

## Sumario

### EDITORIAL

20 años no es nada...

55

Silvana Corelli - Editora

### TEMAS DE REVISIÓN

Alergia alimentaria: Estrategias diagnósticas y terapéuticas. Pruebas de alergia, dietas de exclusión y pruebas de provocación

57

*Food allergy: Diagnoses and therapeutics strategies Allergy test, elimination diet and food-challenge proof*

Ana María Fernández

Inmunoglobulina E: Regulación de la síntesis normal y Síndrome de hiper IgE

69

*E Immunoglobulin: natural synthesis adjustment and Hyper IgE syndrome*

Adriana I. Cassinerio

### TRABAJOS ORIGINALES

Evaluación de la inmunidad celular en la alergia a proteínas de leche de vaca.

77

Avances en su diagnóstico

*Evaluation of the cellular immunity in cow's milk allergy. Progress in its diagnosis*

Rubén Darío Motrich, Claudio Gottero, Carlos Rezzónico (h), Carlos Rezzónico, Clelia María Riera y Virginia Elena Rivero

Respuesta de anticuerpos a la avenina en niños con enfermedad celíaca

86

*Antibody response against avenin in children with celiac disease.*

Teresa Beatriz Talavera, Gustavo Bonacci, Néldia Azar de Aldao, Mario Aldao, Ramón Asis, Mónica Antolín, Carolina Riga

Valoración de proteínas de fase aguda en pacientes con injuria térmica

97

*Valoration of acute phase protein in thermal injured patients*

Pedano Valeria, Demarchi Marcela

### COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS

The food anaphylaxis vigilance network in france

104

*Red de vigilancia en anafilaxia alimentaria en francia*

Graciela Gonzalez de Niro

### SAIC INFORMA

107

### REGLAMENTO

108

## COMITÉ EDITORIAL 2004

Editor:

**Dra. Silvana P. Corelli**

Centro de Investigación y Diagnóstico en Inmunopatología (CIDI). Servicio de Alergia e Inmunología Hospital San Roque Córdoba, Argentina.

Co-Editor:

**Dra. María C. Daraio**

Servicio de Alergia e Inmunología Hospital Privado Córdoba, Argentina.

Editores Asociados:

**Dra. Marta Cavallo**

**Dr. Julio C. Orellana**

**Dra. Dora Felipof**

## COMITE CONSULTIVO 2004

Dr. Norberto Gallino

Dr. Osvaldo E. Kahn

Prof. Dr. Guillermo E. Lucena

Dra. Gladi P. de Barrionuevo

Dr. Raimundo Camps

Dr. Luis A. Giraudó

Dr. Juan C. Muiño

Dr. Marcelo Garzón Duarte

Dr. Carlos E. Baena-Cagnani

Prof. Dr. Juan C. Copioli

Dr. Luis M. Cibils

Dr. Pedro Vucovich

Dr. Mauricio Reviglioni

Dr. Ricardo Setto

Dra. María C. Minervini

Dra. Cecilia M. Patiño

Dr. Jorge S. Alvarez

Dr. Ricardo J. Saranz

Esta revista se indexa para LILACS - Literatura Latinoamericana de Ciencias de la Salud, base de datos que contiene la producción bibliográfica en Salud, producida por todos los países de la Región de América Latina y el Caribe; esta indización se realiza por la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y puede consultarse sin costo en <http://www.bvs.org.ar> y en <http://bireme.br> y en <http://www.fcm.unc.edu.ar/biblio/index.html>

## COMISIÓN DIRECTIVA AAAIC 2003/2004

Presidente:

**Dra. Marta Cavallo**

Vicepresidente:

**Dra. Susana de Barayazarra**

Secretaria de Actas y Biblioteca:

**Dra. Silvia Missakian**

Secretaria Científica:

**Dra. Maria Cristina Daraio**

Tesorera:

**Dra. Rosana Barrera**

Secretario del Interior:

**Dr. Ricardo Setto**

Secretaria de Prensa y Difusión:

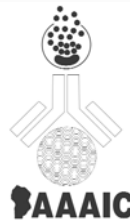
**Dra. Beatriz Amuchástegui de Viale**

Vocales:

**Dr. Julio C. Orellana**

**Dra. Perla Merovich**

**Prof. Dr. Juan Carlos Copioli**



**Secretaría AAAIC**

Círculo Médico de Córdoba

Ambrosio Olmos 820 (X5000JGQ)

Córdoba - Argentina - Tel: 54 351 4683134

e-mail: [secretaria\\_saic@fullzero.com.ar](mailto:secretaria_saic@fullzero.com.ar)

## ARTE, DIAGRAMACIÓN E IMPRESIÓN



Tel: 4213771 - Cel: 155418823

E-mail: [directorio@bunkercyn.com.ar](mailto:directorio@bunkercyn.com.ar) / [hernan\\_sieber@yahoo.com](mailto:hernan_sieber@yahoo.com)

Edición Trimestral con un suplemento anual  
Sociedad de Alergia e Inmunología de Córdoba  
Tirada: 1.000 ejemplares

## SUSCRÍBASE A *Alergia e Inmunología Clínica*



Si Usted desea suscribirse a a la revista Alergia e Inmunología Clínica por cuatro números anuales, por un costo de \$30, envíe los siguientes datos por mail a: [secretaria\\_saic@fullzero.com.ar](mailto:secretaria_saic@fullzero.com.ar) o dirigirse personalmente o por correo a Ambrosio Olmos 820, (X5000JGQ) Córdoba, Argentina.

Apellido ..... Nombres .....

Calle ..... NP ..... Piso ..... Dpto .....

Ciudad ..... C.P.: ..... País ..... Tel ..... Fax .....

e-mail ..... Profesión - Especialidad .....

# 20 años no es nada...

Un 16 de agosto de 1984, la Comisión Directiva de la Sociedad de Alergia e Inmunología de Córdoba decide crear su propio órgano de difusión, y con el nombre de Boletín de Alergología e Inmunología, en diciembre de ese mismo año aparece el Volumen 1 N° 1 de nuestra actual revista. En la editorial de esa primera edición el Dr. Garzón Duarte, editor y presidente de la SAIC, comienza diciendo: *“Solamente con el pleno convencimiento de los beneficios de la unión de sus asociados, la generosidad y la buena voluntad de los mismos es que se pueden efectuar obras”*.

En éstos 20 años el avance de la medicina en general y de la inmunología en particular, han sido revolucionarios, la investigación científica ha tenido logros más que significativos, pero no debemos olvidar que todos éstos avances en el conocimiento tienen un solo y único fin: aliviar a nuestros pacientes, objetivo primordial de toda investigación y publicación científica, si lo que leemos no nos sirve a éste fin, habrá caído en saco roto.

Quiero agradecer:

A todos los que me precedieron como editores, los Doctores Garzón Duarte, Gallino, Khan, Lucena, Barrionuevo, Camps, Giraud, Muiño, Baena Cagnani, Copioli, Cibils, Vucovich, Revigliano, Setto, Minervini, Patiño, Alvarez, Saranz, porque marcaron el camino.

A la Comisión Directiva de la AAAIC, y en especial a su presidenta Dra. Marta Cavallo, por su apoyo incondicional.

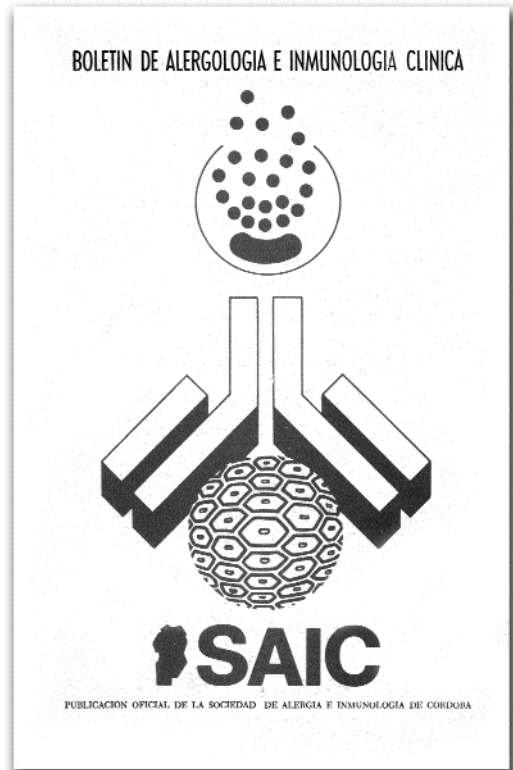
A los colegas que publicaron sus artículos, por confiar en nuestro proyecto.

A los lectores, porque sin ellos nuestro trabajo no tendría sentido.

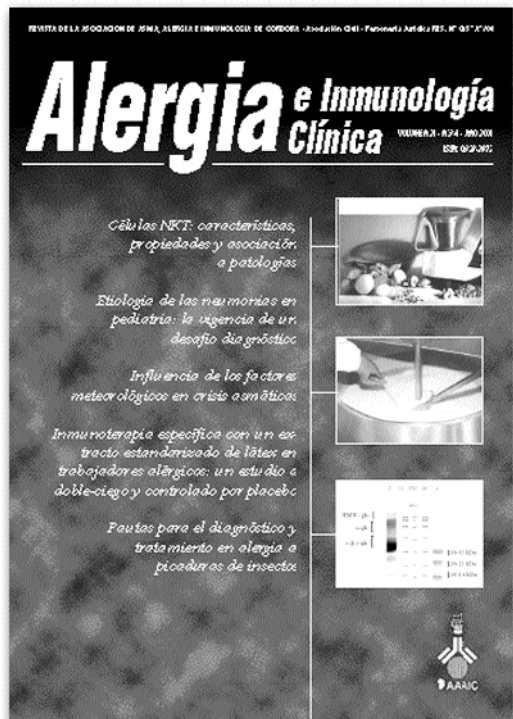
A la Industria Farmacéutica por su colaboración permanente.

Han pasado 20 años de intensa, fructífera e ininterrumpida labor, muchas obras se realizaron y muchas quedan por hacer. Las metas alcanzadas, tales como los avances tecnológicos en materia gráfica y editorial, la indexación en LILACS (Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud), la distribución a través de la UNC a más de 40 Universidades de todo el mundo, la publicación de artículos de primer nivel, etc., nos obligan aún más y nos compromete a seguir trabajando en el noble proyecto de actualizar a nuestros lectores, para construir juntos un futuro aún mejor, porque 20 años no es nada... recién comenzamos.

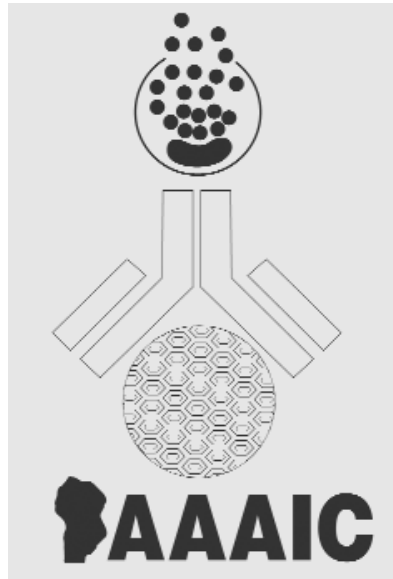
**Dra. Silvana Corelli**  
Editora



Volumen 1 - N° 1 - Año 1984



Volumen 21 - N° 3-4 - Año 2004



# Alergia alimentaria: Estrategias diagnósticas y terapéuticas

## Pruebas de alergia, dietas de exclusión y pruebas de provocación

### Food allergy: Diagnoses and therapeutics strategies Allergy test, elimination diet and food-challenge proof

Ana María Fernández \*

#### ■ Resumen

Resulta complejo establecer relaciones causa-efecto en los diagnósticos de alergia alimentaria frente a las manifestaciones clínicas que se presentan en pacientes con dietas mixtas y variadas. No ocurre así, en el primer año de vida, cuando la introducción de los alimentos en la dieta se lleva a cabo en forma progresiva. Dos líneas de trabajo están contribuyendo a mejorar la capacidad diagnóstica, una tendencia hacia la estandarización de los procedimientos diagnósticos y nuevas técnicas desarrolladas en biología molecular.

En efecto, trabajos internacionales remarcan la necesidad de establecer un estándar en el ordenamiento de los procedimientos para llegar al diagnóstico de alergia alimentaria. El mismo debe iniciarse con una realización detallada de la historia clínica durante la primer consulta, continuar con tests cutáneos y pruebas de laboratorio, a las que deben seguirle las dietas de exclusión para concluir, por último, con las pruebas de provocación controlada para la confirmación diagnóstica.

Algunas técnicas desarrolladas en biología molecular permitirían un mejoramiento de la especificidad de los antígenos alimentarios con lo que se abren perspectivas de nuevas terapias en reemplazo a la actual supresión del alimento ofensor.

De todas maneras, la educación de los pacientes en el reconocimiento temprano de los síntomas cuando hay ingesta accidental y la realización de un tratamiento medicamentoso adecuado siguen siendo prácticas vigentes y recomendables.

#### ■ Summary

*It is difficult to determinate the relationship between food sensitization and allergic clinical manifestations. As our knowledge, cow's milk allergy is a manifestation of failure of oral tolerance in the first year of life, when the food is incorporated in the regular diet.*

*The allergen structure function relationship increasingly possible to devise a coherent classification of food allergens based in protein families.*

*Two works lines contributed to improve diagnosis of food allergy, one of them are the clinical and laboratory standard procedures and the other is the develop molecular biology techniques to define the potential allergenicity of a protein in foods.*

*The approach to diagnosing adverse food reactions is the medical history. This continues to be the mainstay in diagnostic process, attempting to establish whether a food induces allergic reaction occurred, which food was involved and what allergic mechanism was likely involved. Diet diaries can be a useful element to clinical history, especially in chronic disorders. Elimination diets are implemented both diagnostic and therapeutic purposes. In some cases several weeks with diet are necessary to stabilize patients before conducting food challenges.*

*Laboratories studies: for IgE mediated disorders, skin prick tests provide a rapid method to screen patients for sensitivity to specific foods. Negative prick test responses to foods confirmed the absence of IgE mediated allergy reactivity (negative predictive accuracy > 95 %). RAST and similar procedures in vitro provide suggestive evidence of IgE mediated food allergy.*

*Food allergens: the diversity of the human diet is enormous and yet relatively few foods account for the majority of food allergies around the world. The molecular definitions of different kind of foods clarify the structures and the possible determinants with capacity to induce IgE responses.*

*The final step is the educational program to patients in order to prevent, treat the food allergy.*

#### Para citar este artículo:

Fernández AM. Alergia alimentaria: Estrategias diagnósticas y terapéuticas. Pruebas de alergia, dietas de exclusión y pruebas de provocación *Alerg Immunol Clin* 2004; 21(3-4):57-67.

\* Especialista en Alergia e Inmunología Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Sucre

■ Palabras Clave:  
Reacciones adversas a alimentos.  
Hipersensibilidad mediada por IgE.  
Dietas de exclusión.  
Prueba de provocación doble ciego controlada.

■ Key Words:  
*Adverse food reactions.  
Hypersensitivities IgE mediated.  
Elimination diet.  
Double-blind placebo-controlled food-challenge.*

■ Abreviaturas:  
AA: alergia alimentaria.  
Ac: anticuerpo.  
Ag: antígeno.  
CAP-FEIA: prueba de laboratorio de detección de IgE para Ag específicos.  
ES: especificidad.  
IgE: inmunoglobulina E.  
IL-4: interleukina 4.  
IL-10: interleukina 10.  
PPODCC: prueba de Provocación Oral Doble ciego Controlada.  
RAST: radio Alergo Sorben Test.  
SE: sensibilidad.  
VPN: valor predictivo negativo.  
VPP: valor predictivo positivo.

## I - Clasificación de las reacciones adversas a alimentos

En 1984 la American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAA&I) junto con el National Institute of Health publican un manual caracterizando las reacciones adversas a alimentos<sup>1</sup>. A partir de 1990 comienza la revisión de ese manual. En 1995 el subcomité de reacciones adversas de la European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), publica un position paper<sup>2</sup> con el propósito de alcanzar consenso en la terminología y clasificación de estas reacciones.

La clasificación propuesta incluye dos tipos de reacciones básicas, las tóxicas y las no tóxicas según el agente que las provoca y los mecanismos inmunológicos involucrados en las mismas.

### I a - Reacciones adversas a alimentos

Las reacciones tóxicas son alteraciones producidas por toxinas o microorganismos que están presentes en los alimentos, sin que participen mecanismos inmunológicos. Estas reacciones poseen manifestaciones clínicas similares a las de la hipersensibilidad alimentaria.

Las reacciones no tóxicas son aquellas que se producen a partir de mecanismos inmunológicos o bien por intolerancia del organismo frente a la ingesta de alimentos en condiciones normales.

Dentro de las reacciones inmunológicas se incluyen las reacciones mediadas por mecanismos IgE. En estos casos estamos en presencia de procesos de alergia alimentaria.

Siguiendo con esta clasificación se observa dentro de las reacciones

no tóxicas mediadas inmunológicamente aquellas producidas por mecanismos mixtos (mecanismos mediados por IgE y por células) y las mediadas por células.

Entre las reacciones producidas por mecanismos mixtos se incluyen patologías a nivel gastrointestinal (p.e. esofagitis alérgica eosinofílica y gastroenteritis alérgica eosinofílica), a nivel cutáneo (p.e. dermatitis atópica) y a nivel respiratorio (p.e. asma bronquial).

Entre las reacciones mediadas por células se incluyen patologías a nivel gastrointestinal (p.e. enterocolitis y proctocolitis inducida por proteínas alimentarias, síndromes enteropáticos inducidos por proteínas y la enfermedad celíaca), a nivel cutáneo (p.e. dermatitis de contacto y la herpetiforme) y a nivel respiratorio (p.e. hem siderosis pulmonar inducida por alimentos o síndrome de Heiner).

Las manifestaciones alérgicas enumeradas en estas dos categorías (tanto por mecanismos mixtos como por células) no serán tratadas en el presente trabajo.

Por otra parte, las reacciones no inmunológicas o intolerancia<sup>3</sup> pueden ser producidas por déficit enzimático (p.e. déficit de disacaridasas: lactasa, sucrosa-isomaltasa, glucosa-galactosa), o por agentes farmacológicos endógenos presentes en determinados alimentos (p.e. la teobromina presente en chocolate con acción diurética e hipotensora; la tiramina presente en tomate, quesos fermentados y algunos vinos con acción simpaticomimética; la serotonina presente en tomate y ciruela que aumenta el peristaltismo intestinal). Las reacciones no inmunológicas pueden presentar expresiones clínicas que simulan reacciones alérgicas.

Recientemente la EAACI introdujo algunos cambios en esta clasificación, publicados en 2001<sup>4</sup>, llamando hipersensibilidad alérgica a las reacciones adversas y no hipersensibilidad alérgica a la intolerancia<sup>5,6,7,8</sup>.

### I b - Reacciones cruzadas

Las reacciones cruzadas son aquellas alteraciones producidas por la ingestión de alérgenos alimentarios que al tomar contacto con anticuerpos para antígenos de inhalantes o alimentos ingeridos con anterioridad, desencadenan algún tipo de sintomatología alérgica. Los antígenos involucrados en este mecanismo se describen más adelante.

## II - hipersensibilidad alimentaria (reacciones mediadas por IgE)

Más allá de la variedad de reacciones incluidas en la clasificación antes mencionada, la presente sección desarrollará específicamente los aspectos centrales de la hipersensibilidad alimentaria mediada por IgE describiendo las características de las vías de sensibilización y los tipos de antígenos involucrados, la patogénesis y sus manifestaciones clínicas, así como la problemática de la tolerancia.

### II a - Vías de sensibilización y tipos de antígenos

Es muy amplia la diversidad de alimentos que los individuos ingieren diariamente, sin embargo, en distintos lugares del mundo las personas que padecen algún tipo de alergia lo hacen con unos pocos alimentos. Leche, huevo, maní, nuez, pescados y mariscos son los que ocupan los primeros lugares en frecuencia<sup>9,10,11,12,13</sup>.

En la última década, la proteómica, ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes, ha permitido acceder al conocimiento de la dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo determinadas circunstancias. Cuando una célula es agredida por un Ag u otros agentes, las células producen Ac específicos para ese tipo de agresión y no otra.

La vía de sensibilización a alérgenos alimentarios que ocurre en el tracto gastrointestinal se denomina forma clásica o Clase I. Los antígenos son glicoproteínas solubles en agua, compuestas por epítopes lineales siendo estos aminoácidos secuenciales los que tienden a producir alergia persistente.

Otra forma de sensibilización puede ser producida por alérgenos inhalatorios denominada Clase II o vía no clásica. En este caso, la primera sensibilización se lleva a cabo por vía respiratoria y los antígenos son profilinas con epítopes conformacionales de formas específicas en tres dimensiones. Estos antígenos pueden ser alterados o desnaturalizados por ácidos o calor y serían los responsables de las reacciones cruzadas entre pólenes y alimentos, siendo las frutas y los vegetales frescos los antígenos más frecuentemente alterados. La expresión clínica típica de la vía no clásica es el Síndrome de Alergia Oral.

Las reacciones cruzadas se definen como el reconocimiento de distintos antígenos por un mismo anticuerpo IgE, demostrables por métodos in vivo o in vitro. Se traducen clínicamente en reacciones causadas por antígenos homólogos de distintas especies.

Dentro de los alérgenos con mayor reactividad cruzada se encuentran

los crustáceos (alérgeno: tropomiosinas), pescados (alérgeno: parvalbúminas), leguminosas (alérgeno: vicilinas, P Biotiniladas), frutas rosáceas (alérgeno: PTL), y frutos secos (alérgeno: albúmina 2S).<sup>14,15,16,17,18,19</sup>

Panalérgeno es el término que se emplea para definir a los antígenos de reactividad cruzada entre especies que no se relacionan de forma directa entre sí. Han sido identificados por técnicas de laboratorio en diversas plantas y animales.

Entre los panalérgenos presentes en los distintos síndromes de reactividad cruzada entre aeroalérgenos y alimentos podemos mencionar los siguientes: (a) en el síndrome abedul-manzana, el panalérgeno es Bet v 1 (alimentos implicados: manzana, zanahoria, patata, kiwi); (b) en el síndrome gramíneas-molocotón, los panalérgenos son profilinas (alimentos implicados: rosáceas); (c) en el síndrome latex-frutas, el panalérgeno es una quitinosa clase I (alimentos implicados: castaña, plátano y kiwi); (d) en el síndrome ácaros-mariscos, el panalérgeno es una tropomiosina (alimentos implicados: crustáceos y moluscos); y (e) en el síndrome ave-huevo, el panalérgeno es una a-livetina (alimento implicado: yema de huevo de gallina)<sup>14,20</sup>.

## II b - Patogénesis

La hipersensibilidad alimentaria es una respuesta anormal del sistema inmune mucoso cuando entra en contacto con antígenos que ingresan por vía oral. En condiciones normales el sistema inmune mucoso da respuesta supresora a antígenos alimentarios ingresados diariamente.

La barrera mucosa gastrointestinal es una compleja estructura de superficies extensas donde se procesan y absorben los alimentos ingeridos. Es-

ta barrera por sus condiciones anatómicas de uniones celulares estrechas cubiertas por una capa mucosa impide el ingreso de partículas, bacterias, hongos y virus. Las enzimas digestivas, sales biliares, etc., colaboran con la destrucción de agentes patógenos y con la producción de Ag no inmunogénicos.

La inmadurez del sistema inmune innato (células natural killer, macrófagos leucocitos polimorfonucleares, células epiteliales y receptores tool-like) o del adaptativo (linfocitos de la lámina propia, citocinas, IgA secretoria), en niños con desarrollo incompleto, reduce o imposibilita una respuesta adecuada al ingreso de Ag alimentarios. Las enzimas digestivas, las sales biliares y las diferentes inmunoglobulinas maduran completamente alrededor de los cuatro años de edad<sup>21</sup>.

La inmadurez de la barrera mucosa podría ser un factor importante en la aparición de los procesos vinculados a la hipersensibilidad alimentaria.

En individuos genéticamente predispuestos la hipersensibilidad mediada por IgE es inducida por alimentos específicos produciendo anticuerpos IgE contra dichos antígenos alimentarios específicos. Los anticuerpos IgE unidos a los mastocitos y basófilos toman contacto con los antígenos alimentarios en la mucosa intestinal o con los basófilos circulantes provocando la liberación de mediadores químicos que inician el proceso inflamatorio subsiguiente.

Los procesos de alergia alimentaria son las primeras manifestaciones de enfermedad alérgica, estos individuos tienen un riesgo mayor de hacer alergias a antígenos inhalatorios.

## II c - Manifestaciones clínicas

La hipersensibilidad alimentaria puede presentarse con diferentes cuadros clínicos de variada intensidad. Reacciones que pueden comprometer un órgano o el organismo todo. Las personas que padecen reacciones clínicas severas son asistidas generalmente en salas de emergencias. Cuando el médico especialista, en muchos casos, toma contacto con dicho paciente, éste ya ha sido medicado, por lo que no presenta síntomas clínicos o bien están muy atenuados. En estos casos es muy importante recabar datos precisos durante el interrogatorio al realizar la historia clínica.

Desde el primer contacto del alimento con el aparato digestivo pueden aparecer síntomas de alergia alimentaria. Los síntomas de inflamación y prurito (síndrome de alergia oral) se producen cuando con la ingesta del alimento, este toma contacto con los labios, la mucosa bucal y la faringe. Estos síntomas generalmente ceden con antihistamínicos sin que surjan otras manifestaciones clínicas. En menos ocasiones, pueden extenderse al resto del aparato digestivo provocando dolores e irritación gástrica distensión abdominal, náuseas, vómitos y diarrea.

También pueden presentarse síntomas fuera del aparato digestivo tales como rinitis o rinoconjuntivitis acompañados o no de sibilancias. Estos síntomas pueden presentarse ya sea por ingestión de alimentos o por inhalación de vapores del alimento ofensor.

Los síntomas más frecuentemente observados son los que afectan la piel, las manifestaciones son la urticaria aguda como único síntoma o la urticaria aguda acompañada de angioedema. El rash y los enrojecimientos de la piel también son descriptos.

El cuadro clínico más severo es

la anafilaxia que puede presentarse inmediatamente después de ingerido un alimento específico, o bien, entre las dos a cuatro horas siguientes, provocado por la realización de ejercicios físicos posteriores a la ingesta de dicho alimento<sup>22</sup>.

El cuadro clínico de anafilaxia también puede presentarse inicialmente con síntomas en la piel de urticaria gigante, en un primer momento, a la que pueden agregarse progresivamente otros síntomas como náuseas, vómitos, distensión abdominal, disnea, cianosis, arritmias cardíacas, hipotensión y shock.

Otra forma de presentación de la anafilaxia es la aparición de todos estos síntomas de manera simultánea, siendo estos cuadros clínicos los menos frecuentes y los de mayor gravedad.

#### II d - Tolerancia

No son claros los mecanismos que generan la falta de rechazo del sistema inmune frente al ingreso de antígenos alimentarios. Investigaciones recientes sugieren que el equilibrio de la actividad celular intestinal induce una respuesta inmune local con liberación de IL-4 e IL-10 favoreciendo la tolerancia frente a la llegada de antígenos alimentarios<sup>21</sup>.

La actividad microbiana intestinal presente desde las primeras 24 horas de vida del niño y la incorporación de los probióticos a través de la leche materna, en su mayoría pertenecientes al género de los lactobacillus o bifidobacterias, disminuirían la permeabilidad intestinal y ayudarían al mejoramiento de la función de la barrera intestinal durante toda la vida.

Hay evidencias que indican que la exposición temprana a bacterias está asociada a la disminución del riesgo de desarrollar atopia, pero es necesaria

una mayor evidencia científica para explicar dichas afirmaciones<sup>23</sup>.

#### II e - Prevalencia

Desafortunadamente en Argentina no tenemos datos estadísticos que informen sobre la prevalencia de alergia alimentaria en la población general. Investigaciones en otros países del mundo muestran que entre el 4% al 6% de niños menores de tres años están afectados de alergia alimentaria<sup>24</sup>, disminuyendo estas cifras después de los diez años de vida.

Los niños con alergia a la leche de vaca durante el primer año de vida tienden a desarrollar tolerancia después de los cinco años de edad. Estos deben hacer dieta de exclusión y ser reevaluados cada dos años. El 25% de estos niños retienen hipersensibilidad a la leche de vaca hasta la segunda década de vida y el 35% probablemente desarrollarán otras alergias alimentarias<sup>21</sup>.

Los niños con desórdenes atópicos tienden a desarrollar alta prevalencia de alergia alimentaria.

#### III - Métodos diagnósticos

Los diferentes métodos diagnósticos son herramientas que aportan elementos para detectar hipersensibilidad mediada por IgE. La historia clínica es el primer paso para la orientación diagnóstica. La caracterización de los síntomas, órganos principalmente afectados, tiempo de aparición de los síntomas, son algunos de los datos a seleccionar previos a las pruebas de laboratorio, tests cutáneos, dietas de eliminación y PPODCC que se realizan a posterior.

#### III a - Historia Clínica

Es la herramienta fundamental



para orientar la búsqueda del diagnóstico de alergia alimentaria<sup>25</sup>. El ordenamiento del interrogatorio será esclarecedor para el médico especialista y le permitirá adquirir los elementos necesarios para continuar con los pasos siguientes en la elaboración del diagnóstico.

Los antecedentes hereditarios de atopía, especialmente la atopía materna, eczema o rinitis perenne, están asociados con IgE aumentada en sangre de cordón. Después del nacimiento, la maduración del sistema inmune Th1 parecería tener un rol importante en la prevención de la enfermedad alérgica. En otras circunstancias, la persistencia de respuesta Th2 por sobre la Th1 provocaría enfermedad alérgica aunque las razones no están suficientemente comprendidas.

Los niños que van a desarrollar enfermedad atópica muestran una temprana consolidación de la respuesta Th2 a alérgenos durante el primer año de vida antes de manifestar enfermedad. Esta respuesta de consolidación Th2 es de vida corta en niños sin antecedentes hereditarios.

El médico especialista deberá orientar el interrogatorio para recoger información precisa sobre los síntomas ya que en general el paciente es derivado por el servicio de emergencia después del cuadro agudo y los signos clínicos suelen estar atenuados o desaparecer al momento de la consulta del especialista.

Si el paciente concurre a la consulta en el momento de los síntomas agudos, el primer objetivo a cumplir será la observación de todos y cada uno de los signos clínicos para la realización del tratamiento medicamentoso adecuado.

El tiempo entre ingestión y aparición de los síntomas orientará el tipo

de mecanismo involucrado en la producción de los síntomas. En las reacciones de alergia alimentaria mediadas por IgE estos pueden ser de aparición inmediata o hasta dos horas después de ingerido el alimento.

La cantidad de alimento ingerido previo a la reacción alérgica, indicará qué cantidad de alimento o preparados será necesaria para iniciar la prueba de provocación oral para la confirmación diagnóstica.

Interrogar sobre la dieta habitual del paciente en forma minuciosa buscando relación entre alimento causal y manifestaciones clínicas debe ser un objetivo primordial.

La frecuencia y reproductibilidad de los síntomas demuestran si el alimento causal es de ingesta cotidiana u ocasional, en ambos casos la precisión de estos datos contribuirá a la orientación diagnóstica.

Interrogar sobre la existencia de otros factores como el ejercicio físico en la aparición de los síntomas de alergia alimentaria haría sospechar la presencia de anafilaxia por ejercicio<sup>26</sup>. Están descritos casos de pacientes sensibilizados a pólenes que al ingerir tomate previo al ejercicio físico inducen a anafilaxia.

Indagar si hay alteraciones del crecimiento y desarrollo, especialmente durante el primer año de vida, hará sopear que el principal alimento ingerido durante ese período es el que genera la enfermedad alérgica.

### III b - Tests cutáneos

Como complemento posterior a la elaboración de la historia clínica se dispone de una variedad de pruebas cutáneas que se mencionan a continuación.

Los test cutáneos son técnicas frecuentemente utilizadas para el diag-

nóstico de alergia alimentaria<sup>27,28</sup>. La selección del paciente y la utilización de extractos alérgicos debidamente estandarizados así como su correcta lectura le conferirán a la prueba un valor confiable.

En el prick test (prueba cutánea por pichazos en la piel) se utilizan extractos de alimentos glicerinados. El control positivo se hace con histamina 10 mg/ml y el control negativo se realiza con solución salina. La elección de los antígenos se hará de acuerdo a los datos obtenidos en la historia clínica. La prueba es positiva cuando el largo de la pápula es igual o mayor a 3 mm. Si el diámetro medio de la pápula es de 8 a 10 mm indicaría alta probabilidad de reactividad clínica. Se colocan las gotas sobre la piel del antebrazo o la espalda y luego se realiza el pinchazo en cada una de ellas. Después de 2 minutos se retiran los extractos y se realiza la lectura a los 15 minutos.

Para evaluar la capacidad de predicción de estas pruebas diagnósticas deben compararse sus resultados con los obtenidos por las pruebas de provocación que se describirán más adelante. El valor predictivo positivo (VPP) expresa la probabilidad en porcentaje que un test positivo (+) identifique a un paciente reactivo. El valor predictivo negativo (VPN) expresa la probabilidad en porcentaje que un test negativo (-) identifique a un paciente no reactivo.

Las pruebas cutáneas son de alta sensibilidad y baja especificidad lo que les da un bajo valor predictivo positivo y un alto valor predictivo negativo.

Estudios actuales de prick test a leche, maní o huevo en niños menores de 2 años que muestran pápulas de diámetro mayor a 8 mm indicarían un VPP de 95 %<sup>21</sup>.

El prick test (+) sin clínica puede

darse porque existe tolerancia clínica o reactividad cruzada en atópicos. Si este test es (+) se deben realizar pruebas de provocación para la confirmación de los resultados del test cutáneo.

El prick test (-) confirma ausencia de reactividad mediada por IgE siendo el VPN mayor de 95%.

La prueba cutánea intradérmica (a través de la introducción del antígeno con jeringa de tuberculina) no se recomienda ya que puede desencadenar reacciones sistémicas.

El denominado prick to prick test, que consiste en la punción del alimento natural y luego la piel con la misma lanceta, es usualmente más sensible y reproducible que los antígenos manufacturados, especialmente con frutas y verduras frescas<sup>29,30</sup>, ya que durante el proceso de liofilización se desnaturalizan dichos Ag disminuyendo así su capacidad antigénica.

Una vez efectuada la punción del alimento natural y la piel con la misma lanceta, se espera que transcurran dos minutos para retirar el antígeno y luego de 15 minutos se realiza la lectura correspondiente. También en este caso se utiliza como testigo (+) la histamina y como testigo (-) una solución glicerinada. El test es considerado (+) cuando la longitud de la pápula es igual o mayor a 3 mm.

### III c - Pruebas de laboratorio

Las pruebas de laboratorio son otras alternativas para una aproximación diagnóstica. La fiabilidad de las mismas son comparadas con las pruebas de provocación para evaluar su eficacia.

Las nuevas técnicas en biología molecular abren expectativas en el mejoramiento de la calidad de los antígenos lo que haría de estas pruebas una opción diagnóstica que evitaría la reali-

zación de las pruebas de provocación con tan sólo una muestra de sangre.

Con algunos antígenos comerciales como huevo, leche, pescado y maní, los resultados de las pruebas de detección de IgE específica in vitro e in vivo son bastante confiables pero no para otros antígenos alimentarios. El problema es que no se dispone, como en el caso de alérgenos inhalatorios, de otros alérgenos alimentarios estandarizados.

El CAP-FEIA (fluoroimmunoanálisis) es un método semicuantitativo que mide en kUA/l (kilounidades por litro) la cantidad de IgE antígeno específico en suero.

La determinación de IgE sérica específica a alimentos podría ser un parámetro útil para establecer la probabilidad que el paciente desencadene una reacción clínica<sup>31,32,33</sup>. En este caso no sería el momento adecuado para la reintroducción del alimento a la dieta.

Estudios realizados considerando todos los alimentos y para un punto de corte de positividad de 0.35 kU/l para el CAP y 0.35 PRU/ml para el RAST, muestran una sensibilidad (SE) de 83 % semejante tanto para el RAST como para el CAP.

Por otra parte, ambos métodos muestran una mejor especificidad (ES), VPP y VPN para el CAP con respecto al RAST. Los valores de ES alcanzan el 58% para el CAP y el 18% para el RAST; el VPP llega al 75% para el CAP y al 51% para el RAST; y el VPN alcanza el 70% en el caso del CAP y el 50% para el RAST.<sup>34</sup>

En general, cuando el valor de IgE específica es de 7 kUA/l para huevo, el VPP es del 98 %. En el caso de niños menores de 2 años el valor de IgE específica es de 2 kUA/l con un VPP de 95 %.

Cuando la IgE específica para le-

che alcanza un valor de 15 kUA/l, el VPP llega al 95%. Para niños menores de 2 años, los valores de IgE específica con 5 kUA/l se corresponden a un VPP de 95 %. En el caso del maní, con un valor de 14 kUA/l se alcanza un VPP de 100%. La IgE específica para pescado con un valor de 20 kUA/l se alcanza un VPP del 100%. La IgE específica para nuez con un valor aproximado de 15 kUA/l da un VPP de aproximadamente el 95 %. La IgE específica para soja con un valor de 30 kUA/l alcanza un VPP del 73 %. Por último, la IgE específica para trigo con un valor de 26 kUA/l da un VPP del 74 %.<sup>35,36,37</sup>

Cuando se disponga de alérgenos mejor caracterizados, determinantes antigénicos o incluso alérgenos recombinantes obtenidos por biología molecular, en algunos casos, se podrán sustituir las pruebas de provocación.

### III d - Dietas de eliminación

Las dietas de eliminación o sustitución son implementadas tanto para diagnóstico como tratamiento. En algunos casos cuando se elimina el alimento ofensor es necesario reemplazarlo por fórmulas de aminoácidos suplementarias como conducta previa a la prueba de provocación<sup>38</sup>.

Se solicita al paciente que suspenda el o los alimentos sospechosos de la dieta habitual detectados por historia clínica, tests cutáneos y de laboratorio durante 15 días previos a la realización de la prueba de provocación.

Debe advertirse al paciente sobre el cuidado de no ingerir los alimentos sospechosos ocultos en comidas elaboradas o evitar exposiciones a antígenos volátiles (p.e. durante la cocción de esos alimentos).

Si el paciente no mejora después de la dieta de exclusión es improbable

que esos alimentos sean responsables de sus síntomas. Si hay mejoría de los síntomas se realiza la PPODCC.

### III e - Pruebas de provocación oral doble ciego controlada PPODCC

Es el procedimiento definitivo para confirmar relación causa/efecto entre alimento y reacción adversa, sea o no alérgica.

Las diferentes pruebas in vivo o in vitro son, junto con la historia clínica, los elementos con que se dispone para definir si las reacciones alérgicas son mediadas o no por IgE. No se realizan las PPODCC cuando en un pasado reciente y en más de una oportunidad la relación causa/efecto ha sido muy clara y la reacción de hipersensibilidad inmediata ha sido de tipo anafiláctica.

El paciente no debe recibir medicación previa de antihistamínicos por lo menos tres días antes de la prueba de provocación ni B2-agonistas entre 8 a 12 horas antes. Además los antagonistas de los leucotrienos deberán ser suspendidos una semana antes.

La historia clínica, los tests cutáneos y las dietas de eliminación definirán cuáles son los alimentos a provocar. Los alérgenos de elección son, en general, los alimentos frescos, leche fresca pasteurizada, huevos de gallina, soja o trigo.

La dosis de inicio debe ser tomada de los datos obtenidos en la historia clínica siendo menor a la cantidad de alimentos que el paciente refiera haber ingerido cuando la manifestación clínica se produjo. El tiempo entre una administración y otra del alimento al igual que los intervalos de incremento de las dosis teniendo en cuenta la severidad de los síntomas también debe ser obtenidos de la historia clínica.

Si no se cuenta con estas precisiones, la administración de la prueba de provocación se debe programar en forma sucesiva de la siguiente manera (0.1 ml, 0.3 ml, 1.0 ml, 3.0 ml, 10.0 ml, 30.0 ml y 100.0 ml) que podrán ser administradas cada 20 minutos.

Por ejemplo, en el caso del huevo de gallina crudo la prueba de provocación se administra en forma similar evitando las dosis elevadas. En caso de sospecha de infección por salmonella, el huevo crudo deberá ser cocido.

Si la reacción observada no es clara, la cantidad de alimento administrada deberá ser equivalente al promedio de una comida (p.e. un huevo de gallina, 100 ml de leche de vaca o de leche de soja, o 5 g de proteína de trigo, gliadina-trigo, equivalentes a dos o tres rebanadas de pan)<sup>39</sup>.

La PPODCC se lleva a cabo con alimentos liofilizados administrados en cápsulas o enmascarados en otras fórmulas en el caso de alimentos frescos. La denominación "doble ciego controlado" obedece al hecho de que durante el proceso de administración de los alimentos se emplean dosis de placebo en distintos momentos de la prueba de manera que el paciente ingiere dicho placebo desconociendo esta situación y la oportunidad en que lo hace.

Las reacciones deben ser registradas en la historia clínica y en el caso que la prueba dé resultados negativos se deberá realizar la provocación abierta a la semana siguiente.

Las reacciones de provocación oral abierta pueden realizarse en niños pequeños en caso de que el sesgo de subjetividad no exista, esta situación deberá ser evaluada por el médico especialista. En los niños mayores como en los adultos se prefiere la realización de las PPODCC porque evitan el ses-

go del paciente. En caso de reacciones subjetivas o dudosas deberá realizarse la PPODCC.

Las pruebas de provocación deberán finalizar cuando el paciente presente algunos de los síntomas objetivos referidos en la historia clínica o bien cuando se llegaran a las dosis elevadas programadas. Los síntomas objetivos podrán ser urticaria, angioedema, sibilancias, vómitos, diarrea, dolor abdominal, shock.

En caso que se presentaran sólo síntomas menores (p.e. vómitos, prurito, enrojecimiento, etc.) se deberá continuar con la dosis incrementada con el intervalo programado.

Una vez terminado el estudio de provocación, el especialista deberá mantener al paciente bajo seguimiento durante las próximas 48 horas y en ocasiones, el control podrá extenderse hasta una semana después.

El lugar donde se lleve a cabo las pruebas de provocación deberá contar con todo el equipo de emergencia, adrenalina, glucocorticoides y B2-agonistas para mantener bajo control las reacciones severas que pudieran presentarse.

Todos los síntomas deberán ser objetivamente documentados durante la provocación y evaluados para indicar al paciente cuál es la conducta a seguir

<sup>25,39</sup>

## IV - Tratamiento

El tratamiento utilizado actualmente en los casos de hipersensibilidad alimentaria es la eliminación del alimento ofensor de la dieta habitual. Es importante educar al paciente con relación a todos los cuidados alimentarios para que advierta tempranamente síntomas que pueden ser el comienzo

de una reacción de hipersensibilidad posterior a una ingestión inadvertida. Los individuos menores de 5 años de edad que presenten reacciones alérgicas a alimentos podrán desarrollar tolerancia cuando suspenden de su dieta dicho alimento, como ocurre con la leche de vaca, que después de tres años de suspenderla, el 80% desarrolla tolerancia. En otros casos, como ocurre con el maní, los niños jóvenes que desarrollaron alergia después de los 5 años difícilmente desarrollen tolerancia<sup>21</sup>.

Los pacientes con alergia alimentaria deben ser nuevamente evaluados por un especialista para controlar sus valores séricos de IgE específica y comprobar si el riesgo de reacción alérgica aún persiste o si puede reintroducirse el alimento.

La reintroducción del alimento debe ser periódica (cada dos años aproximadamente) bajo supervisión del profesional especializado a los efectos de garantizar si hay desarrollo de tolerancia clínica.

Los antihistamínicos pueden aliviar los síntomas del síndrome de alergia oral y los síntomas de piel mediados por IgE pero no las reacciones sistémicas. Estos síntomas son mejorados con la administración de esteroides sistémicos.

Nuevas terapias inmunomoduladoras ofrecen expectativas en el tratamiento de la alergia alimentaria mediada por IgE. La terapia basada en ADN, (en base a plásmidos o en inmuoestimulación con deoxiligonucleótido) tendría una acción preventiva en el desarrollo del perfil inmune Th2 después de la estimulación antigénica en ratones, reduciendo el

riesgo de anafilaxia<sup>40,41,42,43,44,45,46</sup>.

La terapia con anticuerpos anti IgE ha sido evaluada en diversos estudios, entre pacientes con alergia al maní. En uno de estos estudios los anticuerpos fueron administrados con inyecciones mensuales. Los resultados hasta aquí obtenidos, muestran que los pacientes con este tratamiento necesitaron la ingestión de mayor cantidad de antígeno (maní) para manifestar síntomas de alergia. En este mismo estudio se observó que la mejoría de los síntomas no se correlacionaba con los niveles de IgE sérica<sup>21</sup>.

Otros tratamientos mencionados por la bibliografía disponible dentro de las terapias alternativas (como la medicina china tradicional) es la FAHF-1 o fórmulas chinas administradas a través de infusiones que se dan a los pacientes para contrarrestar las reacciones de alergia alimentaria. Estas infusiones han demostrado tener acción protectora en ratones reduciendo los niveles de IgE específica y la respuesta Th2<sup>47</sup>.

## V - Prevención

La alimentación con leche materna es sugerida durante los primeros seis meses de vida en niños de alto riesgo a desarrollar enfermedades atópicas. La leche materna contiene importantes componentes del sistema inmune tales como Ac para hongos, virus, bacterias, citokinas Th1 y Th2, citokinas proinflamatorias y antiinflamatorias, chemoquinas, etc.

En función de la predominancia de alguno de estos componentes en la leche materna, el sistema inmune puede aumentar o disminuir su actividad a los efectos de excluir el Ag. Hasta el

momento no son concluyentes los estudios que indican que la exclusión de alimentos alergénicos de la dieta materna durante el embarazo y la lactancia, así como la eliminación de los mismos en la dieta del niño, puedan ser determinantes en la prevención de alergia alimentaria<sup>39</sup>.

De todas maneras, actualmente la American Academy of Pediatrics recomienda que los niños de alto riesgo se alimenten exclusivamente con leche materna y las madres de estos niños no ingieran maní o nueces durante el período de lactancia evitando la probable sensibilización a través de la leche materna.

Las fórmulas hidrolizadas de caseína o parcialmente hidrolizadas pueden ser útiles en la prevención de algunas enfermedades atópicas y alergia alimentaria.

La introducción de los sólidos debe realizarse después de los 6 meses de edad, el huevo después de los 2 años y los alérgenos mayores tales como maní, nueces y mariscos deben ser introducidos después de los 3 años de edad<sup>39,48</sup>.

## VI - Comentario final

Frente al problema de reacciones adversas a alimentos es necesario tener definido un programa de trabajo integral que nos permita aprovechar todos los elementos con que se cuentan actualmente para el diagnóstico específico de alergia alimentaria.

De este modo, se podrá evitar que el tratamiento consista en el retiro innecesario de alimentos de la dieta del paciente que no son causa específica de tales reacciones alimentarias.

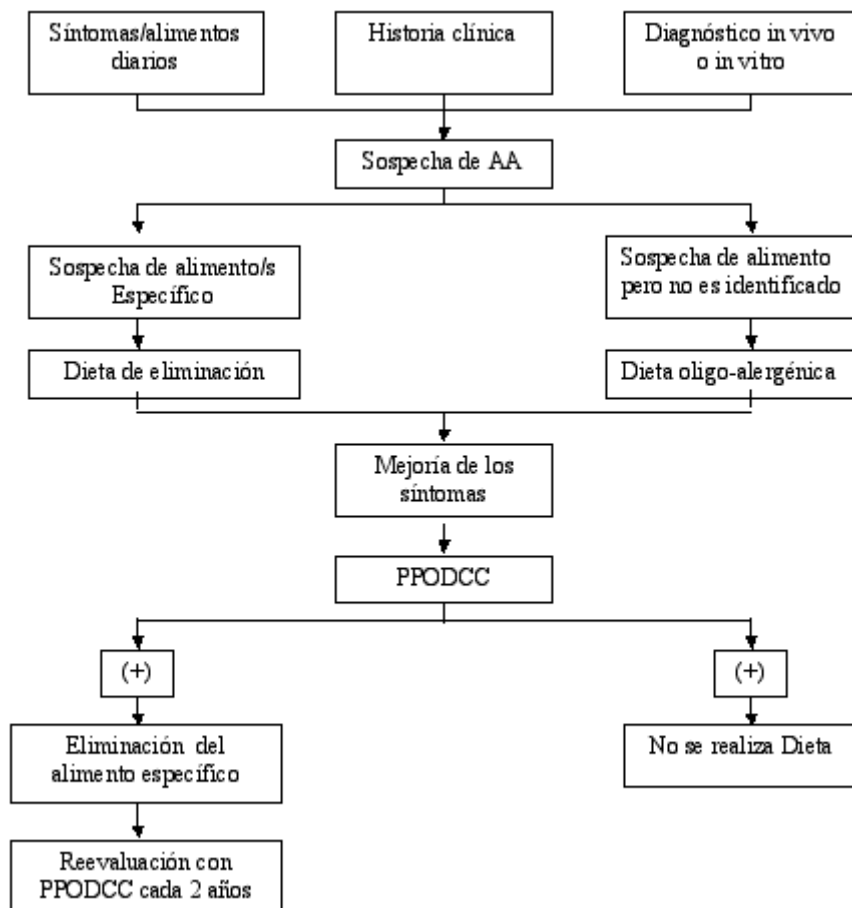
O bien, evitar que el paciente no excluya aquellos otros alimentos con los que puede tener reacciones clínicas de alto riesgo por falta de un diagnóstico certero.

Esquema propuesto para estan-

darizar los procedimientos diagnósticos frente a la sospecha alergia alimentaria <sup>39</sup>.

■ Correspondencia:

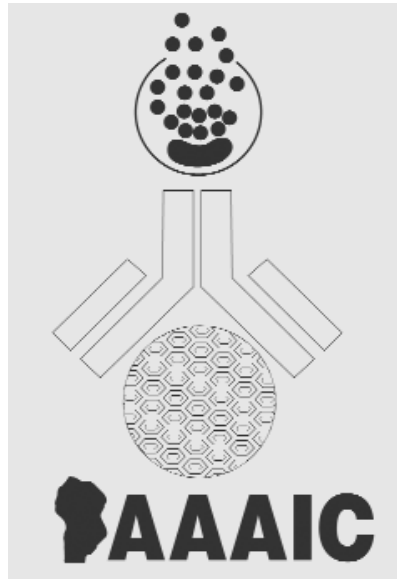
Dra. Ana María Fernández  
Servicio de Alergia e Inmunología  
Clínica Sucre. Santa Rosa 770.  
(C.P.: 5000), Córdoba, Argentina.  
e-mail: any\_fernandez@hotmail.com



## Bibliografía

1. Anderson SA, Sogu DD, eds. Reactions Adversesto food.AAAI and NIAID, NIH 1984 . Publication N°84-2442.
2. Bruijnzeel-Koomen C, OrtolaniC, Aas K, Bindslev-Jensen C, Bjorkstén B, Mioneret-Vautrin D, Wüthrich. Adverse reactions to food. Allergy 1995;50:623-635.
3. Brett V. Kettelhut, Dean Metcalfe. Reacciones adversas a alimentos. Alergia principios y práctica, tomo II 1992. Cap. 63;1375-1390.
4. Jonhansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haanthea T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 2001;56:813-24.
5. Bock A. The natural history of food sensitivity. J Allergy Clin Immunol. 1982.69:173-177.
6. Sampson H. IgE-mediated food intolerance. J Allergy Clin Immunol 1986.81:495-503.
7. Bindslev-Jensen C,Per Stahl Skov, Madsen F, Poulsen L. Food allergy and food intolerance-what is the difference?. Annals of allergy 1994.72:317-320.
8. Hill D, Heine R, Cameron D, Francis D, Bines J. The natural history of intolerance to soy and extensively hydrolyzed formula in infants with multiple food protein intolerance. The Journal of pediatrics. 135:118-121.
9. Lindfors A, Enocksson E. Development of atopic disease after early administration of cow milk formula. Allergy, 1988.43:11-16.
10. Hourihane J. Recent advances in peanut allergy. Current opinion in Allergy Clin Immunol. 2002. 2: 227-231.
11. Carroccio A, Cavataio F, Iacono G. Cross reactivity between milk proteins. Clin Exp. Allergy. 1999.29: 1014-1016.
12. Sélo I, Clément G, Bernard H, Chatel J.M, Créminon, et al. Allergy to bovine b-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. Clin Exp. Allergy. 1999. 29 :1055-1063.
13. Umpiérrez A, Quirce S, Marañon F, Cuesta J, et al. Allergy to goat and sheep cheese with good tolerance to cow cheese. Clin Exp Allergy. 1999.29:1064:1068.
14. Boné Calvo J. Mesa redonda: reactividad cruzada de alergenoss alimentarios. Allergol et Immunopathol 2003;31(3):139-41.
15. Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and Potato in children wwith Birch Pollen Allergy. Allergy 1983.38:167-172.
16. Rodriguez J. Crespo J. Clinical features of cross-reactivity of food allergy caused by fruits. Current Opinion in Allergy Clin Immunol 2002.2:233-238.
17. Ibañez MD, Martínez M, Sánchez JJ, Fernandez-Caldaz E. Reactividad cruzada de las legumbres. Allergol et Immunopathol. 2003;31(3):151-61.
18. Torres Borrego J, Martínez Cuevas JF, Tejero García j. Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. Allergol et immunopathol 2003;31 (3):146-51.
19. Allergy. Which Allergens? Foods of Plant Origin. 1993.3-80.
20. Martinez Alonso, Dominguez Ortega, Fuentes Gonzalo. Angioedema por sensibilización a carne de gallina. Allergol et immunopatol 2003;
21. Sampson Hugh A. Up Date on food allergy, J Allergy Clin Immunol 2004;03:014
22. Shimamoto SR, Bock A. Update on the Clinical features of food – induced anaphylaxis.Current Opinion in Allergy Clin Immunol. 2002.2:211-216.
23. Isolauri E, Rautava S, Kalliomäki M, Kirjavainen P, Salminen S. Role of probiotics in food hypersensitivity. Current opinion Allergy and Immunology 2002,2:263-271.
24. Zeiger Robert S.. Dietary Aspects of food Allergy Prevention in Infants and Children. Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition. 2000.30:S77-S86.
25. Bock A, Sampson H, Atkins F, Zeiger R, Lehrer S, Sachs M, Bush R, Metcalfe D. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: A manual. J Allergy Clinical Immunol. 1988;82:986-97.
26. Shadick N, Liang M, Padtridge A, et al. Natural history of exercise-induced anaphylaxis: Survey results from a 10-year follow-up study. J Allergy Clin Immunol. 1999.104:123-7.
27. Bock A, Lee W, Remigio LK, May cd. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. J Allergy Clinical Immunol. 1978;62:327

- 28 Berstein M, Day JH, Welsh A. Double-blind food challenge in the diagnosis of food sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol*.1982;70:205.
- 29 Ortolani C, Ispano M, Pastorello E A, Ansaloni R, Magri G. Comparison of results of prick testes (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:683-90.
- 30 Rosen J P, Selcow J, Mendelson L, Grodofsky M, Factor J, Sampson H. Skin testing with natural in patients suspected of having foods allergies: Is it a necessity?.*J Allergy Clin Immunol*.
- 31 Sampson H. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001.107:891-6.
- 32 Sampson H. Improving in-vitro tests for the diagnosis of food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy Clin Immunol* 2002.2:257-261.
- 33 Heine R, Elsayed S, Hosking C, Hill D. Cow's milk allergy in infancy. *Current Opinion in Allergy Clin Immunol*. 2002.2:217-225. 1994;93:1068-70.
- 34 Pascual C, Fernandez Caballero MT, Martin E. Valoración del estudio de IgE específica. *Alergia e Inmunol Clínica*.1995; 10(2):106-110.
- 35 Boyano M, García Ara C, Díaz Peña JM, García S, Esteban M. Validity of specific IgE antibodies in children with egg allergy.*Clin Exp Allergy* 2001;31:1464-9.
- 36 García Ara C, Boyano Martinez T, Díaz Peña JM, Martin Muñoz F, Reche Frutos M, Martin Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate Hipersensitivity to cow's milk in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:185-90.
- 37 Clark AT, Ewan P. *Clin Exp Allergy* 2003;33(8):1041-5
- 38 Muraro A., Dreborg S, Halcken S, Host A, Niggemann B, Aalberse R, Arshad S, von Berg A, Kon Carlsen K-H, Duschén K, Eigenmann P, Hill D, Jones C., Mellon M, Oldeus G, Orange A, Pascual C, Prescott S, Sampson H, Svartengren M, Vandeplas Y, Wahn U, Warner JA, Warner JO, Wickman M, Zeiger Rs. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part I: Immunologic background and criteria for hypoallergenicity. *Pediatr Allergy Immunology*. 2004;15:103-111.
- 39 Muraro A, Dreborg S, Halcken S, Host A, Niggemann B, Aalberse R, Arshad SH, von Berg A, Kon Carlsen K-H, Duschén K, Eigenmann P, Hill D, Jones C, Mellon M, Oldeus G, Orange A, Pascual C, Prescott S., Sampson H., Svartengren M., Vandeplas Y., Wahn U., Warner JA., Warner JO., Wickman M, Zeiger Rs. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part II: Evaluation of methods in allergyc prevention of allergy prevention studies and sensitization markers. Definitions and diagnostic criteria or allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:196-205.
- 40 Nguyen M, Cinman N, Yen J, Horner A. DNA-based vaccination for the treatment of food allergy. *Allergy* 2001; 56:Suppl. 67:127-130.
- 41 Sampson H. Food allergy. Part 2: Ddiagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:981-89.
- 42 Sampson H. Immune Intervention in Food Allergy. Postgraduate Syllabus.2000:83-95
- 43 Klug W, Cummings M. Genética. Aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante. 1999:485-515.
- 44 Gandur A. Inmunoterapia Basada en DNA. *Archivos Argentinos de Alergia e Inmunología Clínica*. 2000; 31 Suplemento n°1: S2: S8.
- 45 Rabinovich GA. Galectinas un nuevo paradigma en la regulación de la respuesta inmune. Implicancias en la salud y en la enfermedad. *Alergia e Inmunología Clínica*. 2000; 17(1):16-24.
- 46 Van Uden J, Raz E. Immunostimulatory DNA and applications to disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104:902-10.
- 47 Xiu-Min Li ,et al. Food Allergy Herbal Formula-1(FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis is a murine model. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:639-46.
- 48 Scott H. The impact of maternal diets during breastfeeding on the prevention of food allergy. *Current opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2002. 2:207-210.





# Inmunoglobulina E: Regulación de la síntesis normal y Síndrome de hiper IgE

E immunoglobulin: natural synthesis adjustment and Hyper IgE syndrome

Adriana I. Cassinero\*

## ■ Resumen

Los anticuerpos IgE están involucrados tanto en mecanismos fisiológicos como en estados alterados de la respuesta inmune. El aumento en la concentración sérica de Inmunoglobulina E que ocurre en ciertas infestaciones parasitarias, particularmente por helmintos, constituye un mecanismo de defensa normal para la eliminación del parásito. Un número importante de enfermedades cursa con niveles elevados de IgE, ya sea aumentos moderados, como ocurre generalmente en enfermedades alérgicas, o extremadamente altos como en el Síndrome de Hiper IgE.

Se reseñará el proceso normal de producción de IgE y los diferentes factores celulares y solubles que regulan su síntesis. Se analizarán los mecanismos probables, postulados en la actualidad como responsables de la hiperproducción de IgE y el estado de inmunodeficiencia asociado al Síndrome de Hiper IgE.

## ■ Summary

*Immunoglobulin E antibodies are involved not only in physiologic mechanisms but also in impaired conditions of the immune response. The increase in serum concentration of Immunoglobulin E that occurs in certain parasitic infections, particularly by helminths, constitutes a normal defense mechanism for parasite elimination. A number of diseases may induce increased levels of total IgE. The increase can be moderate, as it generally occurs in allergic diseases, or extremely high as in the Hyper IgE Syndrome.*

*Reference to the normal process of IgE production and the different cellular and soluble factors that regulate its synthesis will be included. Finally, possible mechanisms proposed as responsible for the IgE hyperproduction and the immunodeficiency condition associated to Hyper IgE Syndrome will be analyzed.*

Para citar este artículo:

Cassinero AI. Inmunoglobulina E: Regulación de la síntesis normal y Síndrome de hiper IgE. *Alerg Immunol Clin* 2004;21(3-4):69-76.

\* Bioquímica. Laboratorio de Inmunología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Córdoba.

## ■ Palabras Clave:

Hiper IgE, citoquinas, síntesis de IgE, interleuquina 4, Th1/Th2.

## ■ Key Words:

*Hyper IgE, cytokines, IgE synthesis, interleukin 4, Th1/Th2.*

## Síntesis de Inmunoglobulina E: mecanismos moleculares y celulares involucrados

La inmunoglobulina E (IgE) es conocida principalmente por su habilidad para activar mastocitos a través del receptor de alta afinidad FcεRI, desencadenando de esta manera las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Se han identificado otras funciones para los anticuerpos IgE, entre las que se incluyen la eliminación de parásitos helmintos y la regulación de sus propios receptores, FcεRI y CD23.

La molécula de IgE está formada por una cadena pesada ε y una cadena liviana kappa (κ) o lambda (λ) codificadas por diferentes grupos de genes. Los genes que codifican para la cadena κ en humanos están en el cromosoma 2, para la cadena liviana λ en el cromosoma 22 y el locus de la cadena ε está en el cromosoma 14.

Una serie de rearrreglos deben producirse en estos genes para generar el amplio repertorio de especificidades de las inmunoglobulinas<sup>1</sup>. Las regiones variables de las cadenas livianas surgen de la recombinación somática de los segmentos Variable (Vκ y Vλ) y Joining (Jκ y Jλ). La región variable de la cadena pesada resulta de la recombinación de los segmentos variable (V), joining (J), y de Diversidad (D). En primer lugar se produce la unión de D a JH, y luego VH se une a los segmentos (D)JH previamente rearrreglados, formando VH(D)JH.

Estos eventos de recombinación de genes son llevados a cabo por productos de los genes activadores de recombinasas, RAG-1 y RAG-2, que tienen actividad de

topoisomerasa, con capacidad para romper el ADN y luego volver a unirlo. En la Inmunodeficiencia Combinada Severa caracterizada por una función defectuosa de RAG-1 y RAG-2, hay una marcada disminución o ausencia total de actividad de recombinación VDJ<sup>2</sup>. Estos pacientes además de carecer de células T, se caracterizan por ausencia de células B en sangre periférica, ya que los progenitores B no pueden reorganizar y expresar inmunoglobulina M en su superficie (receptor de antígeno o BCR).

Durante la respuesta inmune, los Li B pueden producir diferentes isotipos de inmunoglobulinas con idéntico sitio de unión al antígeno. Este fenómeno, llamado cambio de isotipo (isotype switching) permite que una sola clona de células B produzca anticuerpos con la misma especificidad fina, pero con diferentes funciones efectoras determinadas por el isotipo de cadena pesada.

El principal mecanismo para el cambio de isotipo es un proceso llamado recombinación de switch en el que el segmento VDJ ya reordenado, se combina con un gen de la región constante (C) situado más abajo, eliminándose el ADN intermedio. Estas recombinaciones de ADN ocurren en secuencias de nucleótidos llamadas regiones switch (S) que se localizan en los intrones de los extremos 5' de cada locus de cadena pesada CH. Las regiones de switch contienen numerosas repeticiones en tandem de secuencias de ADN muy conservadas. Luego de la señal que activa la maquinaria de recombinación del ADN, estas regiones S sufren recombinación y resultan, en el caso del switch a IgE, en la formación de una unión Sm/Se con delección del segmento de ADN intermedio (figura 1c).

## Dos señales necesarias para la síntesis de IgE

Para cambiar el isotipo de inmunoglobulina producida, la célula B debe recibir dos señales. Estas señales son emitidas por los linfocitos T (LiT) a través de una compleja serie de interacciones que ocurren en los nódulos linfáticos<sup>3</sup>.

La primera señal es dependiente de citoquinas y resulta en la activación de la transcripción en una región específica del locus de inmunoglobulina, lo que determina la especificidad del isotipo. La segunda señal activa la maquinaria de recombinación del ADN que resulta en la recombinación de switch.

Durante la respuesta inmune, las moléculas de inmunoglobulina M de superficie del LiB se unen a su antígeno específico, lo que provoca la internalización del complejo antígeno-receptor. El antígeno es procesado en los endosomas y posteriormente presentado en forma de péptidos fragmentados asociados a moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), a una célula T CD4+ con especificidad para ese mismo antígeno.

El reconocimiento del péptido antigénico asociado a moléculas clase II sobre la superficie del LiB, da lugar a dos eventos cruciales en el LiT:

1. La secreción de linfoquinas, particularmente Interleuquinas 4 y 13 (IL-4 e IL-13).

2. La expresión de CD40 Ligando (CD40L o CD154) en el LiT CD4+.

La unión de IL-4 y/o IL-13 a su receptor en la célula B, da la primera señal para el cambio de isotipo e induce la transcripción del locus C $\epsilon$  de la cadena pesada<sup>4</sup>. El complejo receptor de IL-4 (IL-4R) está formado por dos cadenas: una cadena  $\alpha$  (IL-4Ra) de 145 kd, a la cual se une la IL-4 con elevada afinidad,

y una cadena  $\gamma$ c (gamma común) que es compartida con los receptores de IL-2, IL-7, IL-9 e IL-15. Por su parte el receptor de IL-13 (IL-13R) es un heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  (IL-13Ra) a la que se une la IL-13 con alta afinidad, y una cadena  $\beta$  del IL-4R. Por este motivo, la IL-4 se puede unir tanto al IL-4R como al IL-13R por su afinidad a la cadena  $\alpha$ , mientras que IL-13 sólo puede unirse al IL-13R<sup>5</sup> (Figura 1a).

La unión del receptor de antígeno del LiT a un péptido específico en el contexto de las moléculas clase II del CMH, induce la activación de la célula T y la expresión de CD40L en su superficie. El CD40L es una glicoproteína de membrana tipo II, de 39 kd que está ausente en el LiT vírgen, sólo se expresa en células T activadas que han contactado con el antígeno en una célula presentadora. La expresión transitoria de CD40L es lo que le permite al LiT inducir el cambio de isotipo a IgE en la célula B<sup>6</sup>.

La molécula CD40L del LiT activado se une a CD40 del LiB, siendo esta última una glicoproteína integral de membrana que pertenece a la superfamilia del receptor de TNF y que se expresa constitutivamente en células B, macrófagos, células dendríticas y células endoteliales<sup>7</sup>. El entrecruzamiento de CD40 con Acs anti-CD40 o células que expresan CD40L, induce gran proliferación de células B, aumento de la expresión de CD23 (Fc $\epsilon$ RII), de moléculas clase II del CMH y de moléculas coestimuladoras B7 (CD80).

Luego de la unión con CD40L, se produce la oligomerización de CD40 en la superficie del LiB y se envía la segunda señal que activa la recombinación para la síntesis de IgE. La interacción CD40-CD40L también aumenta la expresión de la molécula coestimulato-

ria CD80 que se une a CD28 expresada constitutivamente en la célula T, evento que refuerza la interacción T-B.

#### Transducción de señal vía receptor de IL4

Las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ c del IL-4R no poseen actividad de kinasa, razón por la cual se asocian respectivamente a las tirosina-kinasas de la familia Janus JAK-1 y JAK-3. Durante la activación, y como consecuencia de la heterodimerización de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ c, estas kinasas fosforilan residuos de tirosina en el dominio intracelular de la cadena  $\alpha$  del receptor. Estos residuos de tirosina fosforilados sirven como sitio de anclaje para dos unidades del transductor de señal y activador de transcripción STAT-6. Una vez fosforiladas, las moléculas de STAT-6 se disocian de la cadena  $\alpha$  del IL-4R formando homodímeros que se translocan al núcleo, donde se unen corriendo arriba del exón le para iniciar la transcripción<sup>5</sup> (Figura 1b).

La señalización a través de CD40 no está claramente establecida. Se ha sugerido que el entrecruzamiento de CD40 induce fosforilación y activación de JAK-3, y la activación del factor de transcripción nuclear NF-kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ )<sup>5</sup>. La activación de NF- $\kappa$  $\beta$  que resulta de la estimulación de CD40, puede luego combinarse sinérgicamente a las señales derivadas de IL-4, como STAT-6, en el promotor de C $\epsilon$ .

#### Modulación de la síntesis de IgE dependiente de citoquinas

Las células efectoras T helper CD4+ son heterogéneas, y se pueden diferenciar en dos grupos según

el patrón de citoquinas que producen<sup>8</sup>. Las células T helper 1 (Th1) producen principalmente IL-2, factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF  $\beta$ ) e interferón  $\gamma$  (Inf  $\gamma$ ) y favorecen las respuestas de hipersensibilidad demorada. Por su parte, las células T helper 2 (Th2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y proporcionan una importante colaboración a las cel B para la producción de anticuerpos.

La diferenciación de la célula T helper virgen hacia una u otra subpoblación, depende de la activación de ciertos factores de transcripción. La activación, luego del estímulo antigénico, del factor de transcripción T-bet, inicia el programa genético para la producción de citoquinas del perfil Th1<sup>9</sup>. Por el contrario, la activación de GATA-3 es necesaria y suficiente para que comience la expresión de genes de citoquinas Th2<sup>10</sup>.

Las citoquinas derivadas de las células Th1, especialmente Inf  $\gamma$ , inhiben la producción de citoquinas Th2; mientras que las citoquinas derivadas de Th2 (especialmente IL-4 e IL-10) inhiben la producción de citoquinas Th1. De acuerdo con este paradigma, mientras IL-4 e IL-13 inducen la transcripción de  $\epsilon$  en línea germinal, Inf- $\gamma$  suprime dicha transcripción inducida por IL-4<sup>11</sup>.

La interacción entre IL-4 e IL-13 con sus receptores, dan la primera señal para el switch a IgE. Se ha visto que la presencia de IL-4 y/o IL-13 es esencial para la producción de IgE, y que éstas son las únicas citoquinas capaces de inducir síntesis de IgE in vitro cuando se agregan al cultivo en forma recombinante. La IL-13 es de dos a cinco veces menos potente que IL-4 para inducir el cambio de isotipo.

La IL-4 no sólo induce síntesis de IgE en LiB humanos, sino que también

induce síntesis de IgG4. Los anticuerpos anti IL-4 o anti IL-4R inhiben preferencialmente la síntesis de IgE, sin afectar la producción de IgM, IgG e IgA.

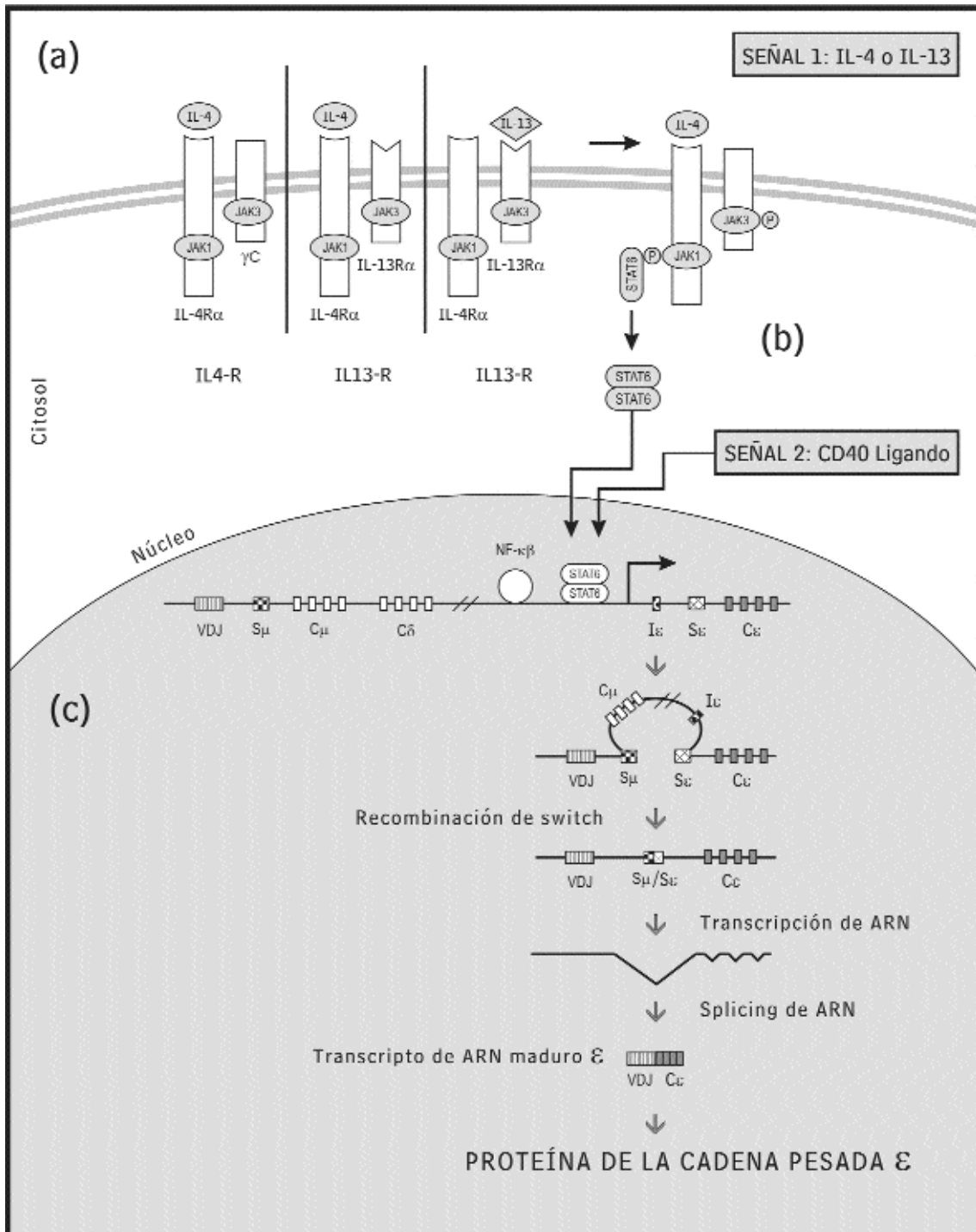
No sólo las células Th2 producen IL-4, sino que también la producen otras células como las NK 1.1+, basófilos y mastocitos activados a través del receptor Fc $\epsilon$ RI. La IL-4, al igual que otras citoquinas, tiene efectos pleiotrópicos entre los que se destacan: favorecer el desarrollo de células Th2, inducir la expresión de CD23, de moléculas clase II y del IL-4R en LiB y monocitos, y aumentar la expresión de VCAM-1 en células endoteliales. La IL-13 es secretada por células Th2 activadas y mastocitos. Sus efectos biológicos aunque menos potentes, se superponen con los de IL-4, excepto que IL-13 no activa las células T humanas.

Si bien IL-4 e IL-13 son las únicas que tienen participación directa en el cambio de isotipo de la célula B, la síntesis de Ig E está controlada además por numerosas citoquinas: IL-5, IL-6, IL-9, TNF- $\alpha$  y posiblemente IL-3, potencian la síntesis de IgE inducida por IL-4 e IL-13. Por el contrario, Inf- $\gamma$ , Inf- $\alpha$ , IL-12, TGF- $\beta$  e IL-8 ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de IgE<sup>12</sup>.

Ambas señales, IL-4 y CD40, son provistas por las células Th2, ya que las células Th1 no pueden producir IL-4. El balance en la producción de IL-4 e Inf- $\gamma$  por parte de las células Th1 y Th2, va a determinar la producción o no de IgE. Así, las respuestas de IgE in vivo dependen de la polarización de las células T helper hacia el fenotipo Th2.

En la actualidad, se acepta que el origen de las enfermedades alérgicas está en un desequilibrio de células Th1/Th2<sup>13</sup>, pero en otras patolo-

**Figura 1:** a, IL-4 puede unirse ya sea al IL-4R como al IL-13R por su gran afinidad con la cadena  $\alpha$  de dichos receptores. La IL-13 sólo se une al IL-13R. b, La unión de IL-4 a su receptor provoca la heterodimerización de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ , las que posteriormente son fosforiladas por acción de tirosina-quinazas JAK-1 y JAK-3 asociadas a sus dominios intracelulares. Las moléculas de STAT-6 se unen a residuos de tirosina fosforilados de la cadena  $\alpha$ , sufren fosforilación y luego, se disocian de la misma, formando dímeros que se translocan al núcleo. c, La activación de los factores de transcripción, STAT-6 y probablemente también NF- $\kappa$ B, derivada de las señales 1 y 2 respectivamente, inicia la transcripción en el exón 1 y el proceso de recombinación de switch. Este mecanismo acerca el segmento V(D)J a la región C $\epsilon$ . La transcripción seguida de splicing resulta en un RNAm V(D)J + C $\epsilon$  que codifica para una molécula de IgE, que retiene exactamente la misma especificidad antigénica que la IgM original, ya que ambas usan el mismo segmento V(D)J que codifica el sitio de unión al antígeno.



gías como el Síndrome de hiper IgE son sólo indicios, ya que todavía no está demostrado el mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad.

### De la síntesis normal a la hiperproducción de IgE

El Síndrome de hiper IgE (SHIE) es una Inmunodeficiencia Primaria caracterizada por eczema, infecciones estafilocócicas recurrentes, pneumatoceles, quimiotaxis de PMN disminuida y compromiso variable de la funcionalidad de las células T. Se encuentran de manera uniforme, niveles séricos elevados de IgE en pacientes con SHIE. Aún se desconoce la causa de este síndrome.

El seguimiento durante 20 años de un grupo de 30 pacientes, demostró que el SHIE se hereda en forma autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable<sup>14</sup>. Es un desorden multisistémico que afecta la dentición, el esqueleto, el tejido conectivo y el sistema inmune. Aunque se lo describe generalmente como un defecto en la función de los PMN, está claro que existe también disfunción variable de las células T, tanto por los datos clínicos, como por los estudios de laboratorio.

Cuáles son los mecanismos que pueden llevar de la síntesis normal a la hiperproducción de IgE?

Diversas condiciones alérgicas e infestaciones parasitarias (en especial por helmintos) inducen aumento de los niveles séricos de IgE, tanto policlonal como antígeno específico. En este sentido, es necesario tener en cuenta otras enfermedades que cursan con IgE elevada al momento de establecer diagnóstico diferencial con SHIE (Tabla 1).

Los mecanismos inmunológicos responsables de la hiperproducción de IgE en SHIE, se desconocen hasta el presente y probablemente sean múltiples. El primer mecanismo fisiopatológico que se ha postulado es un desequilibrio Th1/Th2. Las evidencias de laboratorio que proponen un desequilibrio en la producción de citoquina son, en muchos casos, contradictorias. En la mayoría de los trabajos se trata de demostrar directa o indirectamente una disminución en la producción de Inf- $\gamma$  y un aumento en la producción de IL-4. Diferentes estudios han demostrado que:

1. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con SHIE, producen espontáneamente IgE in vitro<sup>12, 15</sup>. Aunque no se pudo demostrar claramente, hay evidencias indirectas de un aumento de IL-4 ya que estos pacientes presentan mayor expresión de CD23 en la superficie del LiB, y aumento de CD23 soluble en plasma. La expresión de CD23 es dependiente de IL-4<sup>12</sup>. El hallazgo frecuente de eosinofilia en pacientes con SHIE, también apoya esta hipótesis, ya que la diferenciación de eosinófilos es inducida por IL-5, citoquina producida por clones de células T concomitantemente con IL-4.

2. El agregado de IL-4 y/o IL-13 al cultivo de PBMC de pacientes con SHIE, no aumenta la síntesis de IgE e IgG4 como ocurre en controles, y los Acs contra IL-4 e IL-13 inhiben parcialmente la producción de IgE. Esto sugiere que la sobreproducción de IgE e IgG4 proviene de células B que ya han sufrido el swich a IgE y que están produciendo ambos isotipos en su máxima capacidad<sup>12</sup>.

3. Existe un aumento en la ex-

presión intracelular de IL-13 en células CD4+ de pacientes con SHIE, con expresión normal de IL-4. La mayor expresión de IL-13 podría ser responsable, al menos en parte, del aumento de los niveles séricos de IgE<sup>16</sup>.

4. Las PBMC de pacientes con SHIE presentan disminución en la producción de Inf- $\gamma$  frente a diferentes estímulos, incluyendo antígenos de *Staphylococcus aureus*, y mayor secreción de IL-12<sup>17, 18</sup>. Si se agrega IL-12 recombinante al cultivo, las células de estos pacientes, a diferencia de los controles, no responden con un aumento significativo en la secreción

#### Enfermedades alérgicas

Asma  
Rinitis alérgica  
Dermatitis atópica  
Alergia alimentaria

#### Enfermedades parasitarias

Anquilostomiasis  
Esquistosomiasis  
Ascariasis

#### Enfermedades infecciosas

Aspergilosis broncopulmonar alérgica  
Infección por VIH-1  
Mononucleosis infecciosa

#### Inmunodeficiencias

Síndrome de hiper IgE  
Wiskott Aldrich  
Síndrome de DiGeorge  
Deficiencia selectiva de IgA  
Síndrome de Nezelof

#### Otras enfermedades

Mieloma IgE  
Artritis reumatoidea  
Fibrosis quística  
Síndrome nefrótico  
Pénfigo  
Tabaquismo

**Tabla 1:** Enfermedades asociadas a una producción excesiva de Inmunoglobulina E

de Inf- $\gamma$ .

La falta de respuesta frente al estímulo con IL-12, llevó a Borges y col a postular una alteración en la vía IL-12/Inf- $\gamma$  como un mecanismo probable para explicar la hiperproducción de IgE en estos pacientes<sup>18</sup>. Esta hipótesis parece poco probable ya que si bien las diferencias en la producción de Inf- $\gamma$  entre pacientes y controles son significativas, no se correlacionan con la severidad clínica ni con los niveles de IgE. Por otra parte, un defecto en la vía IL-12/Inf- $\gamma$ , ya sea por déficit de receptores de Inf- $\gamma$  o IL-12 o mutaciones en la subunidad p40 de IL12, predispondrían a estos pacientes a infecciones por micobacterias, pero no a infecciones por *Staphylococcus*<sup>19</sup>. Sin embargo no ocurre así, ya que un porcentaje importante de pacientes con SHIE tienen intacta la inmunidad mediada por células y no presentan infecciones por micobacterias.

Otros estudios no pudieron demostrar un desequilibrio Th1/Th2, aún intentando con diferentes estrategias<sup>20</sup>. Los resultados contradictorios de los mismos sugieren que la simple interpretación del SHIE como un desequilibrio Th1/Th2, es insuficiente para explicar las manifestaciones clínicas de este síndrome. A pesar de esto, sí hay evidencias suficientes para sugerir que sólo ciertos aspectos de la producción de citoquinas están alterados, ya sea como parte del proceso etiológico, o como una respuesta secundaria. Recientemente, Ohga y col demostraron que las células T de sangre periférica de pacientes con SHIE, activadas naturalmente (HLA DR+), presentan expresión deficiente de los genes de Inf- $\gamma$  y Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>21</sup>. Esto afectaría la producción de IgE, dado el efecto inhibitorio de estas citoquinas sobre la producción de

IgE inducida por IL-4, contribuyendo al estado de hiper IgE que se observa en estos pacientes.

La disminución en la expresión de TGF- $\beta$  puede implicar también un defecto innato en las células T. Se ha visto que TGF- $\beta$  juega un papel importante en la activación y diferenciación de células T regulatorias<sup>22</sup>. Se denomina células T regulatorias a aquellas células que controlan activamente o suprimen la función de otras, generalmente de manera inhibitoria. Estas células parecen controlar el desarrollo de enfermedades autoinmunes y el rechazo a trasplantes, y pueden jugar un papel importante en el control del asma y la alergia<sup>23</sup>. Se describen al menos cuatro tipos de células T regulatorias: células Th3, TR, CD4+CD25+ y células T natural killer (NKT). De estos cuatro grupos, hay dos que producen TGF- $\beta$ : las células CD4+CD25+ y las células Th3. Se ha postulado que las respuestas de hiper IgE no ocurren en individuos normales debido a la presencia de células T regulatorias<sup>24</sup>. Las respuestas de hiper IgE no sólo se asocian al SHIE, sino que también se presentan con frecuencia en otras inmunodeficiencias como el Síndrome de Omen<sup>25</sup> y el SIDA<sup>26</sup>, patologías en las que se han descrito anomalías en el compartimiento de células T. Los datos sugieren que el marcado aumento de IgE que se observa en pacientes afectados por estas inmunodeficiencias, tendría su origen en una deficiencia en el compartimiento de células T regulatorias. En resumen, la expresión deficiente de TGF- $\beta$  en células T activadas apoyaría la hipótesis de un posible defecto de las células T regulatorias en SHIE.

Tanto la hipótesis sobre desequilibrio Th1/Th2, como la deficiencia de células T regulatorias, ofrecen una explica-

ción válida para la hiperproducción de IgE, pero no se correlacionan con las demás manifestaciones clínicas de la enfermedad. La naturaleza multisistémica de esta enfermedad, que afecta piel, huesos, dentición, pulmones, inmunidad y susceptibilidad a infecciones, sugiere que el origen de esta patología podría estar en la regulación aberrante de alguna célula o molécula común a todos estos tejidos, como el monocito/macrófago, o las células endoteliales<sup>27</sup>.

En este sentido, un estudio reciente de Chehimi y col ofrece un nuevo paradigma para entender este desorden<sup>20</sup>. Por análisis de rearrreglo de genes demostraron que en los pacientes con SHIE hay mayor expresión de IL-12 y marcada disminución en la expresión de quimioquinas ENA-78, MCP-3 (proteína 3 quimiotáctica de monocitos), Eotaxina e IL-8, y de algunas citoquinas como Osteopontina e IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ . La baja expresión de este grupo de quimioquinas y citoquinas, se bien no permite explicar la hiperproducción de IgE, sí podría explicar ciertas características del SHIE, hasta ahora imposibles de asociar con un desequilibrio Th1/Th2.

La expresión deficiente de ENA 78 (proteína activadora de neutrófilos epiteliales) e IL-8 podrían contribuir a la pobre actividad quimiotáctica de neutrófilos que se observa con frecuencia en este síndrome<sup>28</sup>. La baja expresión de Osteopontina podría contribuir a la desmineralización de los huesos, formación de pneumatocelos e infecciones, ya que se ha visto que ratones knock-out para esta citoquina, tienen alteradas sus defensas frente a infecciones virales y bacterianas, además de cicatrización y remodelación ósea alteradas<sup>29</sup>. Por otra parte, es muy probable que una alteración en la produc-

ción de quimioquinas afecte también los patrones de recirculación de las células T. Se ha visto además que existe asociación entre expresión de ciertos receptores de quimioquinas y polarización de células T<sup>30</sup>.

Estos hallazgos sugieren que el SHIE sería una enfermedad de respuesta inflamatoria alterada, más que una enfermedad por hiperproducción de IgE.

### Conclusión

El síndrome de hiper IgE es una inmunodeficiencia primaria que, a pesar de su baja incidencia, ha despertado gran interés en los investigadores debido a la inusual variedad de características clínicas y niveles de IgE extremada-

mente altos. Los mecanismos moleculares involucrados aún no han sido esclarecidos. Se desconoce si la producción excesiva de IgE juega un rol patogénico o es un desorden genético no relacionado.

Un conocimiento acabado de las citoquinas involucradas en la síntesis de IgE, sus receptores, las señales de transducción gatilladas por los mismos y los mecanismos moleculares subsiguientes que resultan en el switch a IgE, abrirá nuevas perspectivas para entender este desorden. La caracterización de las células T efectoras ha ampliado el concepto del modelo Th1/Th2, incluyendo ahora a las células T regulatorias, no sólo en esta patología sino también en asma y otras

enfermedades alérgicas. Hasta tanto se logre establecer las bases genéticas de la enfermedad, no puede desecharse ninguna hipótesis respecto a la fisiopatogenia del SHIE, aún cuando ninguno de los mecanismos propuestos pueda explicar de manera concomitante y fehaciente, la hiperproducción de IgE y la condición de inmunodeficiencia que presentan estos pacientes.

### Correspondencia

**Dra. Adriana Cassinerio**

Laboratorio de Inmunología. Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Ferroviarios esq Bajada Pucará (C.P.:5000) Córdoba, Argentina

### Bibliografía

- Janeway C, Travers P. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York and London. Garland Publishing Inc. 1997, p 5:2.
- Schwarz K, Gauss G, Ludwig L, Pannicke U, Li Z, Lindner D et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996;274:97-99.
- Clark E, Ledbetter J. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994;367:425-428.
- Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cells clones and their supernatants. *J Immunol* 1988;140:4193-8.
- Bacharier L, Geha R. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:S547-558.
- Crewal I, Flavell R. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T cell responses. *Immunology Today* 1996;17:410-414.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi J, van Kooten C, Liu Y, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881-922.
- Abbas A, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher HL. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-69.
- Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-96.
- Vercelli D, Jabara H, Lauener R, Geha R. IL-4 inhibits the synthesis of INF-g and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol* 1990;144:570-573.
- Garraud O, Mollis S, Holland S, Sneller M, Mallech H, Gallin J, Nutman T. Regulation of immunoglobulin production in hyper-IgE (Job's) syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:333-340.
- Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263-268.
- Grimbacher B, Holland S, Gallin J, Greenberg F, Hill S, Malech H et al. Hyper IgE Syndrome with recurrent infections – An autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med* 1999;340:692-702.
- Rousset F, Robert J, Andary M, Bonnin J, Souillet G, Chrétien I et al. Shifts in interleukin-4 and interferon-g production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:58-69.
- Gudmundsson K, Sigurjonsson O, Gudmundsson S, Goldblatt D, Weemaes C, Haraldsson A. Increased

- expression of interleukin-13 but not interleukin-4 in CD4+ cells from patients with the hyper-IgE syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002;128:532-537
17. Paganelli R, Scala E, Capobianchi M, Fanales-Belasio E, D'Offizi G, Fiorilli M, Aiutti F. Selective deficiency of interferon-gamma production in the hyper-IgE syndrome. Relationship to in vitro IgE synthesis. *Clin Exp Immunol* 1991;84:28-33.
  18. Borges W, Augustine N, Hill H. Defective interleukin-12/interferon-gamma pathway in patients with hyperimmunoglobulinemia E syndrome. *J Pediatr* 2000;136:176-180.
  19. Stiehm E. Cytokine dysregulation in the hyperimmunoglobulinemia E syndrome. *J Pediatr* 2000;136:141-143.
  20. Chehimi J, Elder M, Greene J, Noroski L, Stiehm E, Winkelstein J, Sullivan K. Cytokine and chemokine dysregulation in hyper IgE syndrome. *Clin Immunol* 2001;100:49-56.
  21. Ohga S, Nomura A, Ihara K, Takahata Y, Suga N, Akeda H, Shibata R, et al. Cytokine imbalance in hyper-IgE syndrome: reduced expression of transforming growth factor beta and interferon gamma genes in circulating activated T cells. *Br J Haematol* 2003;121:324-331.
  22. Maloy K, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunol* 2001;2:816-822.
  23. Akbari O, Stock P, Dekruyff R, Umelsu D. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627-633.
  24. De Lafaille M, Muriglan S, Sunshine M, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado G et al. Hyper Immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1349-1360.
  25. Notarangelo L, Villa A, Schwarz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol* 1999;11:435-442.
  26. Paganelli R, Scala E, Mezzaroma I, Pinter E, D'Offizi G, Fanales-Belasio E, et al. Immunologic aspects of hyperimmunoglobulinemia E-like syndrome in patients with AIDS. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:995-1003.
  27. Grimbacher B, Belohradsky B, Holland S. Immunoglobulin E in primary immunodeficiency diseases. *Allergy* 2002;57:995-1007.
  28. Imaizumi T, Albertine K, Jicha D, McIntyre T, Prescott S, Zimmerman G. Human endothelial cells synthesize ENA-78: Relationship to IL-8 and to signalling of PMN adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:181-192.
  29. Llaw L, Birk D, Ballas C, Whitsitt J, Davidson J, Hogan B. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene. *J Clin Invest* 1998;101(Suppl 1):1468-1478.
  30. Kim C, Rott L, Kunkel E, Genovese M, Andrew D, Wu L, Butcher E. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 2001;108:1331-1339.



# Evaluación de la inmunidad celular en la alergia a proteínas de leche de vaca. Avances en su diagnóstico

Evaluation of the cellular immunity in cow's milk allergy. Progress in its diagnosis

Rubén Darío Motrich#, Claudio Gottero#, Carlos Rezzónico (h)\*, Carlos Rezzónico\*, Clelia Maria Riera# y Virginia Elena Rivero#

## ■ Resumen

La alergia a leche de vaca (ALV) se define como una reacción inmunológica adversa hacia antígenos presentes en la leche de vaca. Esta reacción puede ser mediada por una respuesta inmune de tipo humoral (IgE específica) o celular (linfocitos T, macrófagos y citoquinas). Las técnicas actuales que ayudan a su diagnóstico evalúan IgE específica, quedando una fracción importante de casos con posibles mecanismos celulares con resultados falsos negativos.

En este trabajo analizamos la utilidad de los ensayos de proliferación, secreción de TNF-alfa y dosaje de IgE antígeno-específicas hacia proteínas de leche de vaca (PLV) como herramientas diagnósticas de ALV en un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de ALV. Los índices de proliferación (IP) contra alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína fueron significativamente mayores en pacientes con contacto reciente con el alérgeno (menos de 4 meses con una dieta libre de PLV), cuando se los comparó con respecto a los IP arrojados por el grupo control y por pacientes con contacto lejano con PLV (más de 4 meses con una dieta de exclusión). Se observó un incremento significativo en la secreción de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de linfoproliferación antígeno-específico en los pacientes con contacto reciente con PLV. Se detectaron niveles elevados de IgE específica hacia PLV en el 59.3% de los pacientes, la mayoría de los cuales presentaron IP negativos.

Con estos resultados concluimos que una combinación de la linfoproliferación; secreción de TNF-alfa y determinación de IgE sérica antígeno-específico, son pruebas de laboratorio útiles y complementarias para el diagnóstico de ALV, tanto en niños que presentan hipersensibilidad de tipo inmediata como no inmediata, reduciendo la necesidad de utilizar los desafíos orales con el alérgeno, los cuales son potencialmente peligrosos para la salud del paciente.

## ■ Summary

*Although there is no reliable single laboratory test available for the diagnosis of cow's milk allergy, if an allergic mechanism is suspected, a number of laboratory studies may be useful in delineating specific proteins responsible for these disorders.*

*In the current study we analyzed in vitro lymphocyte proliferation assays, specific secretion of TNF<sub>α</sub> in culture supernatants and specific IgE in a group of patients with hypersensitivity to cow's milk antigens.*

*The stimulation index against a cow's milk antigen mixture, α-lactalbumin, β-lactoglobulin and casein were significant higher in the patient group maintained on cow's milk-free diet for less than 4 months when compared with the values observed in the control group and in the group of patients without a close contact to cow's milk proteins (CM). A significant increase in the TNF-α secretion was observed in supernatants from patients with close contact to CM. Specific IgE was detected in 59.3% of the patients, especially in patients who were not positive for the proliferation assay, suggesting a clear difference in the two mechanisms proposed as effectors in this disease.*

*We conclude that a combination of proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells to CM, the presence of TNF<sub>α</sub> in culture supernatants and specific IgE are useful laboratory tests in delineating specific proteins responsible for disorders with immediate and non immediate adverse reactions to cow's milk proteins, reducing the need for food allergen challenges in young children.*

Para citar este artículo:

Motrich RD, Gottero C, Rezzónico C (h), Rezzónico C, Riera CM, Rivero VE. Evaluación de la inmunidad celular en la alergia a proteínas de leche de vaca. Avances en su diagnóstico. *Alerg Immunol Clin* 2004;21(3-4):77-85.

# Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET.

\* Clínica del Niño, Ciudad de Córdoba, Argentina.

■ Palabras Clave:

leche de vaca, alergia, linfoproliferación, TNF-alfa, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina, caseína, IgE específica.

■ Key Words:

*Key words: cow milk, allergy, Specific lymphocyte proliferation, TNF-alpha, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, casein, specific IgE, cow's milk proteins.*

■ Abreviaturas:

ALV: alergia a leche de vaca.  
 PLV: proteínas de leche de vaca.  
 IP: índice de proliferación.  
 CMN: células mononucleares.  
 MPL: mezcla proteica láctea.

## Introducción

La alergia a proteínas de leche de vaca (ALV) se define como una reacción adversa, mediada por mecanismos inmunológicos, hacia antígenos de la leche de vaca <sup>1</sup>. La incidencia de esta patología se calcula que oscila en un rango de 1.9 a 7.5% según lo que arrojan estudios epidemiológicos <sup>2</sup>. Los signos y síntomas aparecen durante el primer año de vida, y en la mayoría de los pacientes en el primer mes <sup>3</sup>. Éstos aparecen dentro de los pocos días o semanas después que el niño comienza con la alimentación con una fórmula láctea de leche de vaca o con el primer contacto con la misma <sup>3</sup>. La ALV puede presentarse con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen signos y síntomas cutáneos, gastrointestinales y respiratorios, como así también reacciones de anafilaxia

sistémica <sup>4</sup>. Los síntomas clínicos abarcan reacciones de tipo inmediatas y de tipo retardadas, las cuales pueden actuar en conjunto o de manera separada <sup>5</sup>. Las reacciones de tipo inmediato son fundamentalmente dependientes de IgE, manifestándose con síntomas cutáneos, intestinales y/o respiratorios y en algunos casos hasta con reacciones de anafilaxia sistémica <sup>6</sup>. Por otro lado, las reacciones de tipo retardada involucran mecanismos celulares, en los cuales los protagonistas son los linfocitos T y macrófagos y las citoquinas por ellos liberadas (IFN-gamma y TNF-alfa), que pueden operar tanto a nivel de piel como así también en la mucosa intestinal <sup>6</sup>.

El diagnóstico de ALV actualmente se basa en una desaparición definitiva de la sintomatología clínica observada, luego que se elimina la leche de vaca y sus derivados de la dieta de los pacientes (como así también de la dieta de las madres que están amamantando a sus hijos) <sup>7</sup>, la reaparición de esta sintomatología al reintroducir la leche de vaca o derivados en la dieta, en los llamados desafíos orales y una nueva desaparición de los síntomas luego de la re-eliminación de la leche de vaca y derivados, y por supuesto, con exclusión de la intolerancia a la lactosa e infecciones asociadas <sup>8</sup>. La técnica diagnóstica que actualmente se considera como preferida, por sensible y específica, para la confirmación del diagnóstico de alergias alimentarias, es el desafío oral con el alérgeno y placebo realizada con control a doble ciego <sup>9</sup>.

Aunque no existe un único ensayo de laboratorio disponible, que sea reproducible, sensible y específico para el diagnóstico de ALV, si se sos-

pecha de un cuadro de alergia se prescriben una serie de estudios de laboratorio que pueden ser útiles para identificar los alérgenos implicados en las alergias mediadas por IgE específica <sup>10</sup>. De hecho, las pruebas cutáneas Skin Prick Puncture Test (SPT) y la determinación de IgE específica o Radio Allergo Sorbent Test (RAST) son herramientas útiles para establecer si un paciente posee niveles aumentados de IgE específica hacia proteínas de leche de vaca <sup>11</sup>. Estos estudios indican la presencia de IgE específica, pero no determinan un diagnóstico definitivo de alergia alimentaria <sup>8</sup>. Al mismo tiempo estas pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica, sólo identifican los cuadros de ALV en los cuales un mecanismo de tipo humoral o hipersensibilidad inmediata es responsable, existiendo muy pocos ensayos disponibles para detectar aquellos cuadros de ALV donde el mecanismo responsable es la hipersensibilidad de tipo demorada, con un mecanismo efector de tipo celular. Asociados a estas reacciones de hipersensibilidad de tipo demorada se encuentran los ensayos que utilizan parches cutáneos <sup>11</sup>, los que también correlacionan con las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediata <sup>12</sup>. Se han publicado numerosos ensayos basados en la inmunidad celular, fundamentalmente debido a que las reacciones mediadas por linfocitos T y macrófagos juegan un rol crucial en las reacciones de tipo demorada hacia proteínas de leche de vaca (PLV) a nivel de mucosa intestinal <sup>13-15</sup>. A pesar de la disparidad observada entre los resultados recogidos de los ensayos basados en la inmunidad celular <sup>13-16</sup>, algunos investigadores proponen que los ensayos de linfoproliferación antige-

no-específicos deberían ser empleados como ensayos diagnósticos, o al menos predictivos, para los casos de alergia alimentaria.

En el presente trabajo, nos propusimos analizar la utilidad de los ensayos de proliferación antígeno-específica, la secreción específica de TNF-alfa y el dosaje de IgA e IgG séricas específicas hacia PLV (alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína) como herramientas diagnósticas de alergia a PLV de vaca en un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de ALV.

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que una combinación de los ensayos analizados en este trabajo, ensayo de linfoproliferación antígeno-específica; secreción específica de TNF-alfa y determinación de IgE sérica específica, son pruebas de laboratorio útiles y complementarias entre sí, para el diagnóstico de alergia a PLV en aquellos niños que presentan hipersensibilidad de tipo inmediata como no inmediata, reduciendo la necesidad de utilizar los desafíos orales con el alérgeno, los cuales son potencialmente peligrosos para la salud del paciente.

## Pacientes y métodos

### Pacientes

Cuarenta y un niños fueron incluidos en este estudio. Los pacientes fueron seleccionados de la clínica pediátrica "Clínica del Niño" de la ciudad de Córdoba. El grupo de pacientes consistió de 27 niños sospechados de presentar ALV sobre la base de una respuesta favorable a la eliminación de la leche de vaca y derivados de la dieta, y una recidiva o reaparición de las manifestaciones clínicas luego del desafío con leche

de vaca. Los pacientes presentaron signos y síntomas de alergia luego de la ingestión de leche, como eritemas cutáneos, urticaria, prurito, angioedema, vómitos, reflujo gastroesofágico, cólicos, diarrea, edema de laringe, síndrome de malabsorción, escaso progreso ponderal, dolor abdominal crónico, asma o disnea. Los síntomas desaparecieron completamente dentro de las 72 horas luego de la eliminación de las PLV de la dieta (leche de vaca y derivados). Algunos pacientes habían eliminado la leche de vaca y derivados de sus dietas varios meses antes de que fueran incluidos en este estudio. La ALV fue verificada sobre una respuesta favorable a la eliminación de la dieta y una recidiva en el desafío con leche de vaca. La edad de los pacientes estuvo comprendida en un rango de 1 mes a los 7 años de vida. El grupo control comprendió 14 niños sanos sin ningún antecedente de atopía ni evidencia clínica de ALV o cualquier otra alergia alimentaria, con edades que oscilaron entre 1 y 7 años de vida.

A estos niños se les extrajeron muestras de sangre por venopunción (2-5 ml) en condiciones de esterilidad y el ensayo de linfoproliferación se desarrolló a doble ciego. Un consentimiento informado para la inclusión en este estudio se obtuvo de todos los padres de los niños analizados.

### Ensayo de linfoproliferación

Células mononucleares de sangre periférica (CMN), las cuales comprenden las poblaciones de linfocitos y monocitos, fueron purificadas de las muestras de sangre heparinizada mediante un gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque.

Luego las CMN fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con glutamato, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, tampón HEPES, penicilina/streptomycin, 2-mercaptoetanol 50 mM y suero fetal bovino (Sigma) al 10%. Las CMN se ajustaron a una concentración de  $1.5 \times 10^5$  células por reservorio, en un volumen final de 0.2 ml, en microplacas de cultivo de 96 reservorios con fondo plano (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) con o sin diferentes PLV: alfa-lactalbúmina (600  $\mu\text{g/ml}$ ), beta-lactoglobulina (600  $\mu\text{g/ml}$ ), caseína (600  $\mu\text{g/ml}$ ), y una mezcla equimolar de las mismas que nosotros llamamos Mezcla de Proteínas de Leche de vaca (MPL) (600  $\mu\text{g/ml}$ ). Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 37°C en estufas de cultivo con atmósfera húmeda saturada conteniendo 7.5% de  $\text{CO}_2$ . Como control positivo de proliferación, las CMN fueron incubadas con el mitógeno Concanavalina A (Sigma). La proliferación celular fue medida analizando la síntesis de ADN mediante la adición de 1  $\mu\text{Ci}$  de [metil-3H] timidina ([3 H] TdR) por reservorio, 18 horas previas a cosechar las células sobre filtros de fibras de vidrio. El material marcado, luego de cosechado, fue automáticamente cuantificado en un contador de centelleo (Pharmacia, Francia). La proliferación celular fue expresada como índice de proliferación (IP) que se calculó de la siguiente manera: cuentas por minuto incorporadas por las células en presencia de los antígenos/cuentas por minuto incorporadas por las células en presencia de medio de cultivo solamente. Los valores de corte fueron

calculados con las medias de los índices de proliferación arrojados por los controles normales más dos desviaciones estándares. Estos límites o valores de corte fueron: 1.60 (0.92 +/- 2 x 0.34) para MPL, 1.74 (1.05 +/- 2 x 0.34) para alfa-lactalbúmina, 1.80 (1.04 +/- 2 x 0.38) para beta-lactoglobulina, y 1.97 (1.13 +/- 2 x 0.43) para caseína, respectivamente.

#### Cuantificación de TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo

Los niveles de TNF-alfa fueron dosados en los sobrenadantes de cultivo del ensayo de linfoproliferación de aquellos reservorios donde se enfrentó a las CMN frente a MPL como se describió previamente. Cien microlitros de los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos luego de 96 horas de cultivo y la secreción de TNF-alfa fue analizada mediante un método inmunométrico quimioluminiscente comercial en autoanalizador (Immulate, DPC, Los Angeles, CA). El ensayo fue realizado de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante, en un autoanalizador (Immulate, DPC). Las concentraciones de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo fueron expresadas en pg/ml, de acuerdo a la curva de estándares desde 1.7 a 1000 pg/ml.

#### Determinación de IgE específica para PLV

Para la determinación de los niveles de IgE específica para proteínas lácteas en las muestras de suero, se usó un ensayo comercial ULEAST (Ciprés Diagnostica, Leuden, Bélgica). El ensayo fue desarrollado de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que consistió en la incubación de diluciones de los sueros con discos sensibilizados con los alérgenos / proteínas lácteas en microplacas de 96 reservorios (Becton Dickinson) durante una hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados, las placas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de conejo específico para la porción Fc de la IgE humana conjugado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. La reacción fue revelada con la solución de cromógeno/sustrato enzimático de 3-3'-5-5'-tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La absorbancia fue leída a 570 nm en un lector de ELISA (BioRad). Los resultados del ensayo ULEAST fueron obtenidos comparando los valores de absorbancia arrojados por los sueros problemas con los valores de absorbancia arrojados por los sueros de referencia o patrón provistos por el fabricante: H (++++), A (++++), B (+++), C (++) y D (+). Resultados  $\square$  a 1+ fueron considerados positivos.

#### Análisis estadístico

El ensayo LSD Fisher Alfa fue usado para la comparación de los diferentes grupos analizados.

## Resultados

#### Respuesta linfoproliferativa e IgE específica frente a PLV

La Figura 1 muestra una comparación de los IP del grupo control normal con los IP del total de los pacientes, y los valores observados cuando el grupo de pacientes fue dividido en pacientes con más o menos de 4 meses de dieta libre de leche de vaca y derivados. Cuando los valores de IP contra MPL, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína obtenidos del grupo total de pacientes fueron comparados con los IP del grupo control normal, sólo se observó una diferencia significativa para MPL ( $p < 0.05$ ). Cuando se subdividió al grupo de pacientes con respecto al tiempo transcurrido desde su último contacto con el alérgeno, se observó que los IP contra MPL, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con menos de 4 meses de dieta libre de leche de vaca y derivados (contacto reciente con el alérgeno), comparados con los valores observados en el grupo control normal y con el grupo de pacientes sin un contacto reciente con leche de vaca y derivados (más de 4 meses desde su último contacto con PLV) (Figura 1).

No se detectó índice de proliferación positivo algu-

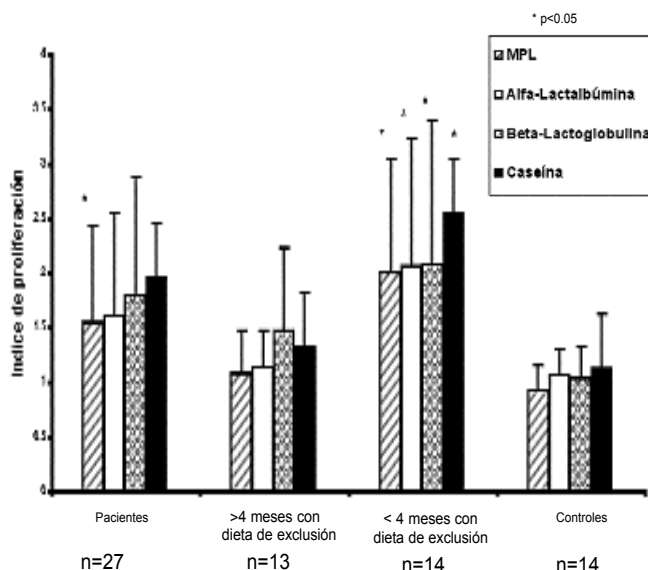
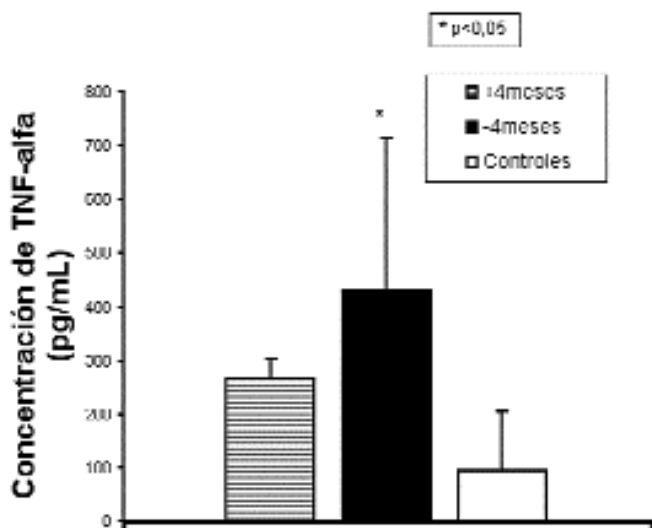


Figura 1: Proliferación de células mononucleares de sangre periférica frente al estímulo con proteínas de leche de vaca

no cuando se analizó la respuesta de las CMN de los controles normales frente a los distintos antígenos ensayados: MPL, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina o caseína (Figura 1). Los valores de corte de los IP fueron: 1.60 para MPL, 1.74 para alfa-lactalbúmina, 1.80 para beta-lactoglobulina, y 1.97 para caseína, respectivamente. Se detectó respuesta proliferativa positiva a uno o más de los antígenos ensayados en 15 de 27 pacientes (55.5%). Como se puede observar en la Figura 1, los pacientes con menos de 4 meses con dieta libre de leche de vaca y derivados arrojaron mayores IP en el ensayo de linfoproliferación, con 10 de 14 pacientes (71.4%) con IP positivos. Pudimos observar que sólo 5 de 13 pacientes (35.5%) con más de 4 meses con dieta libre de leche de vaca y derivados, mostraron respuesta proliferativa positiva a uno o más de los antígenos ensayados, sugiriendo que un contacto reciente con el alérgeno es necesario para detectar las CMN específicas circulantes (Figura 1). De manera interesante, la mayoría de los pacientes que arrojaron elevada respuesta proliferativa a las PLV tuvieron predominantemente sintomatología gastrointestinal, como diarreas y cólicos; y a la inversa, aquellos pacientes que no presentaban respuesta proliferativa positiva, pero tenían elevados niveles de IgE específica presentaron predominantemente sintomatología cutánea y/o respiratoria, sugiriendo una asociación entre el mecanismo inmunológico efector y las manifestaciones clínicas observadas (Figura 2).

No se observó asociación alguna entre la respues-

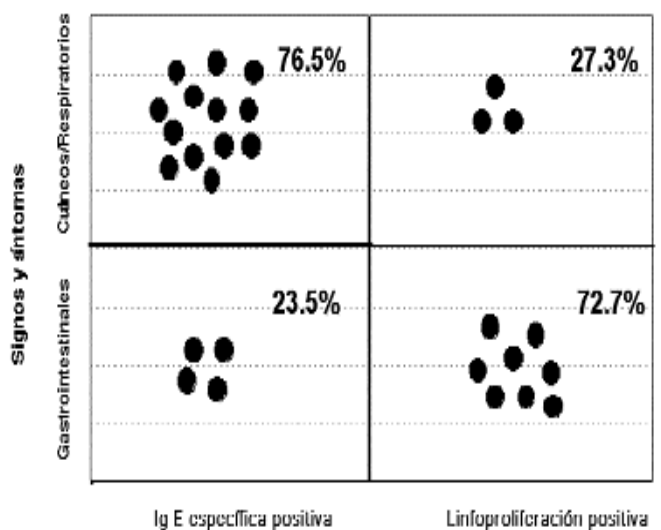


**Figura 2:** TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares estimuladas con proteínas de leche de vaca.

ta proliferativa y las edades de los pacientes en los dos sub-grupos de pacientes, sugiriendo que la edad no es un factor clave en el mecanismo inmunológico efector. También pudimos observar que no todos los pacientes fueron positivos para todas las proteínas lácteas ensayadas, argumentando la importancia de ensayar diferentes proteínas lácteas como posibles alérgenos, para aumentar la sensibilidad analítica del método.

También analizamos los niveles séricos de IgE específica para alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína. Dieciséis de los 27 pacientes analizados (59.3%) presentaron niveles elevados de IgE específica para uno o más de los antígenos ensayados (Figura 3). Es interesante notar que la mayor respuesta humoral (IgE específica) fue observada en pacientes que no fueron positivos para el ensayo de linfoproliferación, sugiriendo una clara división en los mecanismos de respuesta propuestos (celular y humoral). Sólo 5 pacientes (18.5%) presentaron respuesta positiva por ambos métodos, el ensayo de linfoproliferación y el dosaje de IgE específica, con una combinación de los mecanismos inmunológicos efectores. Solamente en un paciente se observaron resultados negativos por ambos métodos ensayados.

En la Figura 3 se puede observar, que hubo pacientes que presentaron únicamente niveles elevados de IgE, evidenciando un mecanismo de respuesta fundamentalmente humoral (IgE específica (+)/Linfoproliferación (-) (40.8%). Otra fracción de pacientes (18.5%), presentó linfoproliferación positiva y niveles elevados de IgE es-



**Figura 3:** Distribución de la sintomatología observada versus el perfil inmunológico presentado en la alergia

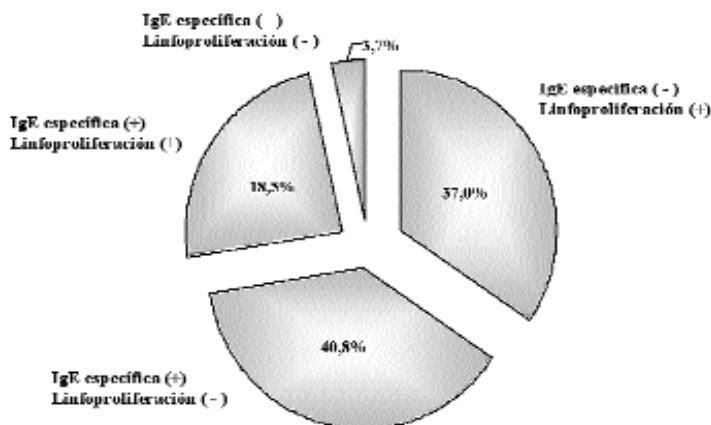
pecífica, con lo que una combinación de los mecanismos (celular y humoral) sería el responsable del cuadro alérgico. Pero el hallazgo que merece mayor consideración es que la determinación de IgE específica no es suficiente para el diagnóstico de la totalidad de los pacientes con ALV, ya que hubo una fracción considerable de pacientes con un cuadro activo de ALV, con todo el espectro de manifestaciones clínicas típicas, y sin embargo no presentaron niveles elevados de IgE específica para proteínas de leche de vaca (37%). Cuando a este grupo de pacientes se les realizó el ensayo de linfoproliferación, resultaron positivos, por lo que se evidencia la importancia del ensayo de linfoproliferación para el diagnóstico de ALV en este grupo de pacientes, en los cuales su alergia estaría mediada por un mecanismo de respuesta de tipo celular exclusivamente. Este grupo de pacientes, cuando es analizado con las técnicas diagnósticas que se realizan rutinariamente en el laboratorio inmunológico (que sólo miden IgE específica), es diagnosticado como falsos negativos. Este hecho resalta la importancia del ensayo de linfoproliferación antígeno específica como herramienta en el diagnóstico certero de los pacientes con ALV.

#### Secreción de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo del ensayo de linfoproliferación

Como el TNF-alfa es uno de los mediadores involucrados en las reacciones adversas a PLV, y es bien conocido que altera directamente la permeabilidad del epitelio intestinal, analizamos la secreción de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo del ensayo de linfoproliferación frente a MPL, en ambos grupos de pacientes analizados y en el grupo control normal. Como se puede observar en la Figura 4, se detectó un incremento estadísticamente significativo en la secreción específica de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo de los pacientes con menos de 4 meses de dieta libre de leche de vaca y derivados (contacto reciente con el alérgeno) comparado con el otro grupo de pacientes (más de 4 meses con dieta libre de leche de vaca y derivados) y con el grupo control normal ( $p < 0.05$ ).

#### Discusión

El principio de eliminación/desafío posterior con el alérgeno ofensor ha sido y es en la actualidad, la prueba decisiva en el diagnóstico de alergias alimentarias, a pesar de que la reintroducción del alérgeno al organismo del paciente es potencialmente peligrosa para su integridad física. Como consecuencia de lo anterior, existe una gran



**Figura 4:** Distribución de los posibles mecanismos inmunológicos causantes de la alergia, hallados en los pacientes analizados

necesidad de disponer de ensayos predictivos para evitar esos riesgos. Aunque no existe un único ensayo de laboratorio que satisfaga todas estas necesidades en cuanto al diagnóstico de ALV, si se sospecha un cuadro alérgico, existe una serie de ensayos que pueden ser útiles en el diagnóstico, identificando proteínas específicas como alérgenos responsables en dicha patología<sup>10-15</sup>. Para las reacciones de hipersensibilidad inmediata, existen ensayos in-vitro e in-vivo útiles para su diagnóstico, como el dosaje de IgE sérica específica y el ensayo que mide la degranulación de mastocitos específicos de tejido. Debido a que aproximadamente la mitad de los cuadros alérgicos son debidos a un mecanismo inmunológico celular, y no por IgE específica<sup>16</sup>, el estudio de la inmunidad celular es de suma importancia. En las reacciones de hipersensibilidad de tipo demorada, varios estudios sobre ensayos basados en la inmunidad celular han sido publicados pero con disparidad en sus resultados. Tainio y Savilahti<sup>17</sup> usaron un ensayo de estimulación linfocitaria con beta-lactoglobulina en una población de niños con hipersensibilidad inmediata a PLV, y encontraron que la mayoría no presentaba niveles elevados de IgE específica, pero resultaron positivos en el ensayo de estimulación linfocitaria con beta-lactoglobulina. En otro estudio, Soumalainen y col.<sup>15</sup> midieron la respuesta inmune celular hacia PLV, en pacientes con diagnóstico de ALV mediante la prueba de eliminación/desafío oral con el alérgeno, que presentaban sintomatología tanto gastrointestinal como cutánea. Ellos encontraron que los IP en pacientes con ALV con sintoma-

tología gastrointestinal, fueron significativamente mayores que aquellos observados en pacientes alérgicos a leche de vaca con sintomatología cutánea o en pacientes que habían resultado negativos para el ensayo de desafío oral. Papadopoulos y col.<sup>18</sup> evaluaron la proliferación linfocitaria frente a beta-lactoglobulina mediante la cuantificación de la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) en CMN, mediante citometría de flujo. Ellos encontraron una marcada diferencia en la expresión del PCNA en los niños alérgicos a leche de vaca con respecto a niños controles, sugiriendo que la expresión de PCNA es un marcador útil para evaluar proliferación linfocitaria específica para proteínas de leche de vaca. Kondo y col.<sup>19</sup> demostraron que la respuesta proliferativa de CMN hacia diferentes alérgenos alimentarios en reacciones de hipersensibilidad de tipo demorada en las alergias alimentarias, es útil para la identificación de los alérgenos. No obstante, Hoffman y col.<sup>20</sup> encontraron que los ensayos de proliferación linfocitaria no son diagnósticos ni predictivos de reactividad clínica en pacientes con ALV. Ellos encontraron que los linfocitos de varios controles normales eran altamente respondedores a los antígenos lácteos, y a la inversa, linfocitos de muchos pacientes alérgicos a leche de vaca no fueron respondedores en las condiciones experimentales que usaron en sus estudios.

En el presente estudio, en concordancia con varios trabajos anteriores que propusieron a las pruebas basados en la inmunidad celular como herramientas útiles para la detección de alérgenos implicados en las alergias alimentarias con mecanismo de hipersensibilidad de tipo demorada, nosotros encontramos que los IP contra MPL, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína fueron significativamente mayores en los individuos del grupo de pacientes comparados con los IP de los individuos normales del grupo control. Mas aún, los IP contra MPL, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína fueron significativamente mas elevados en el grupo de pacientes con menos de 4 meses con dieta libre de leche de vaca y derivados, con respecto a los IP de los pacientes con más de 4 meses con dieta libre de leche de vaca y derivados, y con los IP de los individuos del grupo control. La falta de respuesta en el grupo de pacientes sin un contacto reciente con el alérgeno puede ser atribuida a la pérdida de los linfocitos circulantes reactivos hacia PLV de la circulación sistémica, que serían reclutados en los tejidos afectados en los pacientes sensibilizados, o porque quizás la hipersensibilidad a leche de vaca en estos pacientes sea mediada por otros meca-

nismos efectores (como IgE específica). Es bien conocido que las pruebas cutáneas (SPT) antígeno-específicas y el dosaje de IgE específica (RAST) son métodos para determinar si un individuo posee IgE específica para antígenos alimentarios, aunque ellos no establecen el diagnóstico definitivo de una alergia alimentaria. De la misma manera, la medición de la respuesta inmune celular hacia PLV mediante el ensayo de linfoproliferación no establecería un diagnóstico definitivo de ALV, pero sería muy útil para confirmar si un paciente posee o no linfocitos T específicos para antígenos alimentarios.

Es ampliamente conocido que un antígeno específico induce la expansión clonal de sus linfocitos T específicos y su diferenciación hacia una progenie de células T efectoras capaces de sintetizar todas las proteínas necesarias para sus funciones específicas<sup>21</sup>. Numerosos trabajos demostraron que la medición de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo puede ser útil en el diagnóstico de ALV<sup>22,23</sup>. De hecho, CMN de niños alérgicos a leche de vaca secretan TNF-alfa y se postula que durante el curso de la ALV los elevados niveles de TNF-alfa secretados por las CMN, luego de contactar con el alérgeno específico, actúan sinérgicamente con el IFN-gamma llevando a un incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal<sup>24</sup>. También es conocido que las proteínas intactas, mas que las procesadas intestinalmente, estimulan a las CMN para secretar TNF-alfa y alterar la permeabilidad de la barrera intestinal<sup>25</sup>. Además, ha sido demostrado que el patrón de secreción de TNF-alfa en respuesta al estímulo con PLV, es diferente en niños con alergia a leche de vaca con sintomatología cutánea del de los que presentan sintomatología gastrointestinal. Se ha sugerido que la secreción de TNF-alfa podría predecir una recidiva clínica durante un desafío con el alérgeno<sup>26</sup>. En el presente trabajo, observamos un significativo incremento en la secreción de TNF-alfa en los sobrenadantes de cultivo de pacientes con un contacto reciente con PLV, comparado con los niveles hallados en el grupo de pacientes con contacto lejano con el alérgeno y con los hallados en los controles. Es interesante destacar la correlación encontrada entre la elevada respuesta linfoproliferativa y secreción de TNF-alfa con sintomatología gastrointestinal, como diarrea y cólicos, sugiriendo una asociación entre el mecanismo inmunológico efector y las manifestaciones clínicas observadas. En concordancia con resultados publicados por varios investigadores [8], los niveles de IgE sérica específica para alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína, es-

tuvieron elevados en solamente el 59.3% de los pacientes incluidos en nuestro estudio. De manera interesante, la mayor respuesta de IgE fue observada en pacientes que no fueron positivos para el ensayo de linfoproliferación, sugiriendo una clara diferencia entre los dos mecanismos propuestos como efectores en esta patología (hipersensibilidades tipo I o mediada por IgE y tipo IV o mediada por células, respectivamente). Sólo el 18.5% de los pacientes presentaron respuesta positiva por ambos métodos, ensayo de linfoproliferación y dosaje de IgE específica. Solamente un paciente resultó negativo por ambos métodos ensayados. De manera interesante, el 37% de los pacientes incluidos en nuestro estudio presentó elevada respuesta linfoproliferativa hacia uno o más de los antígenos ensayados y no presentó elevados niveles de IgE específica, evidenciando la importancia de usar una combinación de métodos, que midan mecanismos mediados por IgE y por células, cuando se sospecha de un cuadro de ALV.

Una correlación importante que se halló en el presente trabajo fue la obtenida entre el diagnóstico clínico realizado, contemplando el espectro típico de signos y síntomas clínicos

presentados en los pacientes, con los resultados de los ensayos de laboratorio practicados (linfoproliferación e IgE específica). Hubo una correlación entre la sintomatología cutánea/respiratoria con niveles elevados de IgE específica (76.5%), y entre la sintomatología gastrointestinal con la respuesta linfoproliferativa (72.7%), lo que concuerda con lo propuesto por numerosos autores<sup>1, 3, 4, 6, 8, 14, 22, 23, 24, 26</sup>. Esto pone de manifiesto que el diagnóstico clínico es tan importante como el diagnóstico de laboratorio, siendo los dos complementarios y no excluyentes.

### Conclusión

A partir de estos resultados, nosotros proponemos que una combinación de la respuesta proliferativa de CMN hacia antígenos lácteos, la presencia de TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo y los niveles séricos de IgE específica son marcadores útiles para la identificación de ALV en pacientes con distintas manifestaciones clínicas (mediadas por IgE y mediadas por células), reduciendo la necesidad de recurrir a los desafíos orales con el alérgeno en niños.

### ■ Agradecimientos:

Este trabajo fue llevado a cabo con fondos otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC), Agencia Córdoba Ciencia, Fundación Antorchas, y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina. Rubén Motrich percibió una beca de la Secretaría de Extensión Universitaria-UNC. Queremos agradecer también al Dr. Raúl Capra del Laboratorio del Hospital Privado de Córdoba y a todo el personal del Laboratorio de la Dirección de Especialidades Médicas "Dr. Benito Soria" de la ciudad de Córdoba.

### ■ Correspondencia:

**Dr. Rubén D. Motrich**  
Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Pabellón Argentina, Córdoba, Argentina.  
Tel: 54-351-4334164, Fax: 54-351-4333048.  
e-mail: rmotrich@bioclin.fcq.unc.edu.ar

### Bibliografía

1. Sampson HA. Food allergy. Part 1. Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:717-28.
2. Host A, Halken S. Epidemiology and prevention of cow's milk allergy. *Allergy* 1998;53:111-3.
3. Block SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683-8.
4. Sampson HA. Food allergy. *JAMA* 1997; 278: 1888-94.
5. Helm RM, Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 647-53.
6. Spergel JM, Pawlowski NA. Food allergy: mechanisms, diagnosis and management in children. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 49: 673-96.
7. Jarvinen KM, Suomalainen H. Development of cow's milk allergy



- in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 978–87.
8. Sampson HA. Food allergy. Part 2. Diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 981–89.
  9. Helm RM. Food allergy: in-vivo diagnostics including challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:255–59.
  10. Dupont C, Heyman M. Food protein-induced enterocolitis syndrome: laboratory perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:850–7.
  11. Majamaa H, Moisió P, Holm K, Kautiainen H, Turjanmaa K. Cow's milk allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE. *Allergy* 1999;54: 346–51.
  12. Saarinen KM, Suomalainen H, Savilahti E. Diagnostic value of skin-prick and patch tests and serum eosinophil cationic protein and cow's milk-specific IgE in infants with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 423–9.
  13. Scheinmann P, Gendrel D, Charlas J, Paupe J. Value of lymphoblast transformation test in cow's milk protein intestinal intolerance. *Clin Allergy* 1976;6:515–21.
  14. Hill DJ, Ball G, Hosking CS. Clinical manifestations of cow's milk allergy in childhood: associations with in-vitro cellular immune responses. *Clin Allergy* 1998;18:469–79.
  15. Suomalainen H, Soppi E, Isolauri E. Lymphocyte response to cow's milk proteins in patients with cow's milk allergy: relationship to antigen exposure. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:20–6.
  16. Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:33–7.
  17. Tainio VM, Savilahti E. Value of immunologic tests in cow milk allergy. *Allergy* 1990;45:189–96.
  18. Papadopoulos NG, Syrigou EI, Bossios A, Manou O, Gourgiotis D, Saxoni-Papageorgiou P. Correlation of lymphocyte proliferating cell nuclear antigen expression with dietary cow's milk antigen load in infants with allergy to cow's milk. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119:64–8.
  19. Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Yokoyama Y. Proliferative responses of lymphocytes to food antigens are useful for detection of allergens in non-immediate types of food allergy. *J Invest Allergy Clin Immunol* 1997;7:122–6.
  20. Hoffman KM, Ho DG, Sampson HA. Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:360–6.
  21. Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. T cell-mediated immunity, in: D. Schanck (Ed.). *Immunobiology, the Immune System in Health and Disease*. Fifth edition. Garland Publishing, Taylor and Francis Group. New York. 2001. Págs. 295–421.
  22. Heyman M, Desjeux JF. Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Ann NY Acad Sci* 2000;915:304–11.
  23. Desjeux JF, Heyman M. Milk proteins, cytokines and intestinal epithelial functions in children. *Acta Paediatr Jpn* 1994;36:592–96.
  24. Heyman M, Darmon N, Dupont C, Dugas B, Hirribaren A, Blaton MA, Desjeux JF. Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor alpha, altering intestinal function. *Gastroenterology* 1994;106:1514–23.
  25. Benlounes N, Dupont C, Candalh C, Blaton MA, Darmon N, Desjeux JF, Heyman M. The threshold for immune cell reactivity to milk antigens decreases in cow's milk allergy with intestinal symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:781–9.
  26. Benlounes N, Candalh C, Matarazzo P, Dupont C, Heyman M. The time-course of milk antigen-induced TNF-alpha secretion differs according to the clinical symptoms in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:863–9.

# Respuesta de anticuerpos a la avenina en niños con enfermedad celíaca

Antibody response against avenin in children with celiac disease.

Teresa Beatriz Talavera\*, Gustavo Bonacci °, Nélica Azar de Aldao\*\*, Mario Aldao<sup>oo</sup>, Ramón Asis<sup>ooo</sup>, Mónica Antolín\*\*\*, Carolina Riga\*\*\*\*.

## ■ Resumen

La enfermedad celíaca es un desorden inmunológico de base genética del intestino delgado humano, asociado a los HLA DQ<sub>2</sub> (o DQ<sub>8</sub>), e inducido por la ingestión de gliadina de trigo y proteínas relacionadas de la cebada, centeno y posiblemente avena. Muchas investigaciones se abordaron para tratar de esclarecer el posible rol tóxico de la avena en el paciente celíaco. Se realizaron estudios administrando dieta libre de gluten suplementada con avena a pacientes celíacos con resultados alentadores. Sin embargo, aún persisten las controversias acerca de la toxicidad de la avena, en estudios in vivo e in vitro. Pocos autores evaluaron la respuesta humoral hacia la avenina (proteína de la avena relacionada con la gliadina) por técnicas de inmunoblotting. El objetivo de este trabajo fue extraer la gliadina del trigo y la avenina de la avena y evaluar la respuesta de anticuerpos de pacientes celíacos frente a dichas proteínas por técnicas de inmunoblotting. Los resultados evidenciaron una fuerte respuesta de anticuerpos para gliadina y avenina, siendo las fracciones más reconocidas, la ω-gliadina y la glutenina de alto peso molecular para el trigo, y la fracción de 20-23 kilodaltons para la avena. Dada la complejidad de estas proteínas se requieren futuros estudios para evaluar similitud de secuencias y estructuras conformacionales entre las fracciones proteicas más reconocidas por los anticuerpos y establecer si ellas son capaces de estimular una respuesta inmune a nivel intestinal.

## ■ Summary

*Celiac disease is a genetic-based immune disorder of human small intestine that is associated to HLA DQ<sub>2</sub> (or DQ<sub>8</sub>) and induced by dietary exposure to wheat gliadin and related proteins from barley, rye, and possibly oats. Many studies have intended to clarify the possible toxic role of oat in the celiac patient. There were performed studies administering gluten free diet with additional oat to celiac patients with encouraging results. However, still today remain controversial issues about oat toxicity in studies in vitro and in vivo. Few authors analyzed humoral response to avenin (oat protein related with gliadin) by immunoblotting analysis. The aim of this paper consisted in the extraction of gliadin from wheat and avenin from oat with further evaluation of antibodies response of celiac patients against those proteins by immunoblotting analysis. Results showed a strong antibodies response to gliadin and avenin, being the most detected fractions, ω-gliadin and high molecular weigh of glutenin to wheat, whereas 20-23 kilodaltons fractions were to oat. Due to these proteins complexity, further studies are required to evaluate similarities of sequences and conformational structures among the most detected fractions by these antibodies and to determine if they are capable of stimulating an immune response in gut.*

Para citar este artículo:

Talavera TB, Bonacci G, Azar de Aldao N, Aldao M, Asis R, Antolín M, Riga C. Respuesta de anticuerpos a la avenina en niños con enfermedad celíaca.

*Alerg Immunol Clin* 2004;21(3-4):86-96.

\* Bioquímica; \*\*Bioquímica Esp. en Inmunología, ex jefa del Laboratorio de Inmunología; \*\*\*Técnica de Laboratorio. Laboratorio de Inmunología. \*\*\*\*Médica Pediatra, Servicio de Gastroenterología.

Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba.

° Bioquímico, Doctor en Ciencias Químicas;

oo Bioquímico, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Bromatología; ooo Bioquímico.

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

## ■ Palabras Clave:

Enfermedad celíaca, dieta libre de gluten, avena, avenina, prolaminas de cereales, anticuerpos antigliadina.

## ■ Key Words:

*Celiac disease, gluten free diet, oats, avenin, prolamins of cereals, anti-gliadin antibodies*

## Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es un desorden inmunológico de base genética del intestino delgado humano, asociado a los HLA DQ<sub>2</sub> (o DQ<sub>8</sub>), e inducido por la ingestión de gliadina de trigo y proteínas relacionadas de la cebada, centeno y posiblemente avena <sup>1</sup>.

La presentación de los péptidos derivados de la gliadina mediada por los HLA a las células T conduce a la activación de las mismas y a la secreción de anticuerpos es-

pecíficos contra la gliadina y la enzima transglutaminasa tisular (tTG) <sup>2</sup>. Existen evidencias que la tTG cataliza la deamidación de péptidos derivados de la gliadina aumentando la potencia de los mismos para activar las células T específicas en los pacientes celíacos <sup>3</sup>. Se produce una respuesta inflamatoria que provoca el aplanamiento de las vellosidades intestinales y la ruptura del epitelio de superficie, característico de la EC. Este proceso inicia los síntomas clínicos, tales como diarrea, malabsorción de nutrientes, disminución de peso, distensión abdominal, anemia y fatiga, además de un aumento sustancial del riesgo a desarrollar osteoporosis y procesos malignos a nivel intestinal como linfoma y carcinoma <sup>4</sup>.

El tratamiento de la EC se basa en la dieta libre de gluten (DLG). El término "gluten" se refiere específicamente al complejo de proteínas compuesto por la prolamina, gliadina, y la glutelina, glutenina, presentes en el trigo <sup>5</sup>; que dada la similitud estructural de ambas, actualmente son agrupadas dentro de la "superfamilia de prolaminas" <sup>6,7</sup>. Sin embargo, el término "libre de gluten" se usa más ampliamente para describir a los alimentos o dietas derivadas no sólo del trigo sino también de todos los granos que contengan prolaminas tóxicas para el enfermo celíaco <sup>5</sup>. Se ha demostrado la toxicidad de las prolaminas del trigo, cebada, y centeno (gliadina, secalina y hordeína), mientras que la toxicidad de la prolamina de la avena (avenina), es motivo de controversia <sup>8-11</sup>.

Las primeras investigaciones realizadas "in vivo" para evaluar el rol tóxico de la avenina tuvieron el inconveniente de que se realizaron con pocos pacientes y de que se evaluaron hallazgos no aceptados como diag-

nósticos de EC, <sup>12,13,14</sup>. En la última década se comenzó a reevaluar el efecto de la DLG con el agregado de avenina libre de contaminantes con estudios que involucraron a un mayor número de pacientes celíacos, con la medición de parámetros válidos para el diagnóstico de EC y con mayor tiempo de seguimiento. Los resultados fueron alentadores, tanto en pacientes adultos <sup>15-20</sup>, como en niños <sup>21,22</sup>. Se abre así la posibilidad de incluir a la avena en la dieta del celíaco brindando una fuente de fibras, que por cierto es escasa en la DLG, y un aporte de proteínas de buena calidad, mejorando también la textura y sabor de los alimentos que la contienen.

Sin embargo, en otros estudios "in vivo" se reportaron resultados dispares después de la ingesta de avena. Se observó desarrollo de atrofia subtotal de vellosidades y dermatitis severa, y también la presencia de niveles aumentados de ARNm de interferón gama (IFN $\gamma$  ARNm) en las muestras de biopsia de intestino delgado <sup>23</sup>, lo cual constituye un signo de activación de células T <sup>24</sup>; mientras que en pacientes celíacos tratados con DLG tradicional no se encontró expresión de IFN $\gamma$  ARNm <sup>25,26</sup>. Asimismo, se evaluaron además, los síntomas y la calidad de vida de pacientes tratados con DLG con agregado de avena. Se pudo apreciar que los pacientes tenían más a menudo diarrea, pero también sufrían simultáneamente de un promedio mayor de síntomas de contipación que los pacientes que consumían DLG <sup>27</sup>. Aunque la integridad de la mucosa intestinal de estos pacientes no se alteró, fue evidente una mayor inflamación.

También existen resultados contradictorios en estudios "in vitro", evaluando la respuesta de linfocitos T <sup>28-30</sup>

y la inmunidad humoral. Con respecto a ésta, varios investigadores encontraron respuesta de anticuerpos contra las prolaminas de la avena, otros trabajos reportaron escasa respuesta a la misma o sólo a algunas de sus fracciones, <sup>31-33</sup>.

Dado que existen en la bibliografía pocos estudios que investigan la respuesta de anticuerpos en pacientes celíacos frente a prolaminas de avena, en este trabajo se propuso realizar un aporte en dicho tema. Para ello, en primer lugar, se realizó la extracción y purificación de las prolaminas de trigo y avena, y en segundo lugar se procedió a evaluar la respuesta de anticuerpos de pacientes celíacos pediátricos frente a dichas prolaminas utilizando técnicas de inmunoblotting.

## Pacientes y metodos

### Pacientes

Se trabajó con 24 pacientes con diagnóstico de EC de acuerdo a criterios ESPGAHAN <sup>\*</sup>, de los cuales hubo 17 mujeres y 7 varones, con una edad promedio de 4 años y 5 meses y un rango entre 11 meses y 17 años, que concurren al Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. Los pacientes celíacos se enumeraron del N° 1 al 24. También participaron 5 sujetos sanos, 1 mujer y 4 varones, edad promedio: 7 años 5 meses, rango: 2 – 18 años. Todos consumían dieta con gluten al momento del estudio.

Los 24 pacientes celíacos se sometieron a biopsia de intestino delgado (BD), 16 presentaron atrofia de vellosidades subtotal a total (AST-T), 5 atrofia parcial grado III (APIII), y 3 atrofia parcial grado II (APII). A los pacientes y sujetos controles se les ex-

trajo sangre y se obtuvo el suero que se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo en serología. En el caso de los pacientes celíacos la toma de muestra de sangre se realizó en el mismo tiempo de la toma de muestra de BID, o sea al momento del diagnóstico. Todos los pacientes celíacos presentaron anticuerpos anti-gliadina de tipo Ig G e Ig A y anticuerpos anti-endomisio de tipo Ig A. Ninguno resultó deficiente en Ig A sérica. Los sujetos controles sanos presentaron serología negativa para EC y niveles normales de Ig A sérica.

\* Sociedad Europea de Pediatría, Gastroenterología, Hepatología y Nutrición. Revised criteria for diagnostic of celiac disease. Arch Dis Child 1990; 65:909-911.

#### Purificación de prolaminas

A las harinas de trigo (*Triticum aestivum* sp.) y de avena (*Avena sativa* sp.) se las desgrasó con acetona en relación 1/10 p/v, en baño de hielo con agitación magnética. Se realizaron cinco extracciones de cuarenta minutos cada una, centrifugando después de cada extracción a 13000 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A la harina de trigo desgrasada se le extrajo la fracción albúmina-globulina utilizando una solución de CINA 0.15 M, 10 ml/g, en cuatro tiempos, de una hora cada uno, a temperatura ambiente, centrifugando después de cada paso de extracción a 13000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al precipitado final se le extrajo la fracción gliadina con una solución acuosa de etanol al 70 % v/v (10 mg/ml, 2 hs a temperatura ambiente). Luego se centrifugó a 13000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El extracto etanólico se liofilizó y se conservó en heladera.

A la harina de avena desgrasada, se le extrajo la fracción avenina

con una solución acuosa de etanol al 52% v/v (10 mg/ml, 2 hs a temperatura ambiente), se centrifugó a 3000 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al sobrenadante se lo trató con CINA 1,5 % p/v (2 ml/ml, 3 hs en baño de hielo) y centrifugó a 6000 g por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado recuperado se dializó contra agua destilada por 72 hs y finalmente se liofilizó y conservó en heladera.

#### Separación de prolaminas por electroforesis en EGPA-SDS.

Las fracciones gliadina y avenina fueron sometidas a electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio desnaturizante (EGPA-SDS) de acuerdo al método de Laemmli (1970) con un gradiente de concentración de acrilamida de 10-18%. Se empleó un gel de empaquetamiento de 4% de acrilamida. Las muestras fueron disueltas en solución Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 conteniendo SDS 10% p/v a una concentración final de 10mg/ml. Las mismas se calentaron en baño de agua a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. La electroforesis se realizó en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) con geles de 60x90x0.75 mm por aproximadamente 1 h 30 min, con un voltaje de 120V durante el empaquetamiento y de 160V durante la separación.

Los geles de EGPA-SDS fueron coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) 125 mg%, en ácido acético, metanol, agua (5: 45: 50) y luego decolorados con ácido acético, metanol, agua (7,5: 5: 87,5).

#### Análisis por Immunoblotting de gliadina y avenina separadas por EGPA-SDS

Las fracciones gliadina y avenina separadas por EGPA-SDS se transfirieron a membranas de nitroce-

lulosa de acuerdo al método de Towbin (1979). Las membranas se bloquearon incubándolas con una solución salina de Tris (TBS; 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, [pH 7.4]) y leche en polvo descremada 2% (p/v) durante 12 hs a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lavaron con TBS conteniendo Tween 20 al 0.05% (TBS-T). Luego para el análisis de anticuerpos Ig A e Ig G las membranas se incubaron durante 12 hs a  $4^{\circ}\text{C}$  con el suero de los pacientes y sujetos controles diluido en TBS 1:50 y 1:500 respectivamente. Posteriormente las membranas se lavaron con TBS-T, y se incubaron con inmunoglobulina G de cabra anti-cadena a y anti-cadena  $\gamma$  humanas marcadas con peroxidasa (Dako; diluidas en TBS-T 1:1000 y 1:5000 respectivamente) por 2 hs a temperatura ambiente. Después de tres ciclos de lavado con TBS-T se llevó a cabo la reacción de color usando 4-Cloro naftol (3 mg/ml metanol)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.

## Resultados

### Pacientes

Al momento del diagnóstico los pacientes celíacos revelaron la presencia de anticuerpos Ig G e Ig A anti-gliadina (AGA) y anticuerpos Ig A anti-endomisio (EMA). Los títulos de dichos anticuerpos se correlacionaron en función directa con el grado de lesión de la mucosa intestinal revelado en los estudios de las BID. Así, los títulos de anticuerpos más elevados correspondieron a los pacientes con mayores grados de lesión de la mucosa intestinal, (datos no mostrados).

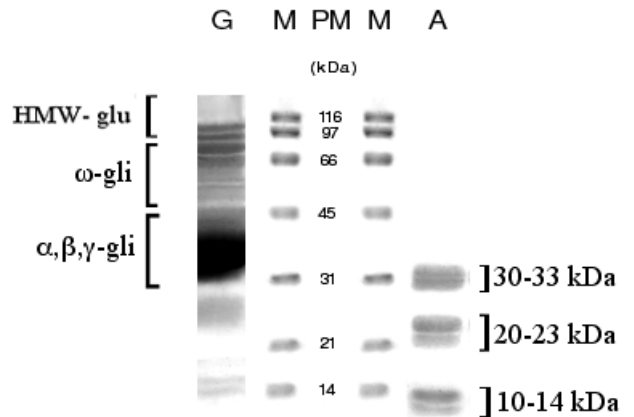
### Purificación de prolaminas

Con el propósito de caracterizar las prolaminas purificadas, y para es-

tudiar posteriormente la respuesta de anticuerpos frente a las mismas por técnicas de inmunoblotting, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (EGPA-SDS). En la figura 1 se puede apreciar el patrón electroforético de las prolaminas purificadas a partir de harina de trigo y avena. Con respecto a la gliadina se observa entre los 29-45 kDa las fracciones de  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  gliadinas, entre 45-65 kDa la fracción  $\omega$  gliadina y a pesos moleculares mayores las gluteninas de alto peso molecular (HMW-gluteninas). En el caso de la avenina se observan bandas de proteínas a la altura de 10-14 kDa, 20-23 kDa y 30-33 kDa.

### Respuesta humoral

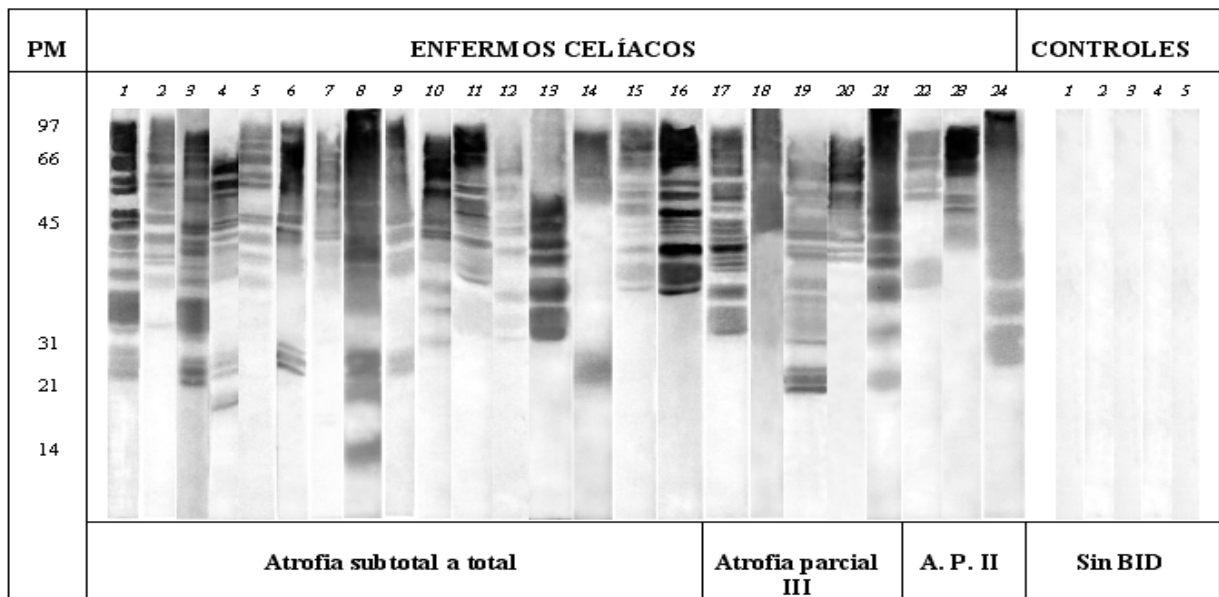
El inmunoblot mostró en la gliadina y la avenina un amplio espectro de reconocimiento de los anticuerpos de los pacientes celíacos tanto de tipo Ig A como de Ig G. Los sujetos controles no evidenciaron reacción alguna con ninguna fracción de prolamina de trigo ni de avena para los dos tipos de anticuerpos estudiados. Esto se puede apreciar en las Figs. 2, 3, 4 y 5, donde además se discriminó a los pacientes por su grado de lesión de la mucosa de intestino delgado. Si bien cuando se evaluaron los títulos de anticuerpos AGA y EMA de los pacientes celíacos en función del grado de lesión de la mucosa del intestino delgado se pudo observar una correlación directa (datos no mostrados); en el caso de los AGA por análisis de inmunoblotting no ocurrió lo mismo, ya que no se pudo apreciar



**Figura 1:** EGPA-SDS 10-18% de Gliadina (G) y Avenina (A)  
PM: peso molecular en kilodaltons. M: marcador de PM.

un patrón característico de reconocimiento en función del grado de lesión. Sin embargo, se destacó un menor reconocimiento de los anticuerpos sobre las diferentes bandas de proteínas de avena en los pacientes celíacos con AP II.

Cuando se analizó el inmunoblot para las prolaminas de trigo se pudo observar que el 100% de los anticuerpos Ig G de los pacientes celíacos reconocieron las fracciones  $\omega$ -gliadina y HWM-gluteninas. De ellos, el 79.16% reconoció además fuertemente las bandas de proteínas en las regiones correspondientes a las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -gliadinas, (pacientes 1-13, 15, 16, 17, 19, 21 y 24), mientras que para el resto fue muy escaso el reconocimiento en dichas regiones, Fig. 2. Cuando se analizó el inmunoblot para los anticuerpos Ig A



**Figura 2:** Reactividad de Acs. Ig G frente a prolaminas de trigo por técnica de inmunoblotting después de la separación por EGPA-SDS (10-18%).

frente a prolaminas de trigo, se pudo apreciar que, a igual que con los anticuerpos Ig G, el 100% de los anticuerpos Ig A reconocieron las  $\omega$ -gliadina y las HWM-gluteninas. De

ellos sólo el 83.33% reconoció además bandas en las regiones de las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -gliadinas (pacientes 1-12, 14, 15, 17-21 y 24), Fig. 3.

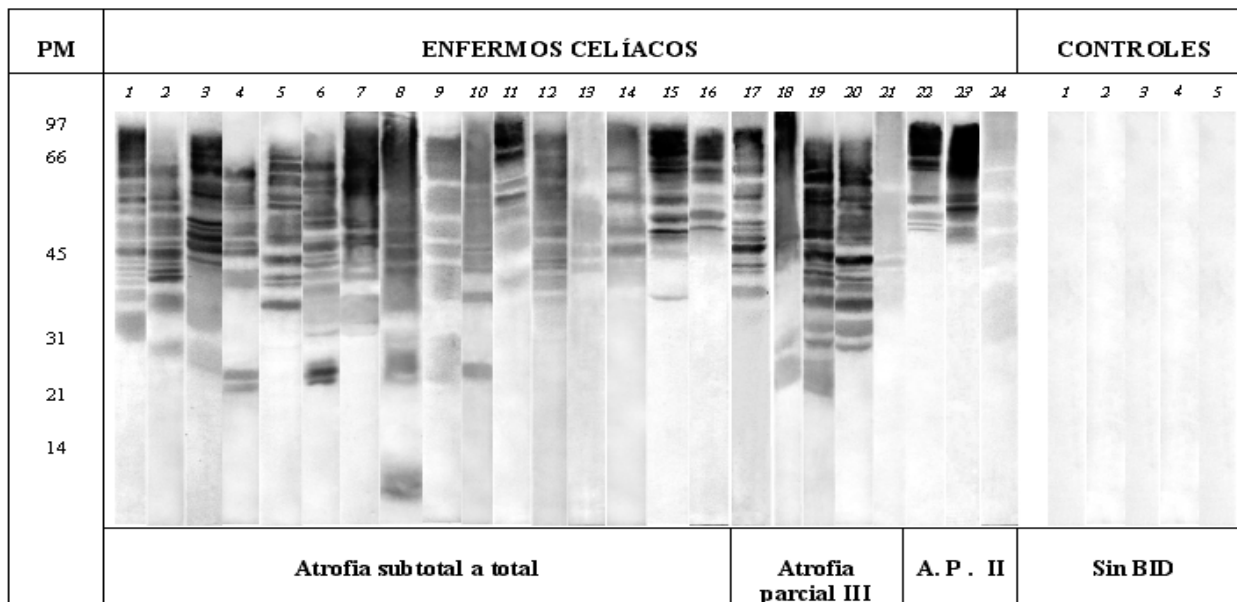


Figura 3: Reactividad de Acs. Ig A frente a prolaminas de trigo por técnica de inmunoblotting después de la separación por EGPA-SDS (10-18%).

En el inmunoblot para las prolaminas de avena se pudo apreciar que los anticuerpos Ig G de los pacientes celíacos tenían especificidad por varias fracciones de avenina, Fig. 4. El 100%

de los anticuerpos Ig G reconocieron bandas de proteína de 21-23 kDa, el 50% las bandas de avenina de 31-33 kDa y el 45,83% las de 10-14 kDa, Fig. 6.

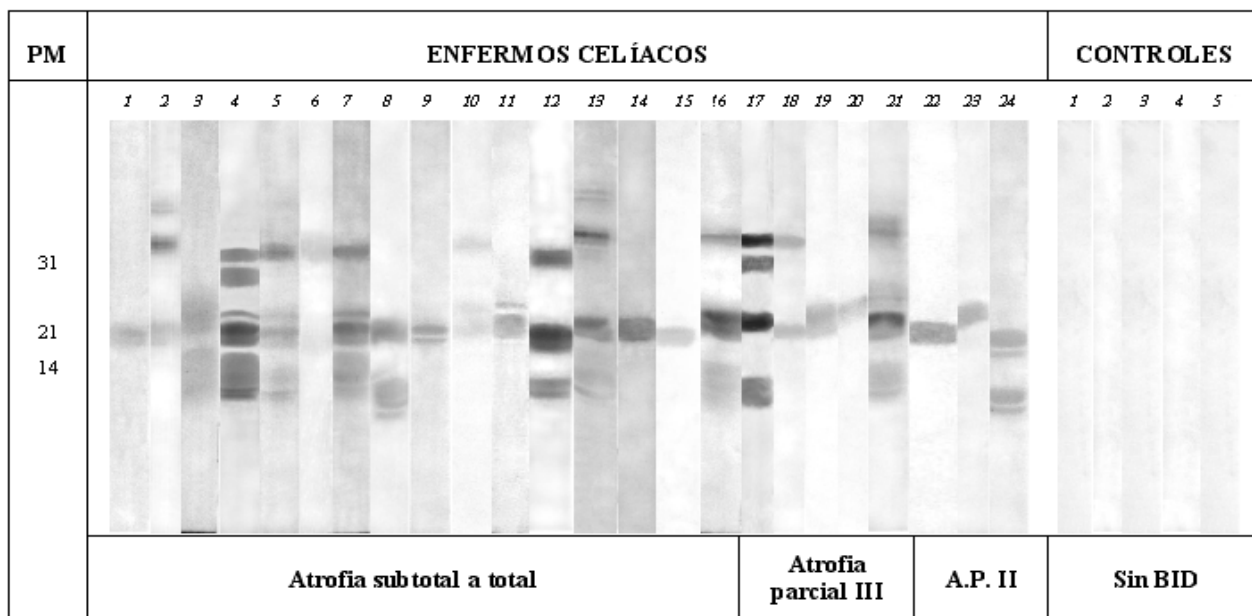


Figura 4: Reactividad de Acs. Ig G frente a prolaminas de avena por técnica de inmunoblotting después de la separación por EGPA-SDS (10-18%).

Cuando se evaluó la reactividad de anticuerpos Ig A de los pacientes celíacos hacia las prolaminas de avena se observó que, a igual que los anticuerpos Ig G, tenían especificidad por varias fracciones de avena, Fig.5. El

91.66% de los anticuerpos Ig A de pacientes celíacos reconocieron las fracciones de avenina de 21-23 kDa, un 70,83% reconoció las fracciones de 31-33 kDa y un 62,50% las correspondientes a 10-14 kDa, Fig. 6.

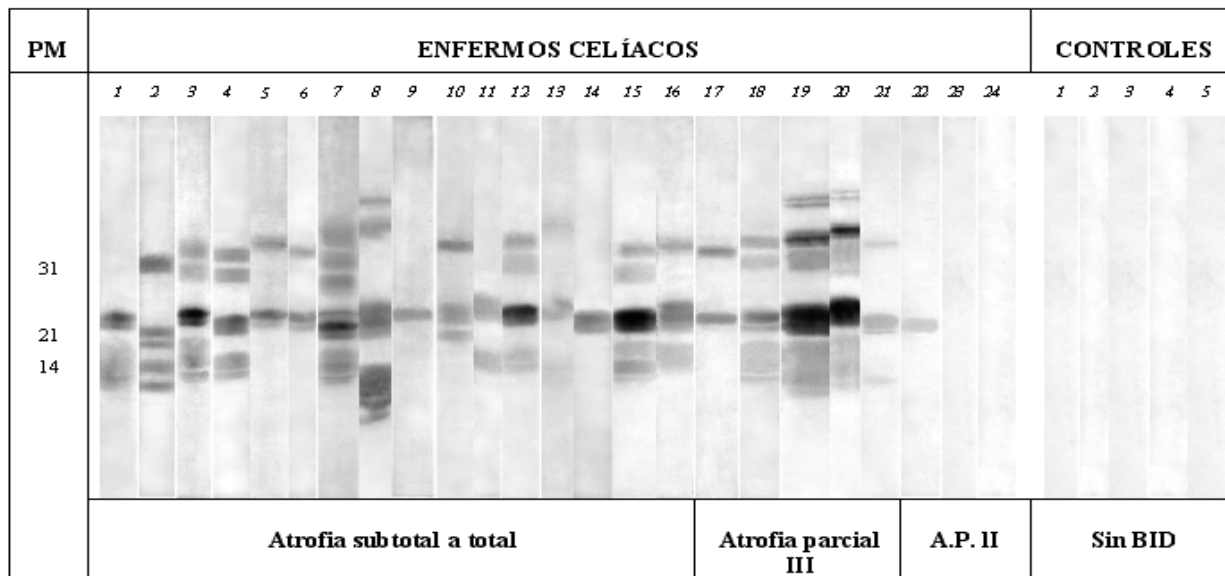


Figura 5: Reactividad de Acs. Ig A frente a prolaminas de avena por técnica de inmunoblotting después de la separación por EGPA-SDS (10-18%).

Cuando se evaluó la reactividad de anticuerpos Ig A de los pacientes celíacos hacia las prolaminas de avena se observó que, a igual que los anticuerpos Ig G, tenían especificidad por varias fracciones de avena, Fig.5. El

91.66% de los anticuerpos Ig A de pacientes celíacos reconocieron las fracciones de avenina de 21-23 kDa, un 70,83% reconoció las fracciones de 31-33 kDa y un 62,50% las correspondientes a 10-14 kDa, Fig. 6.

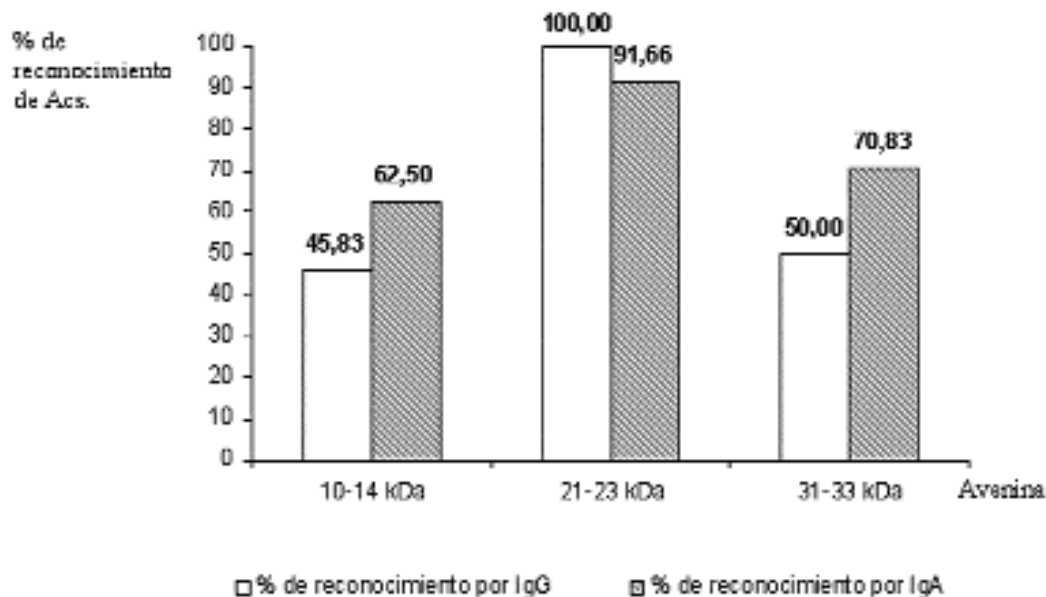


Figura 6: Porcentaje de reconocimiento de los Acs Ig G e Ig A de los pacientes celíacos por fracciones de avenina de diferentes PM.

Si bien los porcentajes de reconocimiento de las fracciones de avenina de diferentes pesos moleculares fueron similares para Ig G y para Ig A (Fig 6), se observó una mayor discriminación de bandas de proteínas en las zonas de diferentes pesos moleculares con los anticuerpos de tipo Ig A, (Figs. 4 y 5).

## Discusión

Con respecto a la respuesta de anticuerpos frente a la prolamina de trigo, los resultados demuestran que las fracciones más reconocidas son las  $\omega$ -gliadinas y las HMW-gluteninas. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Chirido y col.<sup>34</sup> quienes trabajaron con 28 pacientes celíacos, realizando inmunoblot luego de electroforesis en poliacrilamida en medio ácido (EGPA-A), y luego de electroforesis en poliacrilamida-dodecil-sulfato de sodio desnaturizante (EGPA-SDS). En ambos casos encontraron un fuerte reconocimiento de los anticuerpos Ig A de pacientes celíacos por la fracción de  $\omega$ -gliadina. Ellos concluyeron que dicha fracción de prolamina es la más adecuada para ser utilizada en métodos de ELISA para el diagnóstico de EC.

La gran variabilidad que se observa en el reconocimiento de anticuerpos por las diferentes fracciones de gliadina, fue apreciada también en un trabajo de Rumbo y col.<sup>35</sup> Ellos realizaron técnicas de inmunoblotting e investigaron la respuesta de anticuerpos de diferentes fluidos corporales (suero, saliva, calostro y leche) frente a prolaminas de trigo. Encontraron diferencias en el reconocimiento de las distintas fracciones de proteínas del gluten entre los pacientes celíacos, y más importante aún, encontraron diferencias en el reconocimiento de los anticuerpos en los distintos fluidos corporales para los mismos individuos<sup>35</sup>.

En este trabajo, en el inmunoblot de avenina, de la misma manera que en el de gliadina, se demostró especificidad de los anticuerpos Ig G e Ig A de los pacientes celíacos por varias fracciones de dicha prolamina. La fracción de avenina más reconocida por ambos tipos de anticuerpos de los pacientes celíacos fue la de 20-23 kDa. Sólo dos de los pacientes celíacos 23 y 24 no presentaron reacción con anticuerpos Ig A hacia la avenina, este hecho posiblemente sea atribuido al menor grado de lesión de la mucosa de intestino delgado ya que ambos pacientes presentaron atrofia parcial grado II en su resul-

tado de BID.

Vainio y Varjonen<sup>31</sup> evaluaron la respuesta de anticuerpos frente a las prolaminas de trigo, cebada, centeno, avena y maíz por técnicas de inmunoblotting de pacientes celíacos y de pacientes con dermatitis herpetiforme. Luego compararon los resultados con el patrón de tinción producido por anticuerpos monoclonales (Acm) anti-gliadina. Ellos determinaron que tanto los anticuerpos Ig G e Ig A de los sueros de los pacientes como los Acm reaccionaban con las prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena, y reconocían principalmente péptidos de 30-68 kDa. Ningún Acm, a diferencia de los sueros de los pacientes, reconoció péptidos menores a 20 kDa. Ellos atribuyen sus resultados a la reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-gliadina con las prolaminas de cebada, centeno y avena y sugieren que la avena no es segura en la dieta para enfermos celíacos y con dermatitis herpetiforme.

Dado que las prolaminas comprenden una mezcla compleja de proteínas, con características de solubilidad diferentes, el procedimiento de extracción, en particular el solvente elegido, determina la eficiencia de la recuperación de las prolaminas de la muestra y la composición final del extracto. Con respecto al trabajo de Vainio y Varjonen, hay que tener en cuenta que ellos obtienen avenina con etanol 70%, siendo etanol 52% v/v el solvente de elección para su extracción<sup>36</sup> y además, no la purifican de la fracción globulina, que es la fracción proteica más abundante del grano de la avena, correspondiendo ésta al 70-80 %<sup>37,38</sup>. Estos autores obtienen respuesta de anticuerpos de los sueros de los pacientes hacia prolaminas de 30-68 kDa. Se conoce que las prolaminas de avena comprenden un grupo de proteínas de PM desde 10 a 43 kDa<sup>39</sup>, lo que hace suponer que la avenina obtenida por dichos autores se encontraba contaminada con otras proteínas. En este estudio no se encontró respuesta de anticuerpos a la avenina mayores a esos PM.

Es de conocimiento general que los anticuerpos anti-gliadina pueden estar presentes en individuos que no padezcan EC, y su presencia en estos casos es el resultado de la exposición natural al trigo y carecen de valor diagnóstico. Se demostró empleando técnica de inmunoblot la presencia de anticuerpos Ig A frente a proteínas de trigo, cebada, centeno y avena en pacientes con dermatitis atópica y en controles sanos<sup>32</sup>. Si bien los anticuerpos de estos sujetos estaban presentes, reconocían



menos bandas de proteínas y en menor intensidad cuando se comparaban con el patrón de reconocimiento de los anticuerpos de pool de sueros de pacientes celíacos y de pacientes con dermatitis herpetiforme. En este trabajo, a diferencia de aquel, no se obtuvo respuesta alguna hacia gliadina ni avenina en el grupo de sujetos sanos. Es posible que el grupo control haya sido una muestra muy pequeña y que la presencia de anticuerpos anti-gliadina en sujetos sanos pudieran demostrarse con una muestra control más numerosa.

Hay numerosos estudios con anticuerpos monoclonales que avalan la reacción cruzada en la respuesta de anticuerpos en las diferentes prolaminas de los cereales dada la homología en la secuencia de aminoácidos, lo cual fue demostrado estudiando la reactividad de anticuerpos policlonales en conejo<sup>40</sup> y de anticuerpos monoclonales<sup>41</sup>. Las prolaminas de la avena presentan una similitud menos estrecha con las prolaminas del trigo que la cebada y el centeno (pertenecientes a la tribu *Triticeae*) dado que la avena está taxonómicamente más alejada (pertenece a la tribu *Aveneae*) y además porque la composición en aminoácidos es algo diferente (tienen menor contenido de Gln y Pro)<sup>42,43</sup>. Sin embargo, se encontró similitud de avenina con  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -gliadinas, todas ellas presentan péptidos repetitivos ricos en glutamina y regiones no repetitivas. Los trectos de poliglutamina especialmente prominentes en la gliadina, están presentes también en la avenina, aunque son más cortos que en las gliadinas<sup>44</sup>.

Alfonso y col.<sup>45</sup> desarrollaron un test de ELISA con un péptido sintético de avenina para el screening de EC y obtuvieron altos títulos de anticuerpos para la población de pacientes celíacos. Los niveles de anticuerpos disminuían cuando los sueros eran incubados con gliadina. Los autores sugirieron que hay una reactividad cruzada no solo debida a identidad de la secuencia lineal entre gliadina y avenina, sino también a una estructura conformacional común, ya que el péptido sintético de avenina empleado en el ELISA era rico en dominios  $\beta$ -turn. Cabe destacar que las prolaminas de los cereales son proteínas ricas en secuencias repetitivas de los aminoácidos prolina y glutamina, y la estructura  $\beta$ -turn constituye la principal conformación adoptada por dichas secuencias. Estas dan origen a estructuras secundaria  $\beta$ -espiral que se encuentran intercaladas con estructuras  $\alpha$ -hélice en las moléculas de las prolaminas. La estruc-

tura  $\beta$ -turn es predominante en  $\omega$ -gliadinas excepto en una pequeña región N- y C-terminal. También se encuentra en HMW-gluteninas y en menor medida en  $\gamma$ -gliadinas. En estos casos la estructura  $\beta$ -turn está regularmente distribuida. En cambio, en  $\alpha$ - y  $\beta$ -gliadinas, la estructura  $\beta$ -turn está restringida a pocos dominios cercanos al extremo N-terminal, los que son más irregulares y pueden presentar secuencias intercalares con formación  $\alpha$ -hélice, lo que dificulta la formación de  $\beta$ -espiral<sup>46</sup>. Este hecho podría ser la explicación de la alta reactividad de los anticuerpos encontrada en el grupo de pacientes celíacos por las distintas fracciones de avenina y por las fracciones de  $\omega$ -gliadina y HWM-gluteninas principalmente. Posteriormente, Alfonso y col. desarrollaron un ELISA para el diagnóstico de EC con un péptido de avenina, obteniendo alta sensibilidad y especificidad<sup>47</sup>.

Aunque la reactividad cruzada de los anticuerpos por las diferentes prolaminas fue demostrada, Hollen y col.<sup>48</sup> por medio de test de ELISA comprobaron la presencia de anticuerpos anti-avenina en un grupo de niños celíacos. Ellos realizaron un test de adsorción incubando los sueros de los pacientes con gliadina previo al ELISA con avenina, y demostraron que la presencia de anticuerpos anti-avenina no se debía a reacción cruzada entre prolaminas de trigo y avena, sino que eran anticuerpos que reconocían específicamente a la avenina. Los autores proponen dicho método para medir anticuerpos anti-avenina en el seguimiento de pacientes celíacos sometidos a DLG con suplemento de avena.

En este trabajo, con los resultados obtenidos no se puede descartar que la reactividad encontrada para la avenina no sea debida a una reacción cruzada de los anticuerpos anti-gliadina.

Si bien los anticuerpos anti-gliadina no cumplen una función central en la patogénesis de la EC, pueden jugar un rol decisivo en la conducción de los péptidos de gliadina a las células presentadoras de antígenos (CPA) de la mucosa intestinal. Esto puede ocurrir cuando la gliadina se une a los receptores de membrana de la célula B o a los anticuerpos Ig G o Ig A solubles que se asocian a receptores de Fc de las CPA, posibilitando así que la gliadina pueda ser tomada, conducida para su procesamiento intracelular, y presentada por moléculas DQ<sub>2</sub> a las células T. Una vez estimulada la célula T, desencadena la respuesta inmune que provoca la destrucción tisular a nivel intestinal. Es probable que los anticuerpos especí-

ficos o de reacción cruzada que reconocen a la avenina se comporten de la misma manera que los anticuerpos anti-gliadina y puedan estimular a la célula T.

Se le atribuye una menor toxicidad a la avenina con respecto a las prolaminas de trigo, cebada y centeno al hecho de que dicha proteína presenta un menor contenido del aminoácido prolina, y que la posición que éste ocupa junto al residuo glutamina es un determinante crucial para ser un buen sustrato para la tTG<sup>49,50</sup>, lo que hace poco probable que la tTG deamida los péptidos de avenina haciéndolos más inmunogénicos para la célula T. Sin embargo, se comprobó que la respuesta de las células T de los pacientes celíacos es muy heterogénea, mientras que células T de pacientes adultos reconocen pocos péptidos inmunodominantes deamidados por la tTG<sup>51</sup>, en pacientes pediátricos la respuesta está dirigida principalmente hacia péptidos de gliadina y glutenina no deamidados por la tTG<sup>52</sup>, indicando que numerosos péptidos no deamidados pueden ser inmunogénicos para niños con enfermedad celíaca.

## Conclusiones

En este trabajo, en primer lugar, se encontró un amplio espectro de reconocimiento de parte de los anticuerpos Ig G e Ig A de pacientes celíacos hacia todas las fracciones de prolaminas de trigo y avena separadas por EGPA-SDS. Este hecho induce a considerar la gran

diversidad de epitopes presentes en estas proteínas reconocidos por los diferentes anticuerpos.

En segundo lugar, se determinó que las fracciones de proteínas del gluten más reconocidas por los anticuerpos de los pacientes celíacos fueron la HMW-gliutenina y la  $\omega$ -gliadina, mientras que para la avenina fue la fracción de 20-23 kDa.

Se requieren futuros estudios para investigar la homología estructural entre las fracciones de prolaminas más reconocidas de trigo y avena, y comprobar si dichas fracciones proteicas y sus posibles productos deamidados por la tTG son capaces de estimular las células T de los pacientes estudiados

## ■ Financiamiento:

Trabajo financiado por el Laboratorio de Inmunología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba y por el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

## ■ Correspondencia:

**Dra. Teresa Beatriz Talavera**

Jacinto Ríos N° 136, B° General Paz.

(C.P.: 5000), Córdoba, Argentina.

Tel.: 0351-4515314. Fax: 0351-4524818.

e-mail: bqa\_teresatalavera@hotmail.com.

## Bibliografía

1. Marsh MN, Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992;102:330-354.
2. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Reckern E, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
3. Van del Wal I, Kooy Y, Van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Tissue transglutaminase selectively deamidates gliadin peptides and thereby enhances gliadin-specific T cell reactivity. *The Journal of Immunology* 1998;161:1585-1588.
4. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-651.
5. Skeritt JH, Devery JM, Hill As. Gluten intolerance: chemistry, celiac-toxicity, and detection of prolamins in foods. *Cereal Foods World* 1990;35:638-645.
6. Shewry PR., Tatham AS. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 1990;267:1-12.
7. Shewry PR., Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 2002, vol. 53:947-958.
8. Cornell H, Wieser H, Belitz HD. Characterization of the gliadin derived peptides which are biologically active in celiac disease. *Clin Chim Acta* 1992;5:213:37-50.
9. Wieser H. The precipitating factor in celiac disease. *Baillieres Clin*

- Gastroenterol. 1995;9:191-207.
10. De Vincenzi M, Luchetti R, Peruffo AD, Curioni A, Pogna NE, Gasbarrini G. In vitro assessment of acetic acid-soluble proteins (glutenin) in celiac disease. *J Biochem Toxicol* 1996;11:205-210.
  11. Field JM, Shewry PR, Mifflin BJ. The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grains of wheat, rye and barley. *Theor Appl Genet* 1982;62:329-336.
  12. Dicke WK, Weijer HA, van de Kamer JH. Celiac disease. II. The presence in wheat of the factor having a deleterious effect in cases of celiac disease. *Acta paediatr* 1953;42:34-42.
  13. Dissanayake AS, Truelove SC, Whitehead R. Lack of harmful effect of oats on small-intestinal mucosa in celiac disease. *Br Med J* 1974;4:189-91.
  14. Baker PG, Read AE. Oats and barley toxicity in celiac patients. *Postgrad Med J* 1976; 52:264-8.
  15. Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Keppinen TA, ET al. A comparison of diet with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med* 1995; 333:1033-7.
  16. Srinivasan U, Leonard N, Jones E, et al. Absence of oats toxicity in adult celiac disease. *BMJ* 1996;313:1300-1.
  17. Hardman CM, Garioch JJ, Leonard JN, et al. Absence of toxicity of oats in patients with dermatitis herpetiformis. *N Eng J Med* 1997;117:1884-7.
  18. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, et al. Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74:137-40.
  19. Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJK, et al. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002;50:332-335.
  20. Feighery C, Srinivasan U, Carolan J, et al. Oats challenge in vivo does not activate coeliac disease as determined by immunohistological markers. In: Lohiniemi S, Collin P, Mäki M; eds. *Changing features of coeliac disease*. Tampere: The Finnish Coeliac Society, 1998:103-8.
  21. Hoffenberg EJ, Haas JMD, Drescher ARD, et al. A trial of oats in children with newly diagnosed celiac disease. *The Journal of Pediatrics* 2000; 137(3): 361-366.
  22. Hogberg L, Laurin P, Falth-Magnusson K, Grant C, Grodzinsky E, Jansson G, Ascher H, Browaldh L, Hammersjö JA, Lindberg E, Myrdal U, Stenhammar L. Oats to children with newly diagnosed celiac disease: a randomized double blind study. *Gut* 2004;53(5):649-54.
  23. Lundin KEA, Nilsen EM, Scott HG, et al. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 2003;52:1649-1652.
  24. Mac Donald TT, Bajaj Elliott M, Pender SL. T cell orchestrate mucosal shape and integrity. *Immunol Today* 1999; 20:505-510.
  25. Nilsen EM, Scott H, Lundin KEA, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon g in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115: 551-563.
  26. Lundin KEA, Kett K, Scott H, et al. Relation between degree of villous atrophy and IFN-g mRNA in the small intestine of celiac patients. *JPGN*. 2000;31:S15.
  27. Peraaho M, Kaukinen K, Mustalahti K, Vuolteenaho N, Maki M, Laippala P, Collin P. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39(1):27-31.
  28. Leone NA, Mazarella G, Giacci C, et al. Oats prolamines in vitro activate intestinal cell-mediated immunity in coeliac disease. In: Collin P, Mäki M, eds. *All on coeliac disease*. Seventh International Symposium on coeliac disease. Tampere: Lege Artis, 1996:69.
  29. Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, et al. Avenin fails to induce a Th 1 response in coeliac tissue following in vitro culture. *Gut* 2003;52:47-52.
  30. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, et al. Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74:137-140.
  31. Vainio E, Varjonen E. Antibody response against wheat, rye, barley, oats and corn: comparison between gluten-sensitive patients and monoclonal anti-gliadin antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;106:134-138.
  32. Varjonen E, Kalimo K, Savolainen J, Vainio E. IgA and IgG binding components of wheat, rye, barley and oats recognized by immunoblotting analysis with sera from adult dermatitis atopic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 Sep; 111(1):55-63.
  33. Rocher A, Colilla F, Ortiz ML, Mendez E. Identification of the three major immunoreactive proteins and alpha-amylase inhibitor from oat endosperm. *FEBS Lett* 1992 Sep 21;31(1):37-40.
  34. Chirido FG, Rumbo M, Carabajal P, Castagnino N, Mavromatopulos E, Cirincione V, Añón M, Fossati CA. Analysis of anti-gliadin antibodies by immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using gliadin fractions as antigens. *JPGN* 1999;29:171-177.
  35. Rumbo M, Chirido FG, Añón MC, Fossati CA. Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and b lactoglobulin) in human serum, saliva colostrum and milk. *Clin Exp Immunol* 1998;112:453-458.
  36. Kim SI, Charbonnier L, Mossé J. Heterogeneity of avenin, the oat prolamins. Fractionation molecular weight and amino acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1978;537:22-30.
  37. Peterson DM, Smith D. Changes in

- nitrogen and carbohydrate fractions in developing oat groats. *Crop Sci* 1976; 16:67-71.
38. Frey KJ. The relation between alcohol-soluble and total nitrogen contents of oats. *Cereal Chem* 1951;28:506-509.
39. Robert LS, Nozzolillo C, Altosaar J. Molecular weight and charge heterogeneity of prolamins (avenins) from nine oat (*Avena sativa* L) cultivars of different protein content and from developing seeds. *Cereal Chem* 1983;6:438-442.
40. Ferstenstein GN, Hay FC, Shewry PR. Immunochemical relationships of the prolamins storage proteins of barley, wheat, rye and oats. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 912:371-383.
41. Skerritt JH, Underwood PA. Specificity characteristics of monoclonal antibodies to wheat grain storage proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1986;874:245-254.
42. Egorov TA. The amino acid sequence of the fast avenin component. *J. Cereal Sci.* 1988;289-292.
43. Egorov TA, Musolyamov, Kochergin Andersen, Roepstorff. Isolation, characterization by mass spectrometry and partial amino acid sequencing of avenins. *J. Cereal Sci.* 1994;21:107-117.
44. Chesnut RS, Shorwell MA, Boyer SK, Larkins BA. Analysis of avenin proteins and the expression of their mRNAs in developing oat seeds. *The Plant Cell* 1989;1:913-924.
45. Alfonso P, Soto C, Albar JP, Camafeita E, Escobar H, Mendes E, et al. Beta structure motif recognition by anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *FEBS Lett* 1998;427:36-40.
46. Tatham AS, Mifflin BJ and Shewry PR. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationships to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 1985; 62:405-412.
47. Ribes-Koninckx C, Alfonso P, Ortrigosa L, Escobar H, Suarez L, Mendes E, et al. A beta turn rich oats peptide as an antigen in an ELISA method for the screening of celiac disease in a pediatric population. *Eur J Clin Invest* 2000;30:702-8.
48. Hollén E, Högberg L, Strenhammar K, Fålh-Magnusson, Magnusson KE. Antibodies to oat prolamines (avenins) in children with celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:742-746.
49. Fleckenstein B, Molberg O, Qiao S W, Schmid DG, Von der Mühlbe F, Elgstoen K, Jung G, Sollid L M. Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. *J Biol Chem* 2002;277:34109-34116.
50. Vader WL, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* 2002; 195:643-649.
51. Martucci S, Corazza GR, Spreading and focusing of gluten epitopes in celiac disease. *Gastroenterology* 2002;122:2072-2075.
52. Vader W, Kooy Y, van veelen P, de Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Pena S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 2002;122: 1729-1737.

# Valoración de proteínas de fase aguda en pacientes con injuria térmica

## Valoration of acute phase protein in thermal injured patients

Pedano Valeria \*, Demarchi Marcela \*\*

### ■ Resumen

Como consecuencia de las lesiones producidas por quemaduras existe una alteración de la inmunidad específica e inespecífica asociada a una respuesta inflamatoria con liberación de interleuquinas que actúan a nivel hepático generando la síntesis de diversas proteínas que se comportan como reactantes de fase aguda, la respuesta inflamatoria localizada puede generalizarse y agravar la injuria inicial produciendo un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. Con el propósito de evaluar las modificaciones de proteínas de fase aguda en la injuria térmica determinamos la concentración sérica de  $\alpha$ 1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, proteína C reactiva y los componentes C3 y C4 del complemento en 10 pacientes del Instituto del Quemado del Hospital Córdoba con porcentajes de quemadura entre 10% y 40% con profundidad variable (Grupo 1) de los cuales se obtuvo sangre los días 0,2,4 y 7 post injuria comparándolos con un grupo control de 15 hemodadores voluntarios sanos (Grupo 2).

Los estudios estadísticos demostraron que  $\alpha$ 1-antitripsina, ceruloplasmina y haptoglobina presentaron un comportamiento de Proteínas de Fase Aguda reguladas positivamente reflejado en la tendencia a aumentar en el período de observación ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,003$  respectivamente), sin embargo con respecto al grupo control solo el día 7 mostró un aumento significativo ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,0015$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). A diferencia de lo observado la proteína C reactiva estuvo incrementada durante todo el periodo estudiado (día 0  $p < 0,03$ , día 2  $p < 0,004$ , día 4  $p < 0,01$  y día 7  $p < 0,006$ ) con respecto al grupo C.

Por otra parte el componente C3 presentó un aumento los días 4 y 7 comparado con el control ( $p < 0,05$ ) mientras que el C4 refleja un estado de disminución por consumo ( $p < 0,01$ ). Si bien la proteína C reactiva es muy útil para evaluar la respuesta inflamatoria inespecífica en estos pacientes, sería importante considerar el aporte de Haptoglobina y  $\alpha$ 1-antitripsina como consecuencia de la degranulación del polimorfonuclear y evaluar su utilidad como marcador de la activación celular en la prevención del desarrollo del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

### ■ Summary

*As a consequence of the injuries produced by burns, there exists an alteration of the specific and nonspecific immunity. Said alteration is associated to an inflammatory response with release of interleukins which operate at a hepatic level generating a synthesis of diverse proteins that act as acute-phase proteins. The localized inflammatory response can become general and aggravate the initial injury, thus producing a Systemic Inflammatory Response Syndrome. To evaluate the modifications of acute-phase proteins in the burn injury, we have determined the serum concentration of  $\alpha$ 1-antitrypsin, ceruloplasmin, haptoglobin, C-reactive protein, and the C3 and C4 components of the complement in 10 patients from the Instituto del Quemado (Hospital Córdoba) with burn percentages that range from 10% to 40% with a variable depth (group 1) to whom we have extracted blood on the days 0, 2, 4 and 7 post injury, comparing them to a control group made up of 15 healthy volunteer blood givers (group 2).*

*The statistical studies have shown that  $\alpha$ 1-antitrypsin, ceruloplasmin, and haptoglobin behaved as positively regulated acute-phase proteins. This behavior was reflected in their tendency to increase during the observation period ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.003$  respectively) However, in relation to the control group, they only showed a significant increase ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.0015$ ,  $p < 0.05$  respectively) on day 7.*

*Contrary to what we observed, C-reactive protein remained increased during the whole studied period (day 0  $p < 0.03$ , day 2  $p < 0.004$ , day 4  $p < 0.01$  and day 7  $p < 0.006$ ) in relation to group C.*

*The C3 component showed an increase on days 4 and 7 compared to the control group ( $p < 0.05$ ), whereas C4 showed a decrease due to consumption ( $p < 0.01$ ).*

*Although the C-reactive protein is very useful to evaluate the nonspecific inflammatory response in these patients, it would be important to consider the contribution of haptoglobin and  $\alpha$ 1-antitrypsin as a consequence of polymorphonuclear leucocyte degranulation. It would also be important to evaluate the polymorphonuclear leucocyte usefulness as an indicator of the cellular activation in the prevention of the development of the Systemic Inflammatory Response Syndrome.*

#### Para citar este artículo:

Pedano V, Demarchi M. Valoración de proteínas de fase aguda en pacientes con injuria térmica. *Alerg Immunol Clin* 2004;21(3-4):97-103.

\* Bioquímica Área Inmunología Servicio de Bioquímica Hospital Córdoba

\*\* Bioquímica Especialista en Inmunología Área Inmunología Servicio de Bioquímica Hospital Córdoba

#### ■ Palabras Clave:

Injuria térmica,  $\alpha$ 1 antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, C3, C4, Proteína C Reactiva, proteínas de fase aguda.

#### ■ Key Words:

*Burn injury, C-reactive protein,  $\alpha$ 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin, C3, C4, acute-phase protein*

## Introducción

Los eventos que perturban la homeostasis del organismo (daño tisular, infecciones, injuria térmica) representan una agresión para la integridad del mismo induciendo una respuesta local (inflamación aguda) y una respuesta sistémica con modificaciones metabólicas que se denomina respuesta de fase aguda. El resultado de esta respuesta de fase aguda es la eliminación del agente infeccioso, la remoción del tejido dañado y la recuperación del órgano comprometido activando los procesos de reparación tisular<sup>1</sup>.

De esta forma, las lesiones producidas por injuria térmica generan una alteración del sistema inmune la que se asocia con la liberación de múltiples mediadores desencadenantes de la respuesta inflamatoria. Dicha respuesta es inicialmente localizada pero si no se controla puede generalizarse llevando a una destrucción tisular con el consumo de factores que participan en la regulación y en el mantenimiento de la respuesta inmune<sup>2</sup>.

En el caso del traumatismo térmico se observa un aumento plasmático en

los niveles de citoquinas pro inflamatorias responsables de una diversidad de efectos: aumento de la temperatura corporal, reclutamiento de leucocitos, actuando también sobre el metabolismo y la regulación de genes en células hepáticas. Los hepatocitos responden a las citoquinas modificando la síntesis de las proteínas plasmáticas las que se comportan como proteínas de fase aguda (PFA)<sup>3</sup>.

A la acción de IL1 y TNF- $\alpha$  el hígado responde sintetizando PFA tipo I como la proteína C reactiva (PCR) y amiloide sérico mientras que la acción de la IL-6 genera PFA tipo II como la ceruloplasmina (Ce), haptoglobina (Hp) y  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT)<sup>1-3</sup>.

Dentro del amplio espectro de PFA la ceruloplasmina junto a los componentes C3 y C4 del complemento se encuentran dentro del tipo de proteínas que aumentan su concentración hasta un 50% del nivel basal, mientras que la  $\alpha$ 1-antitripsina y la haptoglobina aumentan su concentración de 2 a 4 veces con respecto al nivel basal. A su vez la PCR se comporta como una PFA mayor aumentando su concentración de 100 a 1000 veces<sup>4</sup>.

El aumento de estas PFA depende, sin dudas, del factor desencadenante de la respuesta de FA (en este caso la IT) y de las posibles complicaciones (infecciones).

Nuestro interés fue evaluar el comportamiento de algunos reactantes de fase aguda en pacientes quemados y la elección se basó en la función biológica que estos componentes desempeñan y en el rol que cumplen en la respuesta inflamatoria que se desencadena en este tipo de pacientes.

## Objetivos

Determinar la concentración plas-

mática de haptoglobina, ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-antitripsina y PCR en pacientes con injuria térmica (IT), evaluando las modificaciones que se producen durante el período de observación y su comportamiento como reactantes de fase aguda (RFA).

Determinar la concentración plasmática de los componentes C3 y C4 del complemento y las modificaciones producidas durante el período de observación.

## Materiales y métodos

### Sujetos en estudio

En el presente estudio se incluyeron pacientes con injuria térmica atendidos en el Instituto del Quemado del Hospital Córdoba los cuales fueron comparados con un grupo control.

■ Grupo 1: 10 pacientes (4 hombres y 6 mujeres) con una edad promedio de  $42 \pm 25$  años que presentaron un porcentaje de quemadura entre 10-40% de distinto grado (A, AB y/o B), a los que se les extrajo sangre venosa y/o arterial en ayunas los días 0, 2, 4 y 7 post-injuria.

■ Grupo 2: 15 hemodadores voluntarios sanos que concurren al Servicio de Hemoterapia del Hospital Córdoba a los que se les extrajo sangre venosa en ayunas.

### Cuantificación de los reactantes de fase aguda

En el Grupo 1, la cuantificación de los parámetros a estudiar se determinó los días 0, 2, 4 y 7 post-injuria para obtener la curva de seguimiento mientras que en el Grupo 2 se obtuvo el valor promedio para cada determinación.

La cuantificación de Hp, Ce y  $\alpha$ 1-AT se realizó por IDRS utilizando placas de origen comercial.

Los componentes del comple-

mento (C3 y C4) se dosaron por IDRS (agarosa al 1,5%) en buffer veronal, utilizando antisueros anti C3 y anti C4 diluidos según título y la PCR por inmunoturbidimetría (IT) en un autoanalizador Hitachi 912.

#### Tratamiento estadístico de los datos:

Todas las variables analizadas tuvieron distribución normal. Para realizar la comparación de los valores medios entre grupos se utilizó un ANOVA de una vía y como prueba pos hoc el test de Tuckey y el test de tendencia lineal. Para comparar valores medios entre dos grupos se utilizó el test de Student. Se consideró un resultado estadísticamente significativo con un valor  $p < 0,05$ ; los resultados se expresan como la media  $\pm 1$  desvío estándar.

## Resultados

### Comportamiento de los RFA

Las modificaciones que se producen en los niveles de  $\alpha 1$ -AT en los pacientes con injuria térmica se muestran en la Figura 1. Se observó una tendencia en la concentración de  $\alpha 1$ -AT a aumentar en el tiempo ( $p < 0,001$ ) alcanzando su mayor nivel el día 7 post-injuria.

La concentración en el día 0 estuvo disminuida con respecto al grupo control ( $p < 0,025$ ) y por debajo de los niveles observados en los días posteriores ( $p < 0,0005$ ), mientras que el valor alcanzado el último día de observación (día 7) fue estadísticamente superior al del grupo control ( $p < 0,01$ ).

Para la Hp se repite la misma tendencia de la  $\alpha 1$ -AT ya que las concentraciones aumentaron significativamente a lo largo del período de observación ( $p < 0,0001$ ). Tal como se observa en la Figura 2 se produjo un aumento estadísticamente significativo los días 2, 4 y 7 con respecto al día 0 ( $p < 0,01$ ). Sin embargo al comparar el Grupo 1 con el grupo control el aumento sólo fue estadísticamente significativo el día 7 ( $p < 0,0015$ ).

Por otra parte, los niveles de Ce fueron comparables a los del grupo control los días 0, 2 y 4 del período de observación y sólo en el día 7 post-injuria se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). En la Figura 3 se puede observar una tendencia a aumentar en el tiempo ( $p < 0,003$ ) dada por la diferencia estadísticamente significativa entre los días 0 y 7 del período de observación de los pacientes con injuria térmica ( $p < 0,03$ ).

Como puede observarse, las modificaciones en estos tres reactantes de fase aguda siguieron un patrón similar con niveles normales y/o disminuidos el día 0 incrementando progresivamente en el tiempo hasta aumentar por encima del grupo control al día 7 post-injuria. (Tabla-1)

Los niveles de PCR se encontraron aumentados durante todo el período estudiado con respecto al grupo control (día 0  $p < 0,03$ , día 2  $p < 0,004$ , día 4  $p < 0,01$ , día 7  $p < 0,006$ ) alcanzando su máximo valor el día 2 del período de observación (Figura 4).

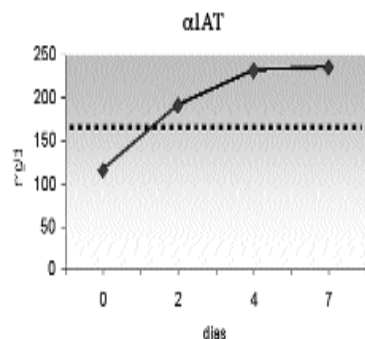
Al comparar las concentraciones de las distintas proteínas estudiadas no se observó correlación entre ninguna de ellas.

### Comportamiento de los componentes del complemento

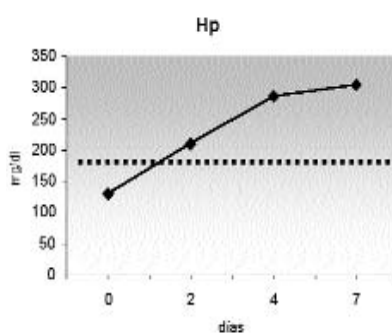
Los niveles de C3 se mostraron aumentados durante todo el período de observación, sin existir diferencias entre los distintos días evaluados.

De esta forma aunque en los niveles de C3 del Grupo 1 no se observó una tendencia significativa a aumentar en el tiempo, las concentraciones de este componente del complemento, tal como se observa en la Figura 5, estu-

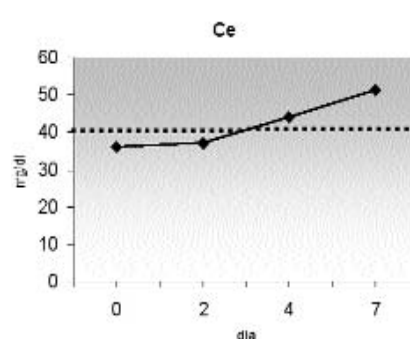
**Figura 1:** Modificación de  $\alpha 1$ AT sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



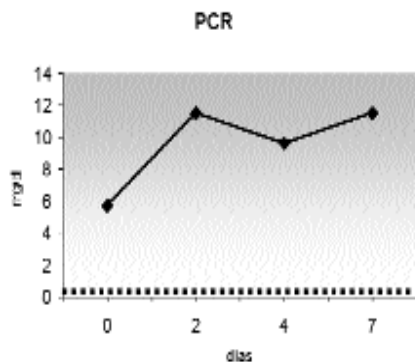
**Figura 2:** Modificación de Hp sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



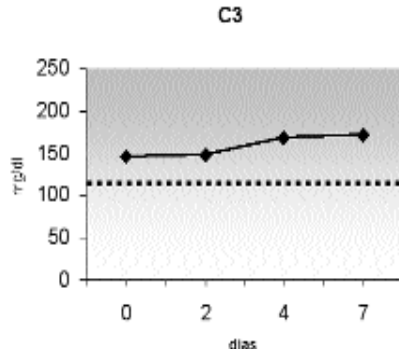
**Figura 3:** Modificación de Ce sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



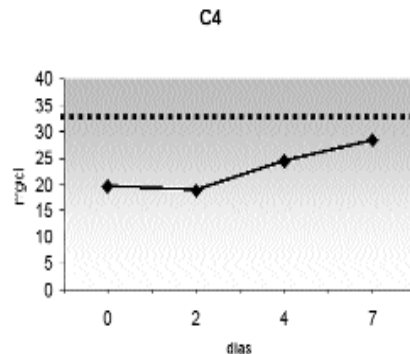
**Figura 4:** Modificación de PCR sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



**Figura 5:** Modificación de C3 sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



**Figura 6:** Modificación de C4 sérica en pacientes con injuria térmica entre los días 0 y 7. La línea de puntos corresponde al valor medio del grupo control.



vieron estadísticamente elevados los días 4 ( $p < 0.05$ ) y 7 ( $p < 0.05$ ) con respecto al Grupo Control (Tabla-1).

Por lo tanto el componente C3 se encontró aumentado aunque no presentó el mismo comportamiento que el resto de PFA estudiadas. Tal vez la respuesta sea más tardía y la tendencia a aumentar se observe prolongando el período de observación.

Por otra parte, los niveles de C4 estuvieron disminuidos con respecto al Grupo control los días 0, 2 y 4 ( $p < 0.01$ ) con una tendencia significativa a aumentar en el tiempo ( $p < 0.001$ ). Como se muestra en la Figura 6, los ni-

veles de C4 alcanzan valores normales al finalizar el período de observación (Tabla-1).

El comportamiento del C4 fue totalmente distinto al del resto de las PFA estudiadas y distinto también al del C3. No se encontró correlación entre los dos componentes del complemento estudiados ni tampoco entre ellos y las PFA.

Aunque los datos estadísticos indican que no existe correlación entre las concentraciones de las proteínas estudiadas, se pudo observar que cuando los niveles de PCR alcanzan su máxima concentración, los niveles

de C4 son los más bajos del período de observación (Figura 7) pudiendo existir algún tipo de relación entre ambas que necesitaría un muestreo mayor para poder corroborar esta hipótesis.

### Discusión

Un gran número de mecanismos homeostáticos que operan bajo circunstancias normales está alterado luego de la injuria o infección de un tejido. Estas alteraciones que constituyen la respuesta de fase aguda son observadas como consecuencia de estímulos inflamatorios que incluyen: infección bacteriana, cirugía u otras causas como la injuria térmica<sup>56</sup>.

El término de fase aguda es utilizado para referirse al aumento de concentración plasmática de proteínas después de un estímulo inflamatorio en vertebrados.

La respuesta es iniciada y coordinada por un gran número de mediadores inflamatorios diversos, que incluyen citoquinas, anafilotoxinas y glucocorticoides<sup>7</sup>. Algunos de estos son liberados inicialmente en el sitio

| Proteínas de fase Aguda mg/dl | Control | Día 0 | Día 2  | Día 4 | Día 7   | p <sup>1</sup> |
|-------------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|----------------|
| 1-A1                          | 166 *   | 115   | 192    | 231   | 234.9 * | $p < 0.01$     |
| Hp                            | 200 *   | 129.4 | 209.4  | 288.9 | 304.9 * | $p < 0.0015$   |
| Ce                            | 40 *    | 36.2  | 31.2   | 44.2  | 51.3 *  | $p < 0.005$    |
| PCR                           | 0.5 *   | 6.1   | 11.5 * | 8.9   | 8.9     | $p < 0.004$    |
| C3                            | 114 *   | 146   | 148    | 167 * | 171 *   | $p < 0.05$     |
| C4                            | 33 *    | 19.4  | 18.7   | 24.3  | 28.3 *  | NS             |

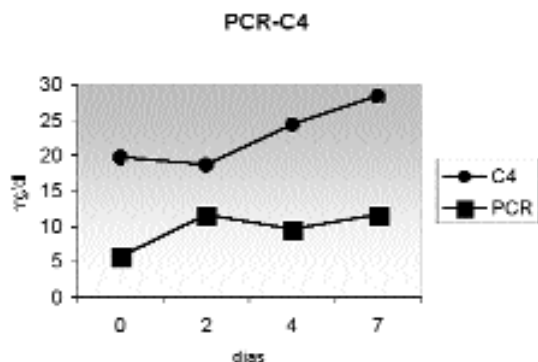
**Tabla 1:** Comparación de los niveles de Hp., Ce.,  $\alpha$ 1-AT, C3, C4 y PCR durante el período de observación.

P\* comparación de los niveles de los reactantes de fase aguda en el día 7 para  $\alpha$ 1-AT, Hp, Ce, C4, del pico máximo de PCR día 2 y de los días 4 y 7 para C3 con el grupo control.

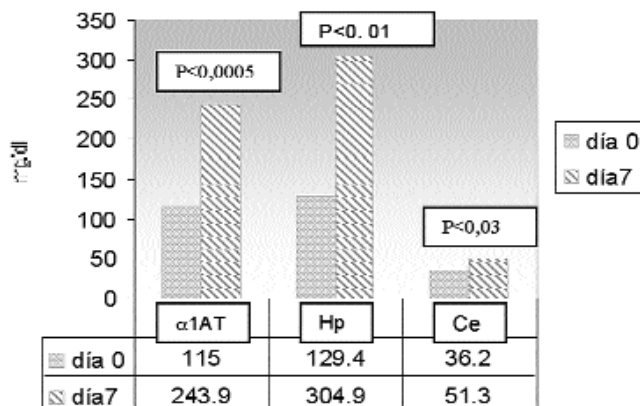
NS: no significativo.



**Figura 7:** Comparación entre las modificaciones de PCR y C4 en el Grupo 1



**Figura 8:** Comparación entre los niveles de  $\alpha$ -1AT, Hp y Ce los días 0 y 7.



de la inflamación por los fagocitos mononucleares activados, linfocitos y PMN y tienen un potente efecto local y sistémico <sup>8</sup>.

Estos cambios producen un aumento en la síntesis y secreción de proteínas por los hepatocitos, las PFA que cumplen diversas funciones biológicas participando activamente en la resolución de la respuesta de fase aguda <sup>8</sup>.

Si bien en general la magnitud de la respuesta está relacionada con la severidad del estado inflamatorio, la cinética en los cambios plasmáticos y la función difiere en los distintos componentes de fase aguda <sup>9</sup>.

Los inhibidores de proteasas, como la  $\alpha$ 1AT; neutralizan la hidrólisis lisosomal proveniente de macrófagos y neutrófilos activados, que liberan su contenido granular de enzimas proteolíticas, esta función podría explicar el aumento en los niveles de  $\alpha$ 1AT que observamos en nuestros pacientes, ya que este tipo de células se encuentran positivamente activadas en los pacientes con injuria térmica <sup>10</sup>.

Los cambios fisiológicos que se producen tras una injuria térmica forman el escenario clínico del paciente quemado donde la activación del poli-

morfonuclear neutrófilo también lleva a una inflamación sistémica que se perpetúa en el tiempo ocasionando el Síndrome de respuesta inflamatorio sistémico (SIRIS) que suele desencadenarse frecuentemente en aquellos pacientes cuyos porcentajes de quemadura supera el 40% <sup>11</sup>.

La causa fundamental de esta respuesta inflamatoria exacerbada es debido a una prolongación de vida media del PMN que sufre una inhibición de los mecanismos apoptóticos <sup>12</sup>, mecanismo fundamental encargado de la resolución de la respuesta inflamatoria <sup>13</sup> seguidamente este retardo en la apoptosis prolonga la supervivencia del neutrófilo activado lo que media un daño tisular a través de los productos de degranulación, oxidantes y enzimas proteolíticas <sup>14</sup>.

Las otras proteínas involucradas, ceruloplasmina y haptoglobina pueden modificarse para regular la presencia de iones metálicos libres (Fe y Cu) minimizando de esta forma la captación por parte de hongos y bacterias potencialmente patógenos <sup>10</sup>. Según nuestras observaciones, en los pacientes con injuria térmica la respuesta ligeramente aumentada en los niveles de ceruloplasmina y más marcada en los de Hp

se hacen más evidentes al séptimo día de seguimiento, posiblemente la exposición a agentes microbianos con la colonización de las lesiones favorecería el aumento de estas PFA.

Si bien la función biológica más importante de la Hp es la de transportar hemoglobina libre previniendo la pérdida de hierro y el daño renal durante la hemólisis, existen estudios que demuestran la actividad angiogénica de la Hp y niveles séricos persistentemente elevados en la zona inflamada pueden ser importantes en la angiogénesis compensatoria <sup>15</sup>. En la injuria térmica la actividad angiogénica de la Hp podría ser importante promoviendo la reparación tisular.

Por otra parte, el aumento de haptoglobina podría ser un reflejo de la liberación del contenido granular como consecuencia de la activación de PMN, ya que la haptoglobina, el TNF- $\alpha$  y el neutrófilo forman parte de un importante ensamblaje interactivo que participa en los procesos inflamatorios.

El TNF- $\alpha$  presenta niveles plasmáticos incrementados luego de un estímulo inflamatorio, este es capaz de interactuar con el PMN al unirse específicamente a sus receptores ubicados

sobre la superficie celular. Se ha observado que la interacción con el receptor de TNF 75 (p75 TNFR) genera una liberación de haptoglobina por parte de los polimorfonucleares. La haptoglobina es transportada y almacenada en el compartimiento granular citoplasmático del neutrófilo<sup>16</sup> y es exocitada luego de su activación, sugiriendo que la concentración de haptoglobina puede estar localmente incrementada en el sitio inflamatorio y modular la actividad del granulocito. Cuando la respuesta inflamatoria se convierte en un SIRIS este incremento local podría traducirse en un aumento en la concentración sérica de haptoglobina<sup>17</sup>.

La PCR es una proteína de fase aguda mayor, ampliamente utilizada tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de procesos inflamatorios agudos. Ha demostrado ser de gran utilidad en la IT dado el gran incremento que se produce en este tipo de pacientes y fundamentalmente en aquellos que sufren sepsis como una de las complicaciones más frecuentemente observadas<sup>18</sup>.

Al estudiar la cinética de los cambios séricos de PCR en nuestros pacientes, se observó un pico de aumento máximo al día 2 (post-lesión), lo que coincide con el comportamiento observado en pacientes con IT en la cinética de la IL-6, una de las principales citoquinas involucradas en la estimulación hepática para la síntesis de PCR.

Desde el punto de vista bioquímico, la PCR se une a moléculas que contienen fosfatidil colina (lipoproteínas plasmáticas, fosfolípidos de membrana, productos bacterianos y PAF). Además de unirse, la PCR opsoniza las moléculas y facilita la fagocitosis ya sea directamente o posterior a la

activación de la vía clásica del complemento<sup>19,20</sup>. Esto explicaría la posible relación existente entre PCR y C4 ya que cuando los niveles de PCR alcanzan su máxima concentración, los niveles de C4 son los más bajos del período de observación como consecuencia de la activación de la vía clásica del complemento, para poder corroborar esta hipótesis se necesitaría un muestreo mayor.

Los factores del complemento son importantes en la opsonización y en la promoción de la fagocitosis a través de receptores específicos ubicados en la superficie de diversos tipos celulares, colaborando en la eliminación de detritus extraños y en el reclutamiento de células inflamatorias a la zona afectada<sup>10</sup>. Si bien esto explica en parte la disminución en los niveles de C4 por la participación en los mecanismos de opsonización, no ocurre lo mismo con el C3 que se encuentra aumentado con respecto al grupo control. En este caso el aumento observado en el componente C3 del complemento se podría deber al comportamiento de PFA.

De esta forma,  $\alpha$ 1AT, Hp, Ce y C3 mostraron un comportamiento de proteínas de fase aguda reguladas positivamente lo que se reflejó en la tendencia a aumentar en el período de observación, sin embargo con respecto al grupo control, sólo el día 7 mostró un aumento estadísticamente significativo.

Por otra parte, los niveles de PCR estuvieron aumentados durante todo el período observado (día 0, 2,4 y 7) con respecto al grupo control confirmando resultados anteriores<sup>18</sup>.

Sin embargo, la variación en la concentración de los otros reactantes de fase aguda abren un nuevo campo

de investigación para encontrar correlaciones entre el estado y evolución del paciente con la variación de los niveles plasmáticos.

Además la determinación bioquímica de haptoglobina y  $\alpha$ 1AT podrían estar reflejando no solo una respuesta de fase aguda que lleva a un incremento de la concentración por síntesis hepática, si no también una activación del PMN; la cual es necesaria que sea controlada ya que es la principal causa que desencadena el SIRIS y el síndrome de distress respiratorio agudo del adulto (SIDRA) y que puede llevar a la muerte del paciente.

La magnitud en el incremento de los niveles plasmáticos de estas proteínas producidas por los PMN aun no ha sido establecida, pero probablemente frente a una injuria térmica mayor, en la cual el paciente presenta en los primeros días una neutrofilia y una hiperactivación del PMN, determinar esta relación sería de gran utilidad para evaluar el pronóstico y el tratamiento de la respuesta inflamatoria en el paciente.

## Conclusiones

- $\alpha$ -1antitripsina, haptoglobina y ceruloplasmina se comportaron como proteínas de fase aguda reguladas positivamente, con tendencia a aumentar en el tiempo, y sólo en el día 7 se observó un aumento significativo comparado con el grupo control.

- Los niveles del componente C3 del complemento reflejan un comportamiento del mismo como proteína de fase aguda, mientras que los niveles de C4 muestran una disminución por consumo.

- El origen de  $\alpha$ -1antitripsina y de haptoglobina no es solamente hepático, también se encuentran presentes

en los gránulos citoplasmáticos de los PMN, células que participan activamente en la respuesta inflamatoria del paciente con injuria térmica.

■ Sería de gran importancia evaluar el aumento de haptoglobina y  $\alpha$ -1antitripsina como consecuencia de la activación del neutrófilo y la contribución en la prevención del SIRIS en pacientes con injuria térmica.

#### ■ Agradecimientos

Agradecemos a la Dra Gladys Dotto y del Dr Diego Nicolossi por su valiosa colaboración y a la Dra Silvia Barzón por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

#### ■ Correspondencia

Bioq. Valeria Pedano  
Justo José de Urquiza N° 1972  
Barrio Alta Córdoba.  
(C.P.:5001) Córdoba, Argentina.  
TEL/Fax: (0351) 4717793  
e-mail: biovalped@hotmail.com

#### Bibliografía

- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol. Today* 1994; 15: 74-80.
- Gabay C, Kushner I. Mechanisms of disease: Acute-Phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N.Engl.J.Med.* 1999;340: 448-454.
- Steel D, Whitehead A. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* 1994;15:81-88.
- Kushner I. The acute phase response: an overview, *Methods in enzymology* 1988,163:373-383.
- Suffredini A, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim J and O'Grady N. New insights into the biology of the acute phase response. *J. Clin. Immunol.* 1999;19:203-214.
- Barret D, Herndon D. Modulation of inflammatory and catabolic responses in severely burned children by early burn wound excision in the first 24 hours. *Arch surg* 2003,138:127-132.
- De Bandt JP, Challet-Martin S, Hernuann A, Lioret N, Di Roure L, Linn S, Vaubourdolle M, Guechot J, Saizz R, Giboudeau J, Cynober L. *J of Trauma* 1994,36:624-628.
- Burger D, Dayer J.M. Cytokines, acute-phase proteins and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2002,966:464-473.
- Daniels J, Larson D, Abston S, Ritzmann S. Serum protein profiles in thermal burns. I. Serum electrophoretic patterns, immunoglobulins and transport proteins. *J of Trauma* 1974,14:137-152.
- Introna M. La risposta di fase acuta: diagnóstica e biológica. *Immunología e inmunopatología.* 1996;1:18-24.
- Carlos E. De los santos. Guía Básica para el tratamiento del paciente quemado. Libros electrónicos.net. Actualización sep.2003 Capítulo 3.
- Dhanajay Chitnis, Camille Dickerson, Andrew M. Musnster, Richard A. Winchurch. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 56:835-839.
- John Sovill. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 1997, 61:375-380.
- Zhihoung Hu, Mohamed M. Sayeed. Suppression of mitochondria dependent neutrophil apoptosis with thermal injury. 2004, 286(1): 170-8 *Am. J. Physiol; Cell Physiol*
- Cid M, Grant D, Hoffman G, Averbach R, Fauci A, Kleinman H. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* 91: 977-985.
- Nadia Berkova, Cardine Gilbert, Serge Goupil, Ju Yan, Vyatches Lau Korabko, Paul H. Naccache. TNF-Induced Haptoglobin Release from Human Neutrophils: pivot Role of TNFp55 Receptor. *J. Immunol.* 1999,162:6226-6232.
- Michel R. Langlais and Jaris R. Delanghe. Biological and Clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin.Chem.* 1996,42(10):1589-1600.
- Demarchi M, Lauria MJ, Salcedo R. Modificaciones del Fibrinógeno, PCR y Albúmina durante la evolución de un grupo de pacientes quemados. *Presencia Bioquímica* (1996),14:7-14.
- Du Clos T. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000,32:274-278.
- Hack C, Wolbenk G, Schalkwijk C, Speijer H, Hermens W and Van den Bosch H. A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol. Today* 1997;18:111-115.

Comentarios Bibliográficos es un espacio dedicado a difundir recientes Publicaciones Científicas. Cada comentarista selecciona un artículo de su interés haciendo un resumen del mismo y destacando luego su importancia.

Comenta: *Dra. Graciela Gonzalez de Niro*

Médica Especialista en Alergia e Inmunología  
Servicio de Alergia e Inmunología - Hospital Aeronáutico Córdoba  
e-mail: graniro@hotmail.com

## The food anaphylaxis vigilance network in france

### *Red de vigilancia en anafilaxia alimentaria en francia*

D.A.Moneret-Vautrin, G.Kanny, M.Morisset, L.Parisot  
ACI International 2003; 15:155-159

#### Resumen

En los últimos 30 años se ha registrado un incremento constante de las enfermedades alérgicas en general, con una importante prevalencia en alergia alimentaria. Formas severas, tales como shock anafiláctico, angioedema laríngeo y crisis agudas asmáticas han aumentado considerablemente. Datos del CIC-BAA (Circle for Clinical and Biological Investigations of Food Allergies) demuestran que la prevalencia relativa de formas severas de alergia se incrementa con la edad, por lo que no es exagerado pensar que la alergia alimentaria constituye actualmente un problema de Salud Pública.

Numerosos factores favorecen esta situación, tales como: la ingesta de medicamentos (betabloqueantes, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la conversión enzimática, etc.) cuyo consumo aumenta con la edad, el tabaco y nuevas tecnologías utilizadas en la industria alimentaria. El almacenamiento por tiempo prolongado de granos y frutas, la radiación con óxido de etileno, el uso de insecticidas y productos químicos antibacterianos, como el ácido salicí-

cílico, en el cultivo de vegetales, inducen el riesgo de nuevos alérgenos. Sumado a estos factores existen nuevos alimentos a partir del consumo de proteínas exóticas, que previamente no eran consumidas socialmente (ej. carne de canguro) o proteínas solo utilizadas antes como alimento de animales (ej. algunas leguminosas). Diversos estudios han demostrado sensibilidad cruzada entre estos alimentos y los consumidos convencionalmente

La falta de datos sobre la incidencia de formas severas de alergia alimentaria, impide además determinar el costo económico que ello implica.

Existe consenso internacional acerca de que todo aquello que signifique un riesgo para la salud a partir del medio ambiente debe ser examinado, controlado y evitado. Surge así la necesidad de una vigilancia para los alimentos, de manera similar a lo que ocurre con la vigilancia farmacológica, debiendo monitorear los factores de riesgo en los alimentos de consumo.

Ante el requerimiento de un flujo rápido y continuo de información acerca de los riesgos de nuevos alimentos y la frecuencia de manifestaciones clínicas

severas, se crea en el año 2001, en Francia, una Red de Vigilancia Alergológica. Su objetivo es recolectar datos sobre casos severos de anafilaxia, crear una base de datos para estudios prospectivos multicéntricos y monitorear los riesgos alergológicos de nuevos alimentos.

En su inicio el Comité contó con 260 miembros, de los cuales 232 eran franceses, de diversas especialidades: 64.6% alergistas, 13.5% alergistas pediátricos, 10.7% neumonólogos, 4.2% dermatólogos, 2.7% internistas y 4.3% de otras especialidades.

Los resultados no se hicieron esperar y al año siguiente fueron reportados 107 casos (33 niños y 74 adultos) de los cuales:

59.8% fueron shock anafiláctico (uno letal, al maní)

18.7% reacción sistémica

15.9% angioedema laríngeo

5.6% asma aguda severa (uno letal, a la soja)

La hospitalización fue necesaria en el 69% y el 31% requirió terapia intensiva.

La adrenalina fue utilizada solamente en el 59%.

Los alérgenos más frecuentemente res-

ponsables fueron el maní, las nueces, los mariscos, las frutas que dan reacción cruzada con el látex, la harina de altramuz, el trigo, el apio y los caracoles

Aunque esta patología es 3.6 veces más frecuente en niños, este reporte confirmó la preponderancia de formas severas en adultos.

Los dos casos fatales, fueron uno por shock anafiláctico en un joven de 21 años alérgico al maní y el otro en un niño alérgico a la soja por crisis asmática severa después de la ingesta de un bombón de chocolate. En ambas situaciones el riesgo alérgico fue subvalorado dado que los pacientes no habían sido examinados por un especialista a pesar de haber tenido previamente reacciones alérgicas. Además el hecho de que la epinefrina sólo fue utilizada en el 59% de los casos confirma la observación de varios au-

tores de que la gravedad de la anfilaxia es frecuentemente subestimada.

La incidencia de los alergenos causales muestra que en Francia, como en Estados Unidos e Inglaterra, el maní y las nueces son los principales responsables de estas reacciones, especialmente entre los niños.

Más del 13% de los accidentes severos son originados por alergenos ocultos, como por ejemplo la pasta de maní en alimentos denominados almendrados, avellana en chocolates mal rotulados o la harina de altramuz en chocolate en polvo.

Las leguminosas son particularmente peligrosas ya que frecuentemente son utilizadas en una amplia variedad de productos alimentarios (como salchichas o productos de panadería). Estos ingredientes no son declarados habitualmente en

las etiquetas.

Se pone por lo tanto de manifiesto la necesidad de un trabajo conjunto y comunicación fluida entre los miembros de la Red de Vigilancia de Alergia Alimentaria y las entidades controladoras de la industria alimenticia, a fin de alertar sobre el riesgo de sensibilizaciones cruzadas.

En la actualidad los alimentos son objetos de extraordinarias y permanentes transformaciones. Las proteínas alimentarias son potentes alergenos sobre las que actúan las modernas tecnologías industriales, pudiendo expandir a una proporción cada vez mayor de la población el peligro de reacciones alérgicas. Una política de vigilancia de alergia alimentaria resulta de suma importancia para la protección de la comunidad.

## Comentarios

La alergia alimentaria es un problema al que frecuentemente se enfrenta el médico alergólogo en la práctica cotidiana a la hora de buscar causas y diferenciar manifestaciones clínicas para poder realizar un diagnóstico y tratamiento efectivo.

Es indudable que el avance en la ingeniería genética ha resultado en importantes mejoras para la producción agrícola y ha impactado rápidamente en la industria alimenticia, pero también ha modificado la alergenidad de los alimentos.

La región geográfica tiene una estrecha relación entre el consumo de alimentos y las posibles reacciones anafilácticas. Así por ejemplo el maní y la soja son las principales legumbres responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas en EEUU y Reino Unido; en

España lo constituye las lentejas, lo mismo que en China, India, Pakistán y África donde las legumbres son la base de la alimentación. El maní, la soja, las nueces y la leche de vaca son a menudo las causas más frecuentes de reacciones alérgicas severas entre adolescentes y adultos jóvenes. La prevalencia de la alergia alimentaria en general y a cada uno de los alimentos varía con los hábitos dietéticos, lo que condiciona una distribución heterogénea en los distintos países y en diferentes períodos de la vida.

Los alimentos con alergenos ocultos, es decir aquellos presentes en un determinado producto alimenticio, que se presenta en forma desapercibida al consumidor representan un riesgo particular. García Figueroa enumera varias posibilidades causales como:

1. La contaminación industrial voluntaria (adulteración) o involuntaria (deficiencias en la limpieza)

2. La contaminación en los puntos de venta (por ej. máquinas de cortar fiambres)

3. Los fabricantes de un alimento determinado pueden modificar la receta, ya sea en cuanto a los ingredientes o al método de producción.

4. Otra fuente potencial son los alimentos transgénicos, en los que el/los genes transferidos pueden codificar para la expresión de alergenos de la especie donante.

5. El deficiente etiquetado posibilita también la presencia de alergenos ocultos.

6. Otro problema deriva de la correcta interpretación del etiquetado, especialmente la designación de ciertos aditivos (conservantes, espesantes, gelificantes, etc.)

Sin embargo algunos autores consideran que el principal factor de riesgo en las reacciones anafilácticas fatales lo consti-

tuye el hecho de que las víctimas, en su mayoría asmáticos, no saben aplicarse adrenalina; proponiendo un trabajo de concienciación en escuelas y lugares públicos.

Es innegable, que en alergia alimentaria, como en otros muchas patologías, nos llega abundante información de países desarrollados que poseen muchas veces aspectos culturales y dietéticos diferentes

a los nuestros. Resulta de vital importancia que comencemos a trabajar a los fines de poder poseer datos epidemiológicos propios, conocer nuestras propias poblaciones de riesgo, la incidencia de alimentos desencadenantes de reacciones severas en nuestro medio, las principales modalidades clínicas de presentación y nuestra realidad en educación sanitaria. Se hace necesaria la creación de un Comité de

Alergia Alimentaria a partir de Sociedades Científicas, con la participación de profesionales de la salud de diferentes especialidades afines, a nivel provincial y nacional, ya que redundará en un avance significativo a la hora de poder adoptar medidas de prevención primaria de la salud y mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes y sus familias.

## Bibliografía

- |   |   |  |
|---|---|--|
| <p>1. Wuthrich B -Lethal or life-Threatening Food Anaphylaxis - Notes From the "ILay Press" -ACI International 2003;15:175-180</p> <p>2. Garcia Figueroa B.E - Manejo del</p> | <p>Paciente con Alergia Alimentaria: Alimentos en productos manufacturados- Rev Esp Alergol Inmunol Clin -2001; 16:249-253</p> <p>3. Sampson Hugh A. - Update on food</p> | <p>allergy - J.Allergy Clin.Immunol. - 2004;113:805-819</p> <p>4. Gideon Lack -New development in food allergy: Old questions remain - J. Allergy Clin Immunol -2004;114:127-130</p> |
|---|---|--|

## SAIC INFORMA

### ALERGIA e INMUNOLOGÍA CLÍNICA

## Socios

Durante el segundo ejercicio de la AAAIC, además de los socios Honorarios, Titulares, y Adherentes ya existentes, se incorporaron los doctores que a continuación mencionamos y a los cuales les damos una muy cordial bienvenida:

### NUEVOS SOCIOS

#### ■ SOCIOS HONORARIOS

La Comisión Directiva, reunida en sesión del 26 de octubre de 2004, decidió nombrar nuevos socios honorarios por su trayectoria de 25 años de participación activa en la AAAIC a los doctores: Barrionuevo Gladi P. de; Giraudo Luis Alberto; Vucovich Pedro Ricardo; Setto Ricardo y Wolff Enrique Gustavo.

#### ■ SOCIO TITULAR

Dra. Graciela de Niro – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión el día martes 03 de agosto de 2004.

Dr. Denis Charles – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión el día martes 03 de Agosto de 2004

#### ■ SOCIO ADHERENTE

Dra. Jéssica Olguín González – solicitud aceptada por Comisión

Directiva en sesión del día martes 02 de marzo de 2004.

Dra. Adriana Paola Raffaelli – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 30 de marzo de 2004.

Dr. Adrián Mario Kahn – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 01 de Junio de 2004.

Dr. Rodrigo Abarca Zorzi – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 06 de julio de 2004.

Dr. Juan Sebastián Croce – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 03 de agosto de 2004.

Dra. Clara Noemí Cuevas – solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 03 de agosto de 2004.

Dra. Natalia Díaz Carreras - solicitud aceptada por Comisión Directiva en sesión del día martes 03 de agosto de 2004.

### SOCIOS DADOS DE BAJA

Dra. Verónica Acosta – la Comisión Directiva aceptó su solicitud de baja en sesión del día martes 02 de marzo de 2004.

Dr. Roberto Garneró – la Comisión Directiva aceptó su solicitud de baja en sesión del día martes 02 de marzo de 2004.

Dra. Ángela Zdanienia – la Comisión Directiva aceptó su solicitud de baja en sesión del día martes 03 de agosto de 2004.

## Reuniones Científicas Ordinarias 2004

### ■ PRIMERA REUNIÓN

Martes 09 de marzo de 2004 / Círculo Médico de Cba.

Comité de Urticaria Crónica en niños y adultos: **PAUTAS PARA DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.**

Dr. Jorge Álvarez, Dra. Susana de Barayazarra, Dr. Alberto Bonfiglioli, Dra. Marta Cavallo, Dra. Laura Sasía, Dr. Emilio Garip.

### ■ SEGUNDA REUNIÓN

Martes 13 de abril de 2004 / Círculo Médico de Cba

Comité de Alergia a Insectos: **PAUTAS PARA DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.**

Dr. Juan Carlos Copioli, Dra. Dora Felipof de Arab, Dr. Rodrigo Abarca, Dra. Beatriz Amuchástegui, Dra. Susana de Barayazarra, Dra. María del Carmen Imwinkelried, Dra. Mariana Malik de Tchara, Dra. Jessica Olguín González.

### ■ TERCERA REUNIÓN

Martes 11 de mayo de 2004 / Círculo Médico de Cba.

Comité de Alergia a Drogas: **PAUTAS PARA DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.**

Dr. Pedro Vucovich, Dr. Fernando Gambarte, Dr. Denis Charles.

### ■ CUARTA REUNIÓN

Martes 08 de Junio de 2004 / Círculo Médico de Cba.

"Inmunodeficiencias" Teórico Práctico con presentación de casos

Dr. Julio Orellana y Dr. Emilio Garip.

### ■ QUINTA REUNIÓN

Martes 13 de Julio de 2004 / Círculo Médico de Cba.

"Reacciones Alérgicas durante el Acto Quirúrgico"

Dra. Miriam Bornancini

CHARLA INFORMATIVA: "Situación de los profesionales, frente al **MONOTRIBUTO**, a partir de la **NUEVA LEGISLACIÓN**" a cargo de la Contadora de la AAAIC, Sra. Gabriela Gimenez.

### ■ SEXTA REUNIÓN

Martes 10 de Agosto de 2004 / Círculo Médico de Cba.

"Contribución del Psicólogo a la Consulta Médica"

Dr. Teodoro Elías Isaac

### ■ SÉPTIMA REUNIÓN

Martes 14 de septiembre de 2004 / Círculo Médico de Cba.

Presentación de trabajos de alumnos del Curso Trienal de Posgrado para la Formación de Especialistas en Alergia e Inmunología.

Coordinador: Dr. Jorge S. Álvarez

"Impacto del asma en la edad pediátrica en la calidad de vida del niño"

Dra. Marta L. Sancho; "Dermatitis de contacto. Realización de antígenos no comerciales para demostrar sensibilidad a metales" Dra. Mariana Malik de Tchara; "Estudio de sensibilidad a antígeno de orina de rata en pacientes riniticos y/o asmáticos alérgicos de la ciudad de San Salvador de Jujuy" Dra. Margarita G. Alfaro.-

Invitado especial: Dr. Ricardo Bartolomé – Pediatra y Neumólogo.-

### ■ OCTAVA REUNIÓN

Martes 12 de Octubre de 2004 / Círculo Médico de Córdoba

"Hueso y Corticoides: ¿relación silenciosa?"

Prof. Dr. Daniel Salica - Panel de discusión: Dr. Julio Gagliardi, Dr. Carlos Beltrán, Dra. Silvia Missakian y Dr. Ricardo Saranz.

### ■ NOVENA REUNIÓN - CLAUSURA AÑO 2004

Viernes 05 y sábado 06 de Noviembre de 2004

"46 CURSO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA"

"7ª JORNADAS DE ALERGIA E INMUNOLOGIA DEL CENTRO"

"1ª JORNADA DE INCENTIVO A LA DOCENCIA DEL CURSO TRIENAL DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA"

Hotel César Carman A.C.A. En este evento se contó con la participación de 120 inscriptos.

## Curso Trienal de Postgrado para la formación de Especialistas en Alergia e Inmunología

**MÓDULO INMUNOPATOLOGÍA**

07 de Abril al 28 de Julio de 2004

**MÓDULO ALERGIA CLÍNICA**

04 de Agosto al 15 de Diciembre de

2004

**CURSO DE INMUNOTERAPIA** a

cargo del Dr. Gustavo Marino

Director: Dr. Jorge S. Álvarez,

Coordinadora: Dra. Silvia Missa-

kian - 24/11 y 01/12 de 2004.

## Simposio Internacional de Inmunología en Geriatría

Organizado por la Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y el Istituto Italiano di Cultura de Córdoba, con la colaboración de la AAAIC, el Círculo Médico de Córdoba, el Consejo de Médicos de la Provincia de Córdoba, la Sociedad de Geriatría y Gerontología de Córdoba y el Hospital Italiano. Llevado a cabo los días 4, 5, 6 y 7 de agosto de 2004, bajo la dirección del Prof. Dr. Luis Santos Spitale -Vice decano de la Facultad de Ciencias Médicas- y el Dott. Luigi Volta – Director del Istituto Italiano di Cultura - .

La actividad que tuvo como objetivos la puesta al día de temas de las especialidades convocadas, y contó con la presencia del Prof. Dr. Claudio Franceschi, Profesor de Inmunología de la Universidad de Bologna (Italia), como disertante e invitado especial.-

### COMITÉ EJECUTIVO

Prof. Dr. Adolfo Gabelli

Dr. Adolfo Moyano Crespo

Dra. Marta Cavallo

Dr. Juan Carlos Muñío

Dr. Mauricio Reviglionio

Dr. Carlos Romano

Se está concluyendo la tarea para editar un manual sobre los temas tratados en el Simposio, gracias a la gestión del Instituto Italiano de Cultura Córdoba dirigido por el Dott. Luigi Volta.

En la actualidad, se trabaja

en la organización del Segundo Simposio Internacional de Inmunología en Geriatría, a realizarse en agosto del 2005, el cual contará nuevamente con la participación del Prof. Dr. Claudio Franceschi y otros invitados extranjeros.

## Curso intensivo de Italiano

De tres meses de duración, a cargo de una profesora del Instituto Italiano de Cultura Córdoba

ba, con una clase semanal de dos horas, en las aulas del Círculo Médico de Córdoba.-

## Convenio con la U.N.C

La AAAIC, dada su condición de persona jurídica, celebró durante el corriente año, un convenio con la Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud de la U.N.C;

en el cual se comprometió en prestar los Servicios Educativos propios de la formación de postgrado de Especialistas en Alergia e Inmunología.

# Reglamento de Publicaciones

■ La presentación de trabajos originales, revisiones o comunicaciones breves - referidos a temas de alergia e inmunología clínica - debe remitirse a la sede del Círculo Médico de Córdoba (Comité Editor Revista Alergia e Inmunología Clínica, calle Ambrosio Olmos 820, CP 5000, Córdoba, Tel: 0351 4604313. E - mail: cirmecca@satlink.com), acompañado de una nota de solicitud de publicación donde el autor declarará su autenticidad y permiso de publicación, como así mismo hará constatar su domicilio, teléfono, correo electrónico, etc. El Comité Editorial se reserva el derecho de inclusión y estilo de publicación del trabajo presentado, resoluciones ambas que serán comunicadas en su debido momento al autor. Las opiniones vertidas en el trabajo no necesariamente serán compartidas por la Revista.

## Presentación

1. Constará de 1 (uno) original y 3 (tres) copias - numeradas a partir de carátula - en papel formato A4 (21 cm x 29.7 cm), escrito a doble espacio y marginado en su totalidad a 2.5 cm.
2. Archivo del contenido en el punto 1 copiado en 2 (dos) diskettes 3 1/2 - uno original y otro back up- . Los textos deben guardarse en formato Word o RTF.
3. Para las imágenes deben enviarse negativos, diapositivas, foto papel o impresos de alta calidad. También se podrán enviar archivos de las imágenes en formato TIF o JPG, en alta resolución.
4. Todos los cuadros, tablas, ilustraciones y fotos deben estar claramente referenciados en el texto.
5. El autor debe asegurarse que el manuscrito coincida exactamente con el diskette. El mismo debe estar rotulado con el nombre del autor y nombre del trabajo.

## Cómo ordenar el manuscrito

1. Título. Se debe presentar en hoja aparte, a modo de carátula. El mismo debe ser conciso y descriptivo (no aclarativo). Seguidamente, nombre del / los autor / es, profesión, lugar de realización del trabajo, asimismo dirección del autor a quien debe enviarse las comunicaciones sobre la publicación y, por último, financiación del estudio (ej.: autofinanciado, laboratorio, etc.).
2. Palabras clave. Irán en castellano e inglés. De 3 a 10 palabras claves o frases cortas. Colocadas al final del resumen.
3. Resumen y summary. El mismo - en español e inglés - no deberá contar con más de 250 palabras. Constará de cuatro párrafos: antecedentes, métodos, resultados y conclusiones. Éstos no contendrán abreviaturas.
4. Introducción. Razón y objetivo del trabajo.
5. Material y método o pacientes y método. Descripción de instrumental utilizado y metodología, en forma concisa y clara. Se recomienda que además de los valores P se incorporen los intervalos de confianza (IC) cuando fuera necesario.
6. Resultados. Descriptos en forma ordenada.
7. Discusión. Análisis e interpretación con el fin de entablar relación con otros trabajos.
8. Conclusiones. El significado de los resultados del trabajo.
9. Bibliografía. Las referencias bibliográficas deben presentarse en hoja aparte. Se presentarán correlativamente, según su orden de aparición en el texto. Figurarán los apellidos y las letras iniciales de los nombres de todos los autores separados por comas, el título completo del trabajo en su idioma original, el nombre

abreviado de la Revista según normas del "Index Medicus", el año separado por punto y coma el volumen y separado por dos puntas, la página.

## Ejemplo:

- Pérez R. Toni, Sánchez M, Caballo S. Anticuerpos antinucleares en Lupus Eritematoso. *N Engl J Med* 1979; 301 : 1348-5.  
Cuando la cita provenga de un libro figurará primero el apellido e inicial de los autores, título en idioma original, ciudad, editorial, año y página de la cita.
- Abreviaturas y símbolos. A figurar en el comienzo del trabajo, en recuadro sin número, según recomendaciones del sistema internacional. Las más usuales:

|                   |                 |                |     |                  |                 |
|-------------------|-----------------|----------------|-----|------------------|-----------------|
| metro             | m               | centímetro     | cm  | milímetro        | mm              |
| micrómetro        | um              | kilogramo      | Kg  | gramo(gr)        | g               |
| miligramo         | mg              | microgramo     | ug  | nanogramo        | ng              |
| picogramo         | pg              | litro          | l   | mililitro        | ml              |
| centímetro cúbico | Cm <sup>3</sup> | microlitro     | ul  | milímetro cúbico | mm <sup>3</sup> |
| equivalente       | Eq              | milequivalente | mEq | día              | día             |
| hora              | h               | minuto         | min | mol              | mol             |
| metro cuadrado    | m <sup>2</sup>  | segundo (seg)  | s   | micrón           | μ               |

Los símbolos no poseen plural (10 min sí, 10 mins no).

- Nombres de drogas. Deben usarse los nombres genéricos.
- Permiso. Materiales de otras fuentes deben acompañarse de carta de permiso de publicación del autor.
- Revisión. Los manuscritos serán revisados por el Comité Editorial, pudiendo ser enviados a revisores externos. La aceptación de publicación será comunicada al autor.  
Esta guía se corresponde al "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals". La misma aparece en *N Engl J Med* 1997; 336:309-15.
- El Comité Editorial será estricto en el cumplimiento de este reglamento.
- La fecha de aceptación y recepción del trabajo figurarán al pie de su primera página.

## Revise su trabajo antes de enviarlo:

1. Carta de presentación del trabajo con firma de los autores.
2. Original y tres copias del informe más diskette por duplicado que debe coincidir exactamente con el original impreso.
3. Portada con los nombres completos y apellido / s del / los autor / es.
4. Dirección y teléfono de la institución y particular del autor de la correspondencia.
5. Nombre de la institución en la que se realizó el trabajo.
6. Financiación.
7. Título en castellano e inglés.
8. Palabras clave en castellano e inglés..