela y para usarlo se lo descongela de manera que exude el suero. No es la materia prima empleada por la industria.

La composición proteica de cada una de estas preparaciones es variable, aunque se ha demostrado la presencia de alergenios en todos ellos mediante el empleo de pruebas *in vivo* e *in vitro* (Kekwick 1996, Niggemann 1996). El tiempo de almacenamiento, la presencia de amonio y el congelamiento-descongelamiento en el caso del látex fresco, llevan a que se

formen agregados de mayor PM y degradación de algunos componentes proteicos (Kekwick 1996). Hemos observado que la composición proteica del látex natural amoniacado se altera con el paso del tiempo, degradándose numerosas proteínas.

Algunos autores reportan la conveniencia de emplear látex fresco como fuente proteica en pruebas *in vivo* e *in vitro*, ya que se obtiene mayor sensibilidad en los ensayos (Alenius 1991, Slater-Chhabra 1992, Kekwick 1996). Sin embargo la mayoría de los trabajos han demostrado la presencia de proteínas alérgicas en el látex natural amoniacado (Alenius 1991, Slater-Chhabra 1992, Chambeyron 1992, Slater-Trybul 1994, Akasawa 1995), lo cual indica que muchos epitopes presentes en las proteínas nativas son resistentes a la degradación por el almacenamiento y el agregado de sustancias químicas. Además, y por estar presentes en los productos manufacturados, estas proteínas resisten altas temperaturas y los procesos de lavados.

Además de las variaciones sufridas por la materia prima la industria ha introducido variantes en las etapas procesamiento. Como consecuencia, las propiedades físicas de los productos se han modificado con el transcurso del tiempo. Paralelamente la composición proteica y alérgica de numerosos productos también ha sufrido modificaciones. Por otro lado el gran incremento de la incidencia de alergia al látex en las últimas décadas ha originado que en el mercado aparezcan productos alternativos (guantes de polivinilo, guantes hipoalérgicos, preservativos hipoalérgicos, etc.) cuyo costo, eficiencia en la protección del individuo y contenido de proteínas alérgicas es muy variable.

Hemos analizado la composición proteica y alérgica de numerosos productos manufacturados a base de látex. El contenido proteico es muy variable al comparar los distintos productos (guantes, globos, preservativos, juguetes, etc.), distintas marcas de un mismo producto (guantes y preservativos) y al comparar distintos productos de un mismo lote (guantes). Estos resultados también han sido hallados por otros grupos, los cuales inclusive observaron variaciones en su alergenidad mediante el empleo de pruebas *in vivo* e *in vitro* (Turjanmaa 1988, Tomazic 1992, Alenius-Mäkinen-Kiljunen 1994). Cabe destacar que el contenido de proteínas por producto es muy inferior al del látex natural, pero al mantener su capacidad de unión a la IgE pueden originar reacciones alérgicas en individuos sensibilizados

(Fuchs 1997). Por lo tanto creemos que aquellos productos que contengan restos de proteínas provenientes del látex natural sean etiquetados como tales. El término “hipoalergénico” no asegura que pueda ser contactado sin riesgo por individuos alérgicos, ya que cantidades del orden de los μg pueden desencadenar signos clínicos de alergia. Por lo tanto en el producto debe estar indicado claramente si contiene o no proteínas de látex.

En la preparación de extractos proteicos a partir de productos manufacturados también se incluyó SDS para facilitar el desprendimiento de proteínas retenidas en la matriz poliisoprenica. La cuantificación de proteínas hidrosolubles extraída de diferentes productos se realizó por el método de Lowry y una modificación del mismo para eliminar sustancias pro-vulcanizantes que interfieren en la determinación. Se obtuvo una buena correlación entre ambos métodos, aunque el método de Lowry siempre arrojó valores superiores. La obtención de un antisuero específico contra proteínas de látex natural permitió desarrollar un ensayo para la cuantificación de proteínas de látex en productos manufacturados. Este ensayo se caracterizó por su elevada sensibilidad, especificidad y bajo límite de detección, posibilitando el dosaje de proteínas que se encuentran en cantidades muy bajas en ciertos productos.

Al analizar la composición proteica por SDS-PAGE de diferentes extractos obtenidos a partir de productos manufacturados, para lo cual debieron ser concentrados, observamos una gran variabilidad en el perfil proteico. Estos resultados demuestran variaciones en los métodos de procesamiento aplicados por las distintas industrias, en la composición de la mezcla vulcanizante empleada por cada fabricante, en la materia prima empleada (tipo de látex, zona geográfica de origen del látex natural, período y condiciones de almacenamiento, etc.) y en los procesos de lavados (solvente empleado, aditivos agregados, número de lavados efectuados, etc.).

En todos los extractos analizados provenientes de guantes de distinto tipo se observaron bandas en las zonas de 14-17 kDa, inclusive en los "guantes hipoalergénicos", mientras que el resto del perfil proteico varía considerablemente de un producto a otro. Se ha demostrado en otros trabajos que proteínas de 14, 20, 27 y 43 kDa provenientes de guantes

presentan un comportamiento alergénico importante (Slater-Chhabra 1992, Chambeyron 1992, Alenius 1993, Czuppon 1993, Akasawa-Hsieh-Lin 1996, Breiteneder-Sowka 1999).

En la banda de 14 kDa detectada por SDS-PAGE podría encontrarse la Hev b1, uno de los alérgenos principales del látex, ya que este componente demostró ser alergénico en la mayoría de los productos en los cuales fue detectado. Debemos aclarar que se han hallado por electroforesis bidimensional más de 10 componentes con el mismo PM y distinto PI (Kurup 1996, Posch 1997).

Entre los productos no médicos analizados hemos hallado un elevado contenido de proteínas en globos y preservativos, mientras que productos obtenidos a partir de látex sólido (chupetes, tetinas, pelotas, etc.) mostraron niveles inferiores de proteínas. Otros autores han obtenido resultados similares (Yunginger 1994), por lo que se podría postular que productos obtenidos a partir de látex sólido tienen un menor contenido de proteínas extraíbles residuales, o que se requieren procesos más drásticos para extraerlas. Los sueros de pacientes que desarrollaron signos clínicos de atopía al contactar estos productos (descritos en la sección de resultados) nos han permitido detectar proteínas alergénicas en los extractos obtenidos. Para el caso de los preservativos no se observan componentes comunes a todos los productos analizados, aunque la fracción de 14 kDa se observó en la mayoría de ellos. Para el resto de los productos estudiados se pudieron detectar bandas en la zona de 30 kDa en prácticamente todos los extractos. En la bibliografía existe escasa información sobre el contenido individual de proteínas de los diferentes productos manufacturados. Se han descrito las dificultades halladas para determinar la antigenicidad y alergenicidad por immunoblotting de proteínas de látex en diferentes productos (Moneo 1993).

Los productos más estudiados son los guantes quirúrgicos (Yunginger 1994, Vallier 1995, Fink 1996, Baur 1997, Chen 1998). En los guantes analizados el contenido en proteínas es muy importante, incluso en muchos de ellos el perfil proteico observado es muy similar al del látex natural. Inclusive algunos guantes sintéticos contienen proteínas de látex, principalmente la de 14 kDa. En los guantes sin polvo se detectaron niveles muy inferiores de proteínas extraíbles. Además de la ausencia del almidón que actúa como "carrier" de proteínas del látex, estos productos son sometidos a procesos de clorinación y lavados, los cuales alteran y extraen a las proteínas.

Por lo tanto entre las proteínas detectadas por SDS-PAGE en los productos manufacturados se encontrarían alérgenos mayores del látex natural (Hev b1, Hev b5, Hev b6 y hevamina) los cuales, por estar presentes en productos manufacturados, se caracterizarían por su resistencia a la temperatura, a los aditivos químicos empleados, a los procesos de lavado y a los de esterilización. Los productos estériles son sometidos a radiación γ , la cual debilita la estructura polimérica y degrada a las proteínas. Diferencias en el contenido de proteínas al comparar productos irradiados con no irradiados han sido descritas (Yunginger 1994).

Una forma muy efectiva de eliminar proteínas del producto final es a través de los lavados empleando agua y distintas sustancias químicas. Hemos observado que el contenido total de proteínas disminuye ostensiblemente, con la formación de neoantígenos. Principalmente hemos observado que una proteína de 69 kDa, no detectada en el látex natural amoniacado, ha sido extraída de distintos productos y que tiene capacidad de unirse a la IgE específica. Otros autores también reportan la presencia de proteínas de látex en productos finales (4.7, 14, 16, 23, 29, 30, 33, 39 y 54 kDa) (Alenius 1991, Alenius 1994, Akasawa 1995, Akasawa-Hsieh-Martin 1996) y la formación de nuevos componentes alérgicos (2.5, 11, 26 kDa) (Alenius 1991, Mäkinen-Kiljunen 1992).

En el mes de julio de 1999 la FDA emitió instrucciones sobre el contenido de proteínas y etiquetado de guantes quirúrgicos y de exploración (Medical Glove Guidance Manual). Debe figurar el contenido máximo de proteínas extraíbles determinado por el método de Lowry modificado. Recomiendan que no supere los 1200 $\mu\text{g}/\text{unidad}$ lo cual equivale aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ producto. Los guantes libres de polvo deben tener un contenido residual de polvo inferior a los 2 mg /unidad. Se desarrolló, junto a la ASTM, un método estandarizado para medir dicha cantidad. Para guantes con polvo el límite superior de polvo debe ser de 120 mg/unidad. Además debe figurar una fecha de vencimiento del producto, pasada la cual no se asegura la integridad física y mecánica del guante. Los fabricantes deben disminuir al máximo el contenido de proteínas hidrosolubles, minimizar el agregado de sustancias químicas durante y después de la vulcanización (por ej. fenoles) y el contenido residual de las mismas en los productos finales. El etiquetado de los productos debe incluir la siguiente frase:

"Cuidado: este producto contiene látex natural que puede ocasionar reacciones alérgicas"

- **Desarrollo y optimización de métodos de diagnóstico de screening y confirmatorios que permitan detectar la presencia de IgE específica en el suero de pacientes.**

Mediante el desarrollo de diferentes formatos de inmunoensayos (dot-blot, EAST, ELISA e immunoblotting) se detectó y cuantificó la presencia de IgE específica en el suero de pacientes. Todos los sueros que fueron positivos por EAST también fueron positivos por ELISA. También se evaluaron algunos sueros con un método comercial automatizado (CAP-Pharmacia) y los resultados hallados fueron concordantes con los de nuestros ensayos.

Estos ensayos permitieron obtener datos de prevalencia de la patología en nuestro medio. Además se identificaron diferentes grupos de riesgo en los cuales la patología se presenta con una incidencia superior respecto a la población general. En el grupo I de pacientes sometidos a numerosas cirugías hemos hallado valores de prevalencia de 32.1 %, mientras que valores internacionales se encuentra en el rango de 4.3-68 % (Slater-Chhabra 1992, Alenius 1993, Kelly 1994). Distintos factores podrían explicar las diferencias halladas: números de cirugías, edad, condiciones socio-económicas, si se realizan o no enemas y desimpactaciones fecales y el tipo de materiales empleados, etc.

Para el grupo II, o trabajadores relacionados con la Salud, hemos hallado valores de prevalencia del 17.3 %. En la literatura internacional se encuentran valores desde 2.8 % hasta 17 %, según el país donde se realizaron y las técnicas empleadas (Lagier 1992, Charous 1994, Capriles-Hulett 1995, Kaczmarek 1996).

En el grupo III, donde la mayoría son pacientes atópicos (74.8 %), el 18.6 % de los sueros reveló la presencia de IgE específica para látex. Reportes internacionales informan datos entre 1 % y 12 % (Charous 1994, Hadjiliadis 1995, Lavaud 1995). En este grupo se deben considerar las sensibilizaciones cruzadas entre proteínas de látex y de otros vegetales (pólenes, banana, kiwi, palta, tomate, melón, avellanas, durazno, etc), lo cual podría explicar la mayor prevalencia obtenida en nuestro estudio. En nuestra ciudad es muy marcada la sensibilización a pólenes. Las profilinas, proteínas del citoesqueleto de numerosas plantas, presentan epitopes de reactividad cruzada entre componentes del látex natural (principalmente

Hev b5 presente en el citosol) y diversos pólenes (Bet v1, Bet v2, etc.), frutas frescas, etc. La profilina del látex no se encontraría presente en extractos obtenidos a partir de guantes (Vallier 1995), por lo cual en este grupo se estarían detectando individuos sensibilizados a alérgenos de reactividad cruzada con proteínas de látex. Ha sido demostrado que las profilinas son reconocidas por la IgE de pacientes alérgicos al látex y que un 10-30 % de la población se encuentra sensibilizada a las mismas (Mäkinen-Kiljunen 1994, Reinheimer 1995, Fuchs 1997).

Respecto a los vegetales que dan reactividad cruzada con el látex sólo hemos realizado un análisis parcial. Se detectaron proteínas en extractos obtenidos a partir de palta, banana y kiwi que son reconocidas por el antisuero de conejo y por sueros de pacientes alérgicos al látex, banana y kiwi (resultados no mostrados). Se realizaron inmunoensayos competitivos (inhibiendo la unión de anticuerpos específicos a proteínas de látex inmovilizadas en la fase sólida, por medio de los extractos mencionados), ELISA indirecto (sensibilizando la fase sólida con los extractos de los vegetales e incubando con el antisuero obtenido en conejo) e immunoblotting de inhibición empleando sueros de individuos con historia clínica compatible con alergia a estos vegetales. Las inhibiciones observadas resultaron muy variables (dependiendo del extracto, el suero y el antisuero empleado) y son indicativas que existen componentes en estos vegetales con epitopes que son compartidos con proteínas del látex natural. Resultados hallados en la literatura describen esta reactividad cruzada en base al empleo de prueba cutánea, distintos tipos de inmunoensayos y por comparación de las secuencias aminoacídicas entre los distintos sistemas (Lavaud 1995, Alenius 1996, Breiteneder 1998, Mikkola 1998, Díaz-Perales 1998, Blanco 1999).

Mediante immunoblotting se lograron identificar proteínas con capacidad de unión a IgE sérica extraídas del látex natural y de numerosos productos. Los principales componentes alérgicos fueron los que se encuentran en las zonas de 14-17 y de 30 kDa. En base a los PM relativos aquí se encontrarían incluidos Hev b1 (14.6 kDa), Hev b2 (35.1 kDa), Hev b5 (16 kDa), Hev b6 (14 y 20 kDa) y la hevamina (30 kDa). No hemos detectado perfiles de reactividad IgE característicos para cada grupo de riesgo, como otros autores reportan (Alenius 1993, Alenius-Kurup 1994, Yeang 1996), lo cual inferiría características

fisiopatogénicas específicas a cada componente en particular. Sin embargo esta información podría ser muy útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico estandarizados utilizando una o varias proteínas recombinantes. Se ha hallado que en el grupo de pacientes con espina bífida los principales alérgenos son Hev b1, Hev b3 y Hev b5 (Alenius 1991, Slater-Chhabra 1992, Breiteneder 1999), mientras que en el grupo II Hev b1, Hev b5, Hev b6 y Hev b7 son reconocidos por más del 50 % de los pacientes (Alenius-Turjanmaa-Palosuo 1994).

No hemos hallado correlación entre los niveles de IgE total y de IgE específica. Tampoco hubo correlación entre la gravedad de los síntomas y la "clase" de IgE específica hallada. Para establecer una relación directa entre la exposición a proteínas del látex y los signos clínicos observados se debe recurrir a los test de provocación (Pisati 1994). Otros autores han hallado una correlación entre el tamaño del halo originado por pruebas cutáneas realizadas con extractos comerciales de látex y la severidad de las reacciones alérgicas inducidas por productos de látex (Hadjiliadis 1996); o una correlación entre la sintomatología asociada al contacto con diferentes tipos de productos manufacturados y la presencia de IgE sérica determinada por métodos *in vitro* (Kim 1999).

Los métodos desarrollados se caracterizarían por ser sensibles y específicos dado que se observó una buena correlación entre los datos obtenidos en aquellos pacientes para los cuales contábamos con las historias clínicas y se les realizaron prueba cutánea, EAST, ELISA e inmunoblotting. Además estos inmunoensayos no detectaron la presencia de IgE específica en los sueros de individuos normales o de alérgicos a alérgenos no relacionados.

Se analizó además la presencia de proteínas alergénicas en diferentes productos manufacturados, en especial en preservativos y guantes, por tratarse de los productos que son contactados con mayor frecuencia en la población general. No todos los pacientes que desarrollaron signos clínicos presentaban IgE específica sérica. En ellos los mecanismos desencadenantes de la sintomatología observada sería una dermatitis de contacto o hipersensibilidad Tipo IV. A pesar de la gran variabilidad observada en la extracción de proteínas, los perfiles de reactividad IgE obtenidos con distintos sueros fueron muy similares. Los alérgenos más importantes fueron los de 14 y 30 kDa de PM relativo. En la literatura existen pocos trabajos que demuestren la presencia de proteínas en distintos productos con

capacidad de unir IgE sérica. Esta propiedad ha sido demostrada principalmente con guantes y mediante la aplicación de prueba cutánea (Turjanmaa 1988, Fink 1996, Baur 1997).

- **Preparación de extractos proteicos para su aplicación en pruebas cutáneas de diagnóstico.**

La caracterización de los extractos proteicos a ser empleados en pruebas cutáneas, en cuanto a su antigenicidad y alergenidad, permite relacionar los resultados obtenidos por el prick test con la presencia de IgE específica. Principalmente en extractos obtenidos a partir de productos manufacturados, las sustancias químicas hidrosolubles residuales podría ocasionar reacciones en la piel sin la participación de mecanismos IgE-dependientes. Además el bajo contenido de proteínas extraíbles en ciertos productos podría dificultar la interpretación de los resultados.

Se empleó como prueba cutánea el prick test, ya que resulta menos riesgoso para el paciente, y se empleó el extracto obtenido a partir de látex natural. Sólo en ciertos casos se emplearon extractos obtenidos a partir de los productos que ocasionaron reacciones alérgicas al ser contactados por el paciente.

En general se obtuvieron datos concordantes con las pruebas *in vitro* de detección de IgE sérica. Estos resultados sugieren que los extractos contienen proteínas con capacidad de unir la IgE específica sérica y de inducir la degranulación de mastocitos a través del “puenteo” de moléculas de IgE unidas a sus receptores.

Se observó en numerosos pacientes una prueba cutánea negativa con el extracto de látex, pero positiva con extractos preparados a partir del producto que le originó los signos clínicos. Esto confirmaría los resultados hallados *in vitro* sobre la modificación de algunas proteínas alergénicas del látex natural al ser sometidas al procesamiento industrial. Por lo tanto lo más conveniente sería realizar la prueba cutánea con el producto sensibilizante, ya que no sólo difiere su composición proteica con la del látex natural, sino que también entre los distintos productos, marcas o lotes de un mismo producto. De esta manera se disminuirían los falsos negativos, y se evitarían así las consecuencias que ellos originan.

Conclusiones generales



CONCLUSIONES GENERALES

- Se han ensayado diferentes formas de extracción de proteínas y glicoproteínas a partir de distintas fuentes naturales y procesadas. Se obtuvieron extractos proteicos de leche bovina y fracciones aisladas (caseínas y proteínas del suero), de látex natural y de productos manufacturados a base de látex. Su contenido de proteínas y alérgenos fue el adecuado como para ser empleados en pruebas de diagnóstico para ambas patologías. Las metodologías empleadas resultaron ser reproducibles.
- Se desarrollaron métodos *in vivo* e *in vitro* para demostrar la presencia de anticuerpos IgE, lo cual resulta muy importante para realizar el diagnóstico de una enfermedad alérgica. Se han desarrollado métodos de screening (EAST, ELISA indirecto y prueba cutánea) y confirmatorios (immunoblotting) para diagnóstico de ambas patologías.
- Se han desarrollado métodos de cuantificación (ELISA competitivo secuencial) de proteínas antigénicas que resultaron ser sensibles y específicos para ambas patologías. En ambos casos se logró un límite de detección del orden de los ng/ml.
- Se analizó el contenido proteico, antigénico y alérgico de sustitutos lácteos empleados en el tratamiento de la alergia a leche bovina y de productos manufacturados a partir de látex.

I- Alergia a proteínas de leche bovina

- Se identificaron a las caseínas, y en especial los agregados de elevado PM formados por las principales fracciones (α -, β -, y κ -caseína) como el principal alérgeno del sistema.
- Al analizar la respuesta inmune humoral de pacientes alérgicos, diferentes componentes proteicos fueron reconocidos por la IgE sérica, observándose una gran variabilidad en cuanto a la intensidad y especificidad de reconocimiento. No se detectó por immunoblotting el mismo patrón de reactividad IgE e IgG.
- Al analizar diferentes sustitutos lácteos hemos detectado reactividad cruzada entre alérgenos presentes en la leche de vaca, oveja, cabra y aislados proteicos obtenidos a partir de soja.
- Se detectaron proteínas residuales nativas y degradadas y proteínas nativas contaminantes en distintos hidrolizados proteicos empleados en el tratamiento de la patología. Se detectaron componentes antigénicos y alérgicos provenientes de las caseínas en formulaciones

preparadas a partir de las proteínas del suero. Además se detectaron componentes peptídicos que contienen epitopes inmunorreactivos con capacidad de unión a la IgE sérica.

- Se observó que los hidrolizados extensivos tienen un muy bajo contenido de componentes alergénicos, aunque numerosos sueros han detectado actividad alérgica residual en ellos. El único sustituto en el cual no fue posible detectar alérgenicidad fue una formulación a base de aminoácidos.

II) Alergia al látex

- Se detectó que el principal alérgeno del látex natural tiene un PM de 14 kDa, coincidente con el del factor de elongación descrito como uno de los principales alérgenos del sistema, y componentes en la región de 30 kDa, entre los que se encontraría la hevamina.
- Hemos detectado diferentes grupos de riesgo en los cuales hallamos datos de prevalencia de la patología similares a los reportados en otros países. Se destacan los pacientes con mielomeningocele con un 32.1 % de positividad.
- No hemos observado por inmunoblotting perfiles de reactividad IgE característicos para cada grupo de riesgo. En general se detectó que la mayoría de los sueros presentan IgE específica con capacidad de unión a componentes de 14 y 30 kDa de PM, presentes en el látex natural.
- Se observó una importante variabilidad en el contenido y calidad de proteínas en una gran cantidad de productos manufacturados analizados. En general el contenido de proteínas detectado es inferior al del látex natural.
- En los productos manufacturados analizados se detectaron proteínas nativas provenientes del látex natural, aunque la mayoría de estas proteínas desaparece. Además se detectó la presencia de una proteína de 69 kDa, que no fue observada en el látex natural. En general los componentes de 14 y 30 kDa detectados en el látex natural se encuentran presentes en los extractos obtenidos a partir de los productos y mantienen sus propiedades alérgicas.
- Se ha obtenido una buena correlación entre las historias clínicas de los pacientes, las pruebas cutáneas (en aquellos casos que fue posible realizarla) y los resultados de los métodos *in vitro* para detección de IgE específica.

Bibliografia



BIBLIOGRAFIA

- AAAAI. The use of standardized allergen extracts. Position Statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 583-6.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-93.
- Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun* 1997; 65: 3501-08.
- Aebischer I, Stadler BM. Th 1-Th 2 cells in allergic responses: at the limits of a concept. *Adv Immunol* 1996; 61: 341-403.
- Agata H, Kondo N, Fukutomi O, Shinoda S, Orii T. Effect of elimination diets on food-specific IgE antibodies and lymphocyte proliferative responses to food antigens in atopic dermatitis patients exhibiting sensitivity to food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 91: 668-79.
- Aggett P, Haschke F, Heine W. Comment on antigen-reduced infant formulae. *Acta Paediatr* 1993; 82: 314-9.
- Akasawa A, Hsieh L and Lin Y. Serum reactivities to latex proteins (*Hevea brasiliensis*). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1196-1205.
- Akasawa A, Hsieh LS, Lin Y. Comparison of latex-specific IgE binding among nonammoniated latex, ammoniated latex, and latex glove allergenic extracts by ELISA and immunoblot inhibition. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1116-20.
- Akasawa A, Hsieh LS, Martin BL, Liu T, Lin Y. A novel acidic allergen, Hev b5 , in latex. Purification, cloning and characterization *J Biol Chem* 1996; 271: 25389-93.
- Akasawa A, Matsumoto K, Saito H, Sakaguchi N, Tanaka K, Obata T, Tsubaki T, Uchiyama H, Matsunaga T, Kurosaka K and Iikura Y. Incidence of latex allergy in atopic children and hospital workers in Japan *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101: 177-181.
- Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Yips E, Palosuo T. Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995; 24: 659-65.
- Alenius H, Kurup V, Kelly K, Palosuo T, Turjanmaa K and Fink. Latex allergy: frequent occurrence of IgE antibodies to a cluster of 11 latex proteins in patients with spina bifida and histories of anaphylaxis. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 712-720.

-
- Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Ahlroth M, Turjanmaa K, Reunala T, Palosuo T. Crossreactivity between allergens in natural rubber latex and banana studied by immunoblot inhibition. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 341-8.
 - Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Turjanmaa K et al.. Allergen and protein content of latex gloves. *Ann Allergy* 1994; 73: 315-20.
 - Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K and Fink J. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102: 61-66.
 - Alenius H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S and Reunala., Palosuo T. IgE immune response to rubber proteins in adult patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 859-63.
 - Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T. Surgical Latex Glove Allergy: Characterization of Rubber Protein Allergens by Immunoblotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;96: 376-380.
 - Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T. IgE immune response to rubber proteins in patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 859-63.
 - Amelot PL, Kemeny DM, Zachari C. Oral allergy syndrome: Symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin Allergy* 1987; 17: 33-42.
 - American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Soy protein-based formulas: recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics* 1998; 101: 148-53.
 - American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics* 1989; 83: 1068-9.
 - Amigorena S, Bonnerot C, Fridman WH, Teillaud J-L. Recombinant interleukin 2-activated natural killer cells regulate IgG2a production. *Eur J Immunol* 1990;20:1781-1787.
 - ASTM. Standard Test method for Analysis of Protein in Natural Rubber and its Products. Designation: D 5712-95. *Annual Book of ASTM Standards* 1995.
 - Attanyaka DP, Kekwick N, Franklin FC. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plan Mol Biol* 1991; 16: 1071-81.
 - Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 1998; 12: 221-34.

-
- Bauer CP. The binding capacity of IgE to hypoallergenic nutrients. In: Harms HK, Wahn U. Food allergy in infancy and childhood. Springer, Berlin Heidelberg New York 1989: 67-171.
 - Baur X, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Degens P. Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy*. 1997; 52: 661-4.
 - Beaven MA, Baumgartner PA. Downstream signals initiated in mast cells by FcεRI and other receptors. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 766-772.
 - Beezhold D, Kostyal D, Wiserman J. The transfer of protein allergens from latex gloves: a study of influencing factors. *AORN Journal* 1994; 59: 605-13.
 - Beezhold DH, Hickey VL, Slater JE, Sussman GL. Human IgE-binding epitopes of the latex allergen Hev b 5. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103: 1166-72.
 - Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro P, Perborn H, Businco L. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1191-4.
 - Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine messenger RNA for IL-5 and GM-CSF in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:35-42.
 - Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
 - Bieber T. FcεRI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 1997; 18: 311-313.
 - Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns RP. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 1999; 44: 643-52.
 - Björkstén B, Ahlstedt S, Björkstén F, Carlson B, Fallstrom SP. Immunoglobulin E and immunoglobulin G4 antibodies to cow's milk in children with cow's milk allergy. *Allergy* 1983;38:119-24
 - Björkstén B. The environmental influence on childhood asthma. *Allergy* 1999; 54: 17-23.

- Blackfan KD. A consideration of certain aspects of [protein hypersensitivity] in children. *Am J Med Sci* 1920; 160: 341-50.
- Blanco C, Diaz-Perales A, Collada C, Sanchez-Monge R, Aragoncillo C, Castillo R, Ortega N, Alvarez M, Carrillo T, Salcedo G. Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 507-13.
- Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:427-438.
- Bock SA, Lee WY, Remigio LK, May CD. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 62: 327-34.
- Bock SA. Probable allergic reactions to casein hydrolysate formula. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 272.
- Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683-8.
- Bond MW, Shrader B, Mosmann TR, Coffman RL. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. II. Physicochemical characterization. *J Immunol* 1987;139:3691-3696.
- Bonnefoy J-Y, Lecoanet-Henchoz S, Aubry J-p, Gauchat J-F, Graber P. CD23 and B cell activation. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 355-359.
- Bottcher MF, Jenmalm MC, Garofalo RP, Bjorksten B. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res* 2000 Jan;47(1):157-62
- Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 1995; 155: 297- 307.
- Breitenbach M, Ferreira F, Jilek A, Swoboda I, Ebner C, Hoffmann-Sommergruber K, Briza P, Scheiner O, Kraft D. Biological and immunological importance of Bet v 1 isoforms. *Adv Exp Med Biol* 1996;409:117-26
- Breiteneder H, Sowka S, Wagner S, Krebitz M, Hafner C, Kinaciyan T, Yeang HY, Scheiner O. Cloning of the patatin-like latex allergen Hev b 7, its expression in the yeast *Pichia pastoris* and its immunological characterization. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 309-10.
- Breiteneder H. Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1084-92.
- Breiteneder H. The allergens of *Hevea brasiliensis*. *ACII* 1998; 10: 101-9.



- Brigandi RA, Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol* 1996; 82: 279-89.
- Brock Williams P, Buhr MP, Weber RW, Volz MA, Koepke JW, Selner JC. Latex allergen in respirable particulate air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 88-95.
- Brockaert W, Lee HI, Kush A, Chua NH, Raikhel N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7633-7.
- Brugnami G, Marabini A, Siracusa A and Abbritti G : Work-related late asthmatic response induced by latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 457-464.
- Burrows B, Martínez FD, Halonen M, et al. Association of asthma with serum IgE levels and skin prick test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320: 271-77.
- Businco L, Bruno G, Giampietro PG, Cantani A. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. *J Pediatr* 1992; 121: S21-8.
- Businco L, Cantani A, Longhi AL, Giampietro P. Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfa-Ré, Nestlé) in infants with cow's milk allergy. *Ann Allergy* 1989; 62: 333-335.
- Businco L, FDreborg S, Einarsson R, Giampietro PG, Host A, Keller KM. Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4: 101-11.
- Businco L. Is soy allergy overestimated? *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 1993; 7: 73-6.
- Capriles-Hulett A, Sánchez-Borges M, Von-Scanzoni C, Medina J. Very low frequency of latex and fruit allergy in patients with spina bifida from Venezuela: influence of socioeconomic factors. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75: 62-4.
- Capron M, Bazin H, Joseph M, Capron A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J Immunol* 1981;126:1764–1768.
- Caraballo LR, Hernandez M. Haplotype segregation in families with allergic asthma. *Tissue Antigens* 1991; 38: 185-186.
- Ceska M, Eriksson R and Varga JM. Radioimmunosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 49: 1-9.
- Chambeyron C, Dry J, Leynadier F, Pecquet C, Tran X. Study of the allergenic fractions of latex. *Allergy* 1992; 47: 92-7.

-
- Charous B L, Hamilton R G and Yunginger J W. Occupational latex exposure: characteristics of contact and systemic reactions in 47 workers. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 12-18.
 - Chen HD, Chen CL, Huang SW, Kung HF, Chen HC. Characterization of latex allergenic components by capillary zone electrophoresis and N-terminal sequence analysis. *J Biomed Sci* 1998; 5: 421-7.
 - Chen Z, Posch A, Lohaus C, Raulf-Heimosth M, Meyer HE, Baur X. Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea* latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 402-9.
 - Chye ML, Cheung KY. β -1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plan Mol Biol* 1995; 29: 397-402.
 - Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-g. *J Immunol* 1986; 136: 949-954.
 - Coffman RL, Seymour BWP, Haduk S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin 5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245: 308-310.
 - Cohen SG, Saavedra-Delgado AM. Through the centuries with food and drink, for better or worse. *Allergy Proc* 1989; 10: 363-73.
 - Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; 1: 1292-5.
 - Coombs RRA, Gell PGH. 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 Lanchmann PJ. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra. 1975; 761-781.
 - Cornish K, Lytle CD. Viral impermeability of hypoallergenic, low protein, guayule latex films. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 434-7.
 - Coveney J, Darnton-Hill I. Goat's milk and infant feeding. *Med J Aust* 1985; 143: 508-10.
 - Creamer LK, Richardson T, Parry DAD. Secondary structure of bovine α s1 and β caseinin solution. *Arch Biochem Biophys* 1981; 211: 689-96.
 - Croner S, Kjellman NI. Development of atopic disease in relation to family history and cord blood IgE levels. Eleven year follow-up in 1654 children. *Ped Allergy Immunol* 1990; 1: 14-20.
 - Czuppon A, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer H, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 690-7.

- Del Pozo V, de Andres B, Martin E, Cardaba B, Fernández JC, Gallardo S, Tramon P, Leyva-Cobian F, Palomino P, Lahoz C. Eosinophil as antigen-presenting cell: Activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1919-1925.
- Del Pozo V, de Andres B, Martin E, Mauri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1 α : alpha IL-1 mRNA detection by *in situ* hybridization. *J Immunol* 1990; 144: 3117-22.
- Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Romagnani S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1445-9.
- Dembo M, Goldstein B, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Degranulation of human basophils: quantitative analysis of histamine release and desensitization due to a bivalent penicilloyl hapten. *J Immunol* 1979; 123: 1864-1872.
- Denburg JA, Davison M, Bienenstock J. Basophil production. *J Clin Invest* 1980; 65: 390-9.
- Denburg JA, Telizyn S, Belda A, Dolovich J, Bienenstock J. Increased numbers of circulating basophil progenitors in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 466-72.
- Devalia JL, Ruznak C, Herdman MJ, et al. Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on the airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation. *Lancet* 1994; 344: 1668-71.
- Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G. Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 127-33.
- Díaz-Sánchez D. The role of diesel exhaust particles and their associated hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* 1997; 52: 52-6.
- Docena GH, Fernández R, Chirido FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996; 51: 413-6.
- Dreborg S, Einarsson R. The major allergen content of allergenic preparations reflects their biological activity. *Allergy* 1992; 47: 418-23.
- Dreborg S, Frew A. Allergen standardization and skin tests. EAACI Position Paper. *Allergy* 1993; 48 Suppl 14: 49-82.

-
- Ebner C, Schenk S, Najafian N, Siemann U, Steiner R, Fischer GW, Hoffmann K, Szepefalusi Z, Scheiner O, Kraft D. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995 Feb 15;154(4):1932-40.
 - Edfords-Lubs MI. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971; 26: 249-285.
 - Eigel WN, Hofmann CJ, Chibber BA, Tomich JM, Keenan TW, Mertz ET. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 2244-8.
 - Ellis MH, Short JA, Heiner DH. Anaphylaxis after ingestion of a recently introduced hydrolyzed whey protein formula. *J. Pediatr.* 1991; 118: 74-77.
 - Emberlin JC. Grass, tree and weed pollens. En: Kay AB. *Allergy and Allergic Diseases*. London: Blackwell Science 1997: 835-57.
 - Enomoto A, Shon DH, Aoki Y, Yamauchi K, Kaminogawa S. Antibodies raised against peptide fragments of bovine alpha s1-casein cross-react with the intact protein only when the peptides contain both B and T cell determinants. *Mol Immunol* 1990; 27: 581-6.
 - Fallstrom SP, Ahlstedt S, Carlsson B, Lonnerdal B, Hanson LA. Serum antibodies against native, processed and digested cow's milk proteins in children with cow's milk protein intolerance. *Clin Allergy* 1986; 16: 417-23.
 - Falth-Magnusson K, Oman H, Kjellman NI. Maternal abstention from cow milk and egg in allergy risk pregnancies. Effect of antibody productions in the mother and the newborn. *Allergy* 1987; 42: 64-73.
 - Farah Z. Composition and characteristics of camel milk. *J Dairy Res* 1993; 60: 603--26.
 - Farrel HM. Models for casein micelle formation. *J Dairy Sci* 1973; 56: 11954-1206.
 - Faulkner HC, Humphreys N, Renauld JC, Van Snick J, Grecis RK. Interleukin-9 is involved in host-protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur J Immunol* 1997;27:2536--2540.
 - Findlay JB, Brew K. The complete amino-acid sequence of human -lactalbumin. *Eur J Biochem* 1972; 27: 65-86.
 - Fink JN, Kelly KJ, Elms N, Kurup VP. Comparative studies of latex extracts used in skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1996; 76: 149-52.
 - Finkelman FD, Katona IM, Mosmann T, Coffman RL. IFN-g regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 1988;140:1022--1027.

-
- Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JV, Paul WE. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988;141:2335–2341.
 - Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol* 1997;15:505–533.
 - Finkelman FD, Urban JFJ, Beckmann MP, Schooley KA, Holmes JM, Katona IM. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int Immunol* 1991;3:599–607.
 - Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318 :1-14.
 - Frandji P, Thaczyk C, Oskeritzian B, David B, Desaymard C, Mecheri S. Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2517-28.
 - Fuchs T, Spitzauer S, Vente C, Hevler J, Kapiotis S, Rumpold H, Kraft D, Valenta R. Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 356-64.
 - Fuglsang G, Madsen C, Saval P, Osterballe O. Prevalence of intolerance to food additives among Danish schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4: 123-9.
 - Fukaura H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996; 98: 70-7.
 - Galfré, GA; Milstein, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures, *Methods Enzymol.* 73: 3-46.
 - Galli SJ, Costa JJ. Mast cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy* 1995;50:851–862.
 - Galli SJ. New concepts about the mast cell. *New Engl J Med* 1993;28: 257-65.
 - Garnier J, Ribadeau-Dumas B. Structure of the casein micelle: A proposed model. *J Dairy Res* 1970; 37: 493-504.
 - Garrone P, Djossou O, Galizzi JP, Banchereau J. A recombinant extracellular domain of the human interleukin 4 receptor inhibits the biological effects of interleukin 4 on T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1365-69.

- Gascan H, Gauchat J-F, Aversa G, Van Vlasselaer P, De Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4⁺ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 1991;147:8–13.
- Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993;365:340–343.
- Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, et al. Structure and formation of germline E transcript in human B cells induced by interleukin 4 to switch to Ige productions. *J Exp Med* 1990; 172: 463-73.
- Gazzinelli RT, Camargo MM, Almeida IC, et al. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. *Chem Immunol* 1997;68:136–152.
- Gerrard JW, Mac Kenzie JWA, Goluboff N. Cows milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paediatr. Scand (Suppl)* 234:1-21.
- Gilmour MI. Interaction of air pollutants and pulmonary allergic responses in experimental animals. *Toxicology*; 105: 335-42.
- Gjesing B, Osterballe O, Schawartz B, Wahn U, Lowenstein H. Allergen specific IgE antibodies against components in cow`s milk and substitutes. *Allergy* 1986; 41: 51-6.
- Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993; 44: 85-101.
- Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leucocyte: structure and function. *Adv Immunology* 1986; 39: 177-253.
- Godfrey KM, Barker DJ, Osmond C. Disproportionate fetal growth and raised IgE concentration in adult life. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 641-8.
- Goldman AS, Anderson DW, Sellars, Wa et al. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics* 1963; 32: 425-43.
- Goldman AS, Sellars WA, Halpern SR, Anderson DW, Furlow TE, Johnson CH. Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatrics* 1963; 32: 572-9.
- Gordon J. B-cell signalling via the C-type lectins CD23 and CD72. *Immunol Today* 1994; 15: 411-417.
- Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990;11:458–464.

- Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF alpha/cachectina. *Nature* 1990; 346: 274-276.
- Gortler I, Urbanek R, Forster J. Characterization of antigens and allergens in hypoallergenic infant formulae. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 289-94.
- Gortler Y, Urbanek R, Forster J. Characterization of antigens and allergens in hypoallergenic infant formulae. *Eur. J. Pediatr.* 1995; 154: 289-294.
- Hadjiliadis D; Khan K and Tarlo S M: Skin test responses to latex in an allergy and asthma clinic. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 431-432.
- Halcken S, Host A, Hansen LG, Osterballe O. Safety of a new, ultrafiltrated whey hydrolysis formula in children with cow's milk allergy: a clinical investigation. *Pediatr Allergy Immunol.* 1993; 4: 53-59.
- Hanifin JM. Atopic dermatitis in infants and children. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38: 763-89.
- Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, Bradley B, Kay AB. Fc gamma and CD11/18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* 1990; 69: 264-70.
- Hauer AC, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. The frequency of cells secreting interferon-gamma and interleukin-4, -5, and -10 in the blood and duodenal mucosa of children with cow's milk hypersensitivity. *Pediatr Res* 1997; 42: 629-38.
- Heyman M, Grasset E, Ducroc R, Desjeux JF. Antigen absorption by jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr Res* 1988; 24: 197-202.
- Hide DW. Cow milk allergy. Editorial. *Clin Exp Allergy.* 1993; 23: 79-80.
- Higgins JA, Lamb JR, Marsh SGE, et al. Peptide-induced nonresponsiveness of HLA-DP restricted human T cells reactive with *Dermatophagoides* spp. (house dust mite). *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 749-56.
- Higgins JA, Thorpe CJ, Hayball JD, O'Hehir RE, Lamb JR. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 891-9.
- Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991; 325: 595-600.
- Hill DJ, Ford RPK, Shelton MJ, Hoskin CS. Study of 100 infants with cow's milk allergy. *Clin Rev Allergy* 1984; 2: 125-42.

- Hipp NJ, Groves ML, Custer JH, , McMeekin TL. Separation o α -, β - and γ -casein. *J Dairy Sci* 1952; 35: 272-81.
- Hoffman DR. Food allergy in children: RAST studies with milk and egg. In: Evans R III, editor. *Advances in diagnosis of allergy: RAST*. Miami. FL: 1975: 165-9.
- Holt C. Casein micelle size from elastic and quasi-elastic light scattering measurements. *Biochim Biophys Acta* 1975; 400: 293-301.
- Host A, Halken S, Jacobsen HP, Eastmann A, Mortensen S, Mygil S. The natural course of cow's milk allergy/intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: S-490 (abstract).
- Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants the first 3 years of life . *Allergy* 1990; 45: 587-96.
- Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5: 1-36.
- Howarth PH, ABC of allergies: pathogenic mechanisms, a rational basis for treatment. *Br Med J* 1998; 316: 758-761.
- Hsieh KH, Shein CC, Hsieh R. Association of HLA DQW2 with chinese childhood asthma. *Tissue Antigens* 1991; 38: 181-182.
- ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. World-wide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet* 1998; 351: 1225-32.
- Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med* 1982;155:734-748.
- Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, et al. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* 1987; 58: 268-70.
- Isolauri E, Sütas Y, Mäkinen-Kiljunen S, Oja S, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 1995; 127: 550-7.
- Jaeger D, Kleinhans D, Czuppon AB et al.. Latex specific proteins causing immediate-type cutaneous, nasal, bronchial, and systemic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 673-8.
- Jain N, Mathur NB, Sharma VK, Dwarkadas AM. Cellular composition including lymphocyte subsets in pre-term and full-term human colostrum and milk. *Acta Pediatr Scand* 1991; 80: 395-9.

- Jarrett EEE, Miller HRP. Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy* 1982; 31: 282-287.
- Jeffrey PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Res Dis* 1991; 143: 1152-8.
- Jenkins MK. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol Today* 1992; 13: 69-73.
- Kaczmarek R, Silverman B, Gross T et. al. Prevalence of latex-specific IgE antibodies in hospital personnel. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 76: 51-6.
- Kajosaari M, Saarinen UM. Prophylaxis of atopic disease by six month's total solid food elimination. Evaluation of 135 exclusively breastfed infants of atopic families. *Acta Paediatr. Scand* 72: 411-414.
- Katsuki T, Shimojo N, Honma K, Tsunoo H, Kohno Y, Niimi H. Establishment and characterization of ovalbumin-specific T cell lines from patients with egg allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 Apr;109(4):344-51
- Kay AB. Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 1-12.
- Kay J, Gawkrödger DJ, Mortimer MJ et al. The prevalence of childhood atopic eczema via general population. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 35-9.
- Kehry MR, Yamashita LC. Low-affinity IgE receptor (CD23) function on mouse B cells: role in IgE-dependent antigen focusing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7556-7560.
- Kekwick R, Bhambri S, Chabane MH, Autegarden JE, Levy DA and Leynadier F. The allergenic properties of fresh and preserved *Hevea brasiliensis* latex protein preparations. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 337-342.
- Kelly KJ, Pearson ML, Kurup VP, Havens PL, Byrd RS, Setlock MA, Butler JC, Slater JE, Grammer LC, Resnick A, et al. A cluster of anaphylactic reactions in children with spina bifida during general anesthesia: epidemiologic features, risk factors, and latex hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 53-61.
- Kelly KP, Kurup V, Zacharisen M et al. Skin and serologic testing in the diagnosis of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 1140-5.
- Kelso A. Th 1 and Th 2 subsets: paradigms lost?. *Immunol Today* 1995;16:374-379.
- Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming

- growth factor beta, interleukin 4 and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992; 176: 1355-64.
- Kim KT, Safadi GS. Relation of latex-specific IgE titer and symptoms in patients allergic to latex. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 671-7.
 - Kim SM, Enomoto A, Hachimura S, Yamauchi K, Kaminogawa S. Serum antibody response elicited by a casein diet is directed to only limited determinants of alpha s1-casein. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101: 260-5.
 - Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253-62.
 - Kitani A Strober W. Regulation of Cg subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol* 1993;151:3478–3488.
 - Kojima S, Yamamoto N, Kanazawa T, Ovary Z. Monoclonal IgE-dependent eosinophil cytotoxicity to haptenated schistosomula of *Schistosoma japonicum*: enhancement of the cytotoxicity and expression of Fc receptor for IgE by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *J Immunol* 1985;134:2719–2722.
 - Kraft D, Ferreira F, Vrtala S, Breiteneder H, Ebner C, Valenta R, Susani M, Breitenbach M, Scheiner O. The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 171-6.
 - Kudo K, Okudaira H, Miyamoto T, Nakagawa T, Horiuchi Y. IgE antibody response to mite antigen in the mouse. Suppression of an established IgE antibody response by chemically modified antigen. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61: 1-9.
 - Kuitunen P, Rapola J, Savilahti E, Visakorpi JK. Response of the jejunal mucosa to cow's proteins in the malabsorption syndrome with cow's milk intolerance. *Acta Pediatr Scand* 1973; 62: 58-95.
 - Kurup VP, Alenius H, Kelly KJ, Castillo L, Fink JN. A two-dimensional electrophoretic analysis of latex peptides reacting with IgE and IgG antibodies from patients with latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996; 109: 58-67.
 - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 - Lagier F, Vervloet D, Lhermet I, Poyen D and Charpin D. Prevalence of latex allergy in operating room nurses. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 319-322.
 - Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ. Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998; 392: 90-93.

-
- Lau S, Wahn U. How allergenic are hypoallergenic formulas? In: Harms HK, Wahn U. Food allergy in infancy and childhood. Springer, Berlin Heidelberg New York 1989: 173-176.
 - Lavaud F, Cossart C, Reiter V, Bernard J, Deltour G, Holmquist I. Latex allergy in patients with allergy to fruit. *Lancet* 1992; 339: 492-493.
 - Lavaud F, Prevost A, Cossart C, Guerin L, Bernard J, Kochman S. Allergy to latex, avocado pear, and banana: evidence for a 30 kd antigen in immunoblotting. *Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 557-64.
 - Lavaud F, Prevost A, Cossart C, Guerin L, Bernard J, Koschman S. Allergy to latex, avocado, pear and banana- evidence for a 30 kDa antigen in immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 557-64.
 - Lepault F, Gagnerault MC. Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2000; 164: 240-7.
 - Levitz SM, Mathews HL, Murphy JW. Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today* 1995; 16: 387-391.
 - López AF, Strath M, Sanderson CJ. IgG and complement receptors on purified mouse eosinophils and neutrophils. *Immunology* 1981; 43: 779-86.
 - Lovegrove JA, Morgan JB, Hampton SM. Dietary factors influencing levels of food antibodies and antigens in breast milk. *Acta Paediatr* 1996; 85: 778-84.
 - Loveless MH. Allergy from corn and its derivatives : experiments with a masked ingestion test for its diagnosis. *J Allergy* 1950; 21: 500-9.
 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall LJ, 1951. Protein measurement with the foling phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75.
 - Lucey DR, Nicholson-Weller A, Weller PF. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1348-51.
 - Lundkvist U. Research and development of the RAST technology in *Advances in Diagnosis of Allergy: RAST*. Ed. Evans R III, Symposia Specialists, Miami, Florida 33161 USA: 1975, 85.
 - Mac Glasham DW, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, Mc Kenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Down-regulation of Fc (epsilon) RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol* 1997; 158: 1438-45.

-
- Madden KB, Urban JFJ, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD, Katona IM. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth induced mastocytosis. *J Immunol* 1991;147:1387–1391.
 - Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Palosuo T. Characterization of latex antigens and allergens in surgical gloves and natural rubber by immunoelectrophoretic methods. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 230-5.
 - Mäkinen-Kiljunen S. Banana allergy in patients with immediate-type hypersensitivity to natural rubber latex: Characterization of cross-reacting antibodies and allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 990-996.
 - Malik Z, Bottomley R, Austen B. Allergenic properties of the genetic variants A and B of bovine beta-lactoglobulin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 86: 245-8.
 - Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR. Total serum IgE levels and chromosome 5q. *Clin Exp Allergy* 1995; 25 (suppl.): 79-83.
 - Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 127-33.
 - Mauser PJ, Pitman AM, Fernandez X, Foran SK, Adams GK, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW. Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 467-72.
 - May CD, Alberto R. In vitro responses of leukocytes to food proteins in allergic and normal children: Lymphocyte stimulation and histamine release. *Clin Allergy* 1972; 2; 335-344.
 - McL Whitney R. Proteins of Milk. In: N.P. Wing, ed. *Fundamentals of dairy Chemistry*. N.Y. 1988: 81-169
 - McLaughlan P, Anderson K, Widdowson E, Coombs R. Effect of heat on the anaphylactic sensitizing capacity of cow's milk, goat's milk and various infant formulae fed to guinea pig. *Arch Dis Child* 1981; 56: 165-71.
 - Mega J, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine and Ig-producing cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5 and IFN-g-producing T cells, T cell receptor expression, and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J Immunol* 1992;148:2030–2039.
 - Meisel H, Frister H. Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein. *J Dairy Res* 1989; 56: 343-9.

-
- Menardo JL, Bousquet J, Rodiere M, Astruc J, Michel FB. Skin test reactivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 646-51.
 - Mercier JC, Brignon G, Ribadeau-Dumas B. Primary structure of α_{s1} casein bovine. Complete sequence. *Eur J Biochem* 1971; 23: 41-51.
 - Metzger H. Transmembrane signalling: the joy of aggregation. *J Immunol* 1992; 1498: 1477-87.
 - Mikkola JH, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 1005-12.
 - Miyajima I, Dombrowski D, Martin TR, Ravetch JV, Kinoshita JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG₁ and Fc γ RIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgG₁-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 1997; 99: 901-914.
 - Moneo I, Nocito M, Rodriguez C, Munoz D, Fernandez de Corres L. Covalent-binding native blot in the determination of specific IgE to latex glove allergens. Comparison with other methods. *Allergol Immunopathol* 1993; 21: 101-6.
 - Moneret-Vautrin D, Beaudouin E, Widmer S. Prospective study of risk factors in natural rubber latex hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 668-77.
 - Morr CV. Effect of oxalate and urea on the ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J Dairy Res* 1967; 50: 174-51.
 - Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
 - Mosmann TR, Coffman RL. TH 1 and TH 2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
 - Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 1987; 139: 2669-2674.
 - Nakagomi T, Itaya H, Tominaga T, et al. Is atopy increasing? *Lancet* 1994; 343: 121-2.
 - Nakajima H, Hachimura S, Nishiwaki S, Katsuki T, Shimojo N, Ametani A, Kohno Y, Kaminogawa S. Establishment and characterization of alpha s₁-casein-specific T-cell lines from patients allergic to cow's milk: unexpected higher frequency of CD8⁺ T-cell lines. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1342-9.

- Niestijl Jansen JJ, Kardinaal AFM, Huijbers GH, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BP, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 446-56.
- Niggemann B, Buck D, Michael T, Wahn U. Latex provocation tests in patients with spina bifida: who is at risk of becoming symptomatic?. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 665-70.
- Niggemann B, Sielaff B, Beyer K, Binder C, Wahn U. Outcome of double-blind, placebo-controlled food challenge tests in 107 children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 91-96.
- Noguchi H, Kephart GM, Colby TV, Gleich GJ. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 541-8.
- Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem* 1999; 274: 17132-8.
- O'Hehir RE, Verhoef A, Panagiotopoulou E, Keswani S, Hayball JD, Thomas WR, Lamb JR. Analysis of human T cell responses to the group II allergen of *Dermatophagoides* species: localization of major antigenic sites. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 105-13.
- Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* 1996; 97: 1761-66.
- Okudaira H, Ishizaka K. Reaginic antibody formation in the mouse. Participation of long-lived antibody-forming cells in persistent antibody formation. *Cell Immunol* 1981; 58: 188-201.
- Olesen AB, Ellingsen AR, Olesen H, Juul S, Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *BMJ* 1997; 314: 1003-8.
- Orfan N A, Reed R, Dykewicz M S, Ganz M and Kolski.G: Occupational asthma in a latex doll manufacturing plant. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 826-830.
- Osterlund P, Jarvinen KM, Laine S, Suomalainen H. Defective tumor necrosis factor- α production in infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 186-90.
- Otani H, Hori H, Hosono A. Antigenic reactivity of dephosphorylated α s1-casein, phosphopeptide from β -casein and o-phospho-L-serine towards the antibody to native α s1-casein. *Agric Biol Chem* 1987; 51: 2049-54.

-
- Otsuka H, Denburg J, Dolovich J, Hitch D, Lapp P, Rajan RS, Bienenstock J, Befus D. Heterogeneity of metachromatic cells in human nose: significance of mucosal mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 695-702.
 - Ownby D. Is rubber elongation factor the major allergen of latex?. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 633-5.
 - Pahud JJ, Schwarz K. Research and development of infant formulas with reduced allergenic properties. *Ann Allergy* 1984; 53: 609-614.
 - Palkowtz KH, Royer CL, Garofalo L, Rudloff HE, Schamallstieg FC, Goldman AS. Production of interleukin-6 and interleukin-8 by human mammary gland epithelial cells. *J Reprod Immunol* 1994; 26: 57-64.
 - Palosuo T, Makinen-Kiljunen S, Alenius H, Reunala T, Yip E, Turjanmaa K. Measurement of natural rubber latex in medical gloves by allergen-specific IgE ELISA inhibition, RAST inhibition and skin prick test. *Allergy* 1998; 53: 59-67.
 - Palumbo M. Milk and milk products. In: P.C. Paul and H.H. Palmer, eds. *Food Theory and Applications*. John Wiley and Sons, N.Y. 1972, 563-611
 - Palumbo M. Milk and milk products. In: P.C. Paul and H.H. Palmer, eds. *Food Theory and Applications*. John Wiley and Sons, N.Y. 1972: 563-611
 - Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North AC, Findlay JB, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ. The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 1986; 324: 383-5.
 - Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4538-42.
 - Parry RM, Carroll RJ. Lactation of κ casein in milk micelles. *Biochim Biophys Acta* 1969; 194: 138-150.
 - Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc ϵ RI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 1997;99:1492-1499.
 - Pearlman E, Hazlett FE Jr, Boom WH, Kazura JW. Induction of murine T-helper-cell responses to the filarial nematode *Brugia malayi*. *Infect Immun* 1993;61:1105-1112.
 - Perkkio M, Savilahti E, Kuitunen P. Morphometric and immunohistochemical study of jejunal biopsies from children with intestinal soy allergy. *Eur J Pediatr* 1981; 137: 63-9.

-
- Peters SP, Schleimer RP, Naclerio RM, et al. The pathophysiology of human mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1196–1200.
 - Pisati G, Baruffini A, Bernabeo F, Stanizzi R. Bronchial provocation testing in the diagnosis of occupational asthma due to latex surgical gloves. *Eur Respir J* 1994; 7: 332-6.
 - Plebani A, Albertini A, Scotta S, Ugazio AG. IgE antibodies to hydrolysate of cow milk proteins in children with cow milk allergy. *Ann Allergy* 1990; 64: 279-80.
 - Plebani A, Restani P, Naselli A, Galli CL, Meini A, Cavagni G, Ugazio AG, Poiesi C. Monoclonal and policlonal antibodies against casein components of cow milk for evaluation of residual antigenic activity in hypoallergenic infant formulas. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 949-56.
 - Pockley AG, Montgomery PC. In vivo adjuvant effect of interleukins 5 and 6 on rat tear IgA antibody responses. *Immunology* 1991;73:19–23.
 - Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 1996 ; 97: 604-12.
 - Posch A, Chen Z, Dunn MJ, Wheeler CH, Petersen A, Leubner-Metzger G, Baur X. Latex allergen database. *Electrophoresis* 1997; 18: 2803-10.
 - Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ. Genetic susceptibility to asthma: Bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995; 333: 894-900.
 - Powell GK. Milk and soy induced enterocolitis of infancy: clinical features and standardization of challenge. *J Pediatr* 1978; 93: 553-60.
 - Price JA, Pollock I, Little SA, et al. Measurement of airborne mite antigen in the homes of asthmatic children. *Lancet* 1990; 336: 895-7.
 - Pritchard DI, Williams DJ, Behnke JM, Lee TDG. The role of IgG1 hypergammaglobulinemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius*. The immunochemical purification, antigen specificity and in vivo anti-parasite effect of IgG1 from immune serum. *Immunology* 1983;49:353–365.
 - Purasiri P, Murray A, Richardson S, et al. Modulation of cytokine production *in vivo* by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. *Clin Sci* 1994; 87: 711-7.

-
- Rabe KF, Watson N, Dent G, Morton BE, Wagner K, Magnussen H, Heusser CH. Inhibition of human airway sensitization by a novel monoclonal anti-IgE antibody, 17-9. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1429-35.
 - Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. Preferential induction of a Th 1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5141-45.
 - Reddy IM, Kella NKD, Kinsella JD. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 737-41.
 - Reinheimer G and Ownby.D R: Prevalence of latex-specific IgE antibodies in patients being evaluated for allergy. *Ann Allergy , Asthma and Immunol* 1995; 74: 184-187.
 - Renz H, Brehler C, Petzoldt S, Prinz H, Rieger CH. Breast feeding modifies productions of SIgA cow's milk antibodies in infants. *Acta Pediatr Scand* 1991; 80: 149-54.
 - Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, Poiesi C, Velona T, Ugazio AG, Galli CL. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin Exp Allergy* 1999; 29; 997-1004.
 - Restani P, Plebani A, Velona T, Cavagni G, Ugazio AG, Piesi C, Muraro A, Galli CL. Use of immunoblotting and monoclonal antibodies to evaluate the residual antigenic activity of milk protein hydrolysed formulae. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1182-7.
 - Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, Galli CL. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolyzed protein formulas. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 651-8.
 - Robinson C, Kalsheker NA, Srinivasan N. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterisation. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 10-21.
 - Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Cytokines. III. Cytokines in asthma. *Thorax* 1993;148:401–406.
 - Robinson DS, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased Th 2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313–324.

-
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiocopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326: 298-304.
 - Romagnani S. Human TH 1 and TH 2 subsets: doubt no more. *Immunology Today* 1991; 12: 256-7.
 - Rozynek P, Posch A, Baur X. Cloning, expression and characterization of the major latex allergen prohevein. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1418-26.
 - Rugo E, Wahl R, Wahn U. How allergenic are hypoallergenic infant formulae? *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 635-639.
 - Rumbo M, Chirido F, Añón MC, Fossati CA. Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and β -lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 453-8.
 - Saarinen KM, Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E. Transforming growth factor-beta1 in mothers' colostrum and immune responses to cows' milk proteins in infants with cows' milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1093-8.
 - Saarinen KM, Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E. Transforming growth factor-beta1 in mothers' colostrum and immune responses to cows' milk proteins in infants with cows' milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 1093-8.
 - Saloga J, Bellinghausen I, Knop J. Do Tr1 cells play a role in immunotherapy?. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 210-1.
 - Sampson H. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J All Clin Immunol* 1999; 103: 717-727.
 - Sampson HA, Broadbent KR, Bernhisel-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *New Engl J Med* 1989 ; 321: 228-232.
 - Sampson HA, Jamres JM, Bernhisel-Broadbent J. Safety of an aminoacid- derived infant formula in children allergic to cow milk. *Pediatrics* 1992; 90: 463-5.
 - Sampson HA, Scanlon SM. Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 1989; 115: 23-27.
 - Sampson HA. Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 718-26.
 - Sampson HA. The role of food hypersensitivity and mediator release in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 63: 102-6.

- Savilahti E, Kuitunen M. Allergenicity of cow milk proteins. *J Pediatr* 1992; 121: S12-S20.
- Saylor JD, Bahna SL. Anaphylaxis to casein hydrolysate formula. *J Pediatr* 1991; 118: 71-4.
- Scheiner O, Wagner B, Wagner S, Krebitz M, Cramer R, Niggemann B, Yeang HY, Ebner C, Breiteneder H. Cloning and molecular characterization of Hev b 3, a spina-bifida-associated allergen from *Hevea brasiliensis* latex. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:311-2.
- Schleimer RP. Glucocorticosteroids. Their mechanisms of action and use in allergic diseases. In: Middleton E Jr, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1993: 893-925.
- Schrandt J, van der Bogart JPH, Forget PP, Schrandt-Stumpel CT, Kuijten RH, Kester AD. Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 640-4.
- Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells and basophils. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice*. vol I. St. Louis: Mosby-Year Book, 1993: 135-168.
- Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-673.
- Seo N, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cell activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type gammadelta T and alphabeta T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions. *J Immunol* 1998;161: 4138-45.
- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996; 347: 1742-6.
- Shaikh N, Rivera J, Hewlett BR, Stead RH, Zhu F-G, Marshall JS. Mast cell FcεRI expression in the rat intestinal mucosa and tongue is enhanced during *Nippostrongylus brasiliensis* infection and can be up-regulated by *in vivo* administration of IgE. *J Immunol* 1997; 158: 1438-1445.
- Shimmin PD, Hill RD. An electron microscope study of the internal structure of casein micelles. *J Dairy Res* 1964; 31: 121-3.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-9.

- Shirwaka T, Li A, Dubowitz M. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high affinity IgE receptor. *Nat Genetics* 1994; 7: 125-129.
- Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and non atopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99: 699-706.
- Slater E, Trybul D. Immunodetection of latex antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 825-30.
- Slater J E: Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 139-149.
- Slater J. Rubber anaphylaxis. *N England J Med* 1989; 320: 626-31.
- Slater JE, Chhabra SK. Latex antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1992: 89:673-678.
- Slater JE. Allergic reactions to natural rubber. *Ann Allergy* 1992: 68: 203-209.
- Slattery CW, Edvard R. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim Biophys Acta* 1973; 317: 529-38.
- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1988;167:183-196.
- Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, et al. Induction of IgG3 secretion by interferon-gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 1992;175:1367-1371.
- Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944-947.
- Soothill JF. The role of immuno-deficiency in allergy. *Clin Allergy* 1973; 3 : 473.
- Sowka S, Wagner S, Krebitz M, Arija-mad-Arif S, Yusof F, Kinaciyan T, Scheiner O, Breiteneder H. cDNA cloning of the 43 kDa allergen Hev b7 with sequence similarity to patatins and its expression in yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 1998; 255: 213-9.
- Spuerger P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J. Allergenic epitopes of bovine alpha1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy* 1996; 51: 306-12.
- Spuerger P, Walter M, Chiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H. Allergenicity of alpha -casein from cow, sheep and goat. *Eur J Allergy Clin Immunol* 1997; 52: 293-8.
- Standard Test Method for Analysis of Protein Rubber and its Products. ASTM Designation: D 5712-95. Annual Book of ASTM Standards, vol. 14.02, June 1995.

- Steinberger P, Kraft D, Valenta R. Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. Isolation and characterization of human IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5. *J Biol Chem* 1996; 271: 10967-72.
- Strachan DP, Harkins LS, Johnston ID, Anderson HR. Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 6-12.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60.
- Strobel S. Dietary manipulation and induction of tolerance. *J Pediatr* 1992; 121: S74-S79.
- Suomalainen H, Soppi E, Isolauri E. Evidence for eosinophil activation in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5: 27-31.
- Sussman G, Tarlo S, Dolovich J. The spectrum of IgE-mediated responses to latex. *JAMA* 1991; 265: 2844-7.
- Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Oral cow milk challenge abolishes antigen-specific interferon-gamma production in the peripheral blood of children with atopic dermatitis and cow milk allergy. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 277-83.
- Swanson MC, Bubak ME, Hunt LW, Yunginger JW, Warner MA, Reed CE. Quantification of occupational latex aeroallergens in a medical center. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 445-51.
- Swenson RP, Williams CH, Massey V, Ronchi S, Minchiotti L, Galliano M, Curti B. The primary structure of D-amino acid oxidase from pig kidney: I Isolation and sequence of the tryptic peptides. *J Biol Chem* 1982; 257: 8817-23.
- Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells: B-cell proliferation and maturation. *Cancer Res* 1992; 52: 5554s-5556s.
- Szepefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, Herkner K, Urbanek R. Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 28-35.
- Takahashi T, Yamauchi K, Kaminogawa S. Comparison between the antigenicity of native and unfolded beta-lactoglobulin. *Agric Biol Chem* 1990; 54: 691-7.
- Theissen U, Theissen JL, Mertes N, Brehler R. IgE-mediated hypersensitivity to latex in childhood. *Allergy* 1997; 52: 665-669.
- Tijssen P. *Practice and Theory of enzyme immunoassay*. Elsevier. Amsterdam. 1985.
- Tomazic V, Champagne E, Lamanna A, Withrow T, Adkinson N, Hamilton R. Cornstarch powder on latex products is an allergen carrier *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 751-758.

- Tomazic VJ, Withrow TJ, Fisher BR, Dillard SF. Latex-associated allergies and anaphylactic reactions. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 64: 89-97.
- Toru H, Ra C, Nonoyama S, Suzuki K, Yata J, Nakahata T. Induction of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 1996; 8: 1367-1373.
- Tsang VCW, Peralta JN, Simons AR. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying by gel electrophoresis. *Meth Enzymol.* 1983: 92:377-391.
- Turjanmaa K, Laurila K, Mäkinen-Kiljunen S, . Rubbe contact urticaria. Allergenic properties of 19 brands of latex gloves. *Contact Dermatitis* 1988; 19: 362-7.
- Vallier P, Balland S, Harf R, Valenta R, Deviller P. Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: clinical implications. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 332-9.
- Van Neerven RJ, van de Pol MM, van Milligen FJ, Jansen HM, Aalberse RC, Kapsenberg ML. Characterization of cat dander-specific T lymphocytes from atopic patients. *J Immunol* 1994; 152:4203-10.
- Van Neerven RJ, van t'Hof W, Ringrose JH, Jansen HM, Aalberse RC, Wierenga EA, Kapsenberg ML T cell epitopes of house dust mite major allergen Der p II. . *J Immunol* 1993; 151: 2326-35.
- Wagner B, Krebitz M, Buck D, Niggemann B, Yeang HY, Han KH, Scheiner O, Breiteneder H. Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1084-92.
- Wahn U, Wahl R, Rugo E. Comparison of the residual allergenic activity of six different hydrolyzed protein formulas. *J Pediatr* 1992; 121: 80-84.
- Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy* 1998; 53: 1013-22.
- Walker WA. Pathophysiologic of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Ann Allergy* 1987; 59: 7-16.
- Warner JA, Miles EA, Jones Ac, et al. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 423-30.
- Waugh DF, Creamer LK, Slattery CW, Dresdner GW. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry* 1970; 9: 786-95.
- Waugh DF, Ludwig ML, Gillespie JM, Melton B, Foley M, Kleiner ES. The αs-caseins of bovine milk. *J Am Chem Soc* 1962; 84: 4929-38.

-
- Webber SA, Graham-Brown RAC, Hutchinson PE, Burns DA. Dietary manipulation in childhood atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1989; 121: 91-8.
 - Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR dependent, MHC-restricted antigen presentation and interleukin- α expression. *J Immunol* 1993; 150: 2554-62.
 - Whittington PF, Gibson R. Soya protein intolerance: four patients with concomitant cow's milk intolerance. *Pediatrics* 1977; 59: 730-2.
 - Whitney RM, Brunner JR, Ebner KE, Farrell HM Jr, Josephson RV, Morr CV, Swaisgood HE. Nomenclature of the proteins of cow's milk: fourth revision. *J Dairy Sci* 1976; 59: 795-815.
 - Whittington PF, Gibson R. Soy protein intolerance: four patients with intestinal soy allergy. *Pediatrics* 1977; 59: 730-2.210.
 - Wierenga EA, Snoek M, De Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. Evidence for compartmentalization of functional subset of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144: 4651-6.
 - Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg M. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144: 4651-6.
 - Wilder JA, Koh CY Yuan D. The role of NK cells during in vivo antigen-specific antibody responses. *J Immunol* 1996; 156: 146-152.
 - Wrangsjö K, Wahlberg J, Axelsson IGK. IgE-mediated allergy to natural rubber in 30 patients with contact urticaria. *Contact Dermatitis* 1988; 19: 264-271.
 - Wuthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90: 3-10.
 - Wuthrich B, Schindler C, Leuenberger P et al. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult populations of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss study on Air pollution And Lung Disease In Adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1995; 106: 149-56.
 - Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton R, Cardoso MJ. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 628-639.

- Ylitalo L, Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. IgE antibodies to prohevein, hevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 659-64.
- Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet* 1994; 343: 1127-30.
- Yunginger JW, Jones RT, Fransway AF, Kelso JM, Warner MA, Hunt LW. Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. *J Allergy Clin Immunol*. 1994; 93: 836-42.
- Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1179-90.