



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“INMUNOPROTEÓMICA DE LOS ANTÍGENOS DE LA LECHE BOVINA EN
PACIENTES CON ALERGIA A ESTE ALIMENTO”.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ANGÉLICA TORRES ARROYO**

COMITÉ TUTOR:

DR. HORACIO REYES VIVAS
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DRA. ADELA RODRIGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUIMICA

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. Abril, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/045/2014...A

ANGÈLICA TORRES ARROYO
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

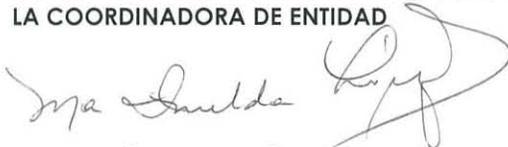
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de Enero del presente, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)**, con la réplica de la tesis "Inmunoproteómica de los antígenos de la leche bovina en pacientes con alergia a este alimento", dirigida por el Dr. Horacio Reyes Vivas.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Ruy Pérez Montfort
VOCAL	Dr. Javier Ambrosio Hernández
VOCAL	Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
VOCAL	Dr. Eduardo Alberto García Zepeda
SECRETARIO	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de Enero de 2014.
LA COORDINADORA DE ENTIDAD



DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

C.c.p. Archivo

MILV*igg

RESUMEN.

La Alergia a las Proteínas de la Leche Bovina (APLB) es un desorden complejo, en México se desconoce la incidencia de esta patología; sin embargo, se calcula que afecta entre un 5 a 7% de los lactantes. Frecuentemente el diagnóstico de APLB no se logra confirmar teniendo repercusiones negativas en el paciente. Además, se desconoce las proteínas de leche bovina (PLB) más inmunológicas para nuestra población pediátrica. En este trabajo proponemos que estas proteínas, incluso las de baja abundancia, causantes de la APLB pueden localizarse y posteriormente identificarse utilizando las inmunoglobulinas vinculadas a los mecanismos inmunológicos desarrollados en pacientes pediátricos. Este trabajo muestra los datos obtenidos de 17 pacientes con cuadro clínico de APLB; el tipo de inmunoglobulina sérica (IgE/IgG) específica contra PLB se evaluó mediante inmunoensayos como: ELISAs y Dot-blot. Encontramos que el 94% de los pacientes presentaron IgG específicas contra PLB y de manera abundante se observó en el 100% de los casos IgG4 específica. Por otro lado, al enriquecer proteínas de leche de baja abundancia por medio de cromatografía de intercambio catiónico, se logró obtener 5 fracciones con distinto perfil de contenido proteico; posteriormente, utilizando las IgG de los pacientes se identificaron 3 fracciones con alto contenido de proteínas alergénicas. Por medio de Western-blot se han logrado localizar 56 proteínas con posible capacidad alergénica y con espectrometría de masas hasta el momento se han identificado seis principales proteínas alergénicas: albúmina sérica bovina, α -lactalbúmina, α -s1-caseína, α -s2-caseína, lactoperoxidasa y Protein FAM13A. De estas proteínas la Protein FAM13-A y la lactoperoxidasa no han sido relacionadas con el desarrollo de hipersensibilidad. En conclusión, los pacientes con sintomatología de APLB expresan altas concentraciones de IgG en especial de la subclase IgG4, con el enriquecimiento por cromatografía es posible encontrar proteínas de alta capacidad alergénica que no han sido relacionadas con el desarrollo de la APLB ya que su abundancia en la leche bovina es muy baja.

ÍNDICE

	Pág.
I. Marco Teórico	
Generalidades	
1.1 Alergia a los Alimentos.....	1
1.2 Fisiología del Sistema Inmune en el Tracto Gastrointestinal.....	1
1.2.1 Tolerancia Oral	4
Antecedentes	
1.3 Alergia a las Proteínas de Leche Bovina (APLB).....	5
1.4 Fisiopatología de la APLB	6
1.5 Manifestaciones Clínicas de la APLB.....	8
1.6 Epidemiología.....	10
1.7 Diagnóstico de la APLB.....	10
1.8 Tratamiento.....	11
1.9 Proteómica	12
1.9.1 Algunas Herramientas de la Proteómica.....	13
a) Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (Geles 2-D).....	13
b) Espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos.....	14
II. Justificación.....	17
III. Hipótesis	18
IV. Objetivos	18
V. Diseño Metodológico de la Investigación	19
5.1 Tipo de Estudio	19
5.2 Pacientes	19
5.3 Definición Operacional de la APLB	19
5.4 Consideraciones Éticas	20
5.5 Cálculo del Tamaño de la Muestra	20
VI. Métodos	

6.1	Plan de Trabajo	21
	A) Obtención de sueros	23
	i) Extracción de Suero Venoso	23
	ii) Obtención de Proteínas de Leche	23
	B) Determinación de la concentración de Proteína en suero Sanguíneo y Suero de Leche Bovina.....	24
	C) Detección por inmunoensayos (ELISAs) de Inmunoglobulinas “G” y “E” Específicas contra Proteínas de Leche	24
	D) Enriquecimiento de Proteínas de Leche por Cromatografía de Intercambio Iónico	24
	E) Electroforesis de Proteínas en Una Dimensión (1-D)	25
	F) Electroforesis de Proteínas en Dos Dimensiones (2-D)	26
	G) Western-blot con Electroforesis en Dos Dimensiones	27
	H) Dot- Blot para Detectar las Subclase de IgG y la Presencia de IgE en suero	28
	I) Finger-Print de Proteínas a través de Digestión In-Gel con Tripsina	28
	J) Identificación de las Proteínas por Análisis de Finger-Print en Espectrometría de Masas en Formato MALDI-ToF	29
VII. Resultados		
7.1	Datos Clínicos de los Pacientes Incluidos en el Protocolo de Investigación	30
7.2	Determinación del Tipo de Anticuerpo Presente en Suero	32
	A) Determinación de Inmunoglobulina E Específica Contra Proteínas de Leche Bovina	33
	I) Detección de IgE con Inmunoensayo Indirecto (ELISA)..	34
	II) Detección de IgE con Dot-Blot	34
	B) Determinación de Inmunoglobulina G Específica Contra Proteínas de Leche Bovina	36
7.3	Determinación de Subclases de Inmunoglobulina G	41

7.4	Enriquecimiento de Proteínas de Leche Bovina en Baja Concentración usando Cromatografía de Intercambio Iónico	43
7.5	Inmunoensayos para Determinar las Fracciones de Leche Bovina con las Proteínas más Alergénicas	46
7.6	Localización de Proteínas de Leche Bovina Inmunogénicas Mediante Western-blot	47
7.7	Identificación de Proteínas Inmunogénicas por EM-MALDI-ToF.....	49
VIII.	Discusión	50
8.1	Determinación del Tipo de Inmunoglobulina Especifica contra PLB en Suero de Pacientes	52
8.2	¿Mecanismo Inmunológico Mediado o No por IgE?	52
8.3	Receptores de Mastocitos	55
8.4	Identificación por Inmunoproteómica de las Proteínas Antigénicas ...	58
	A) Fracción de las caseínas	61
	B) Alérgenos del Suero de la Leche	61
IX.	Conclusiones	63
X.	Perspectivas	63
XI.	Bibliografía	64
XII.	Anexos	81
	Anexo 1.....	71
	Anexo 2.....	72
	Anexo 3.....	72
	Anexo 4.....	73
	Anexo 5.....	73
	Anexo 6.....	75
	Anexo 7.....	78
XIII.	Glosario.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura	Tablas	Gráficas	Título	Pág.
1			Sistema inmune en el tracto gastrointestinal	2
	1		Manifestaciones clínicas de la APLB	9
2			Patrón bidimensional en gel	14
3			MALDI-ToF modo Reflectron	15
4			Perfil espectrométrico representativo de una muestra de proteína tripsinizada y analizada por EM-MALDI-ToF	16
	2		Prevalencia de las proteínas de leche de vaca con actividad alérgica	21
5			Plan de trabajo general	22
6			Esquema de inyección y elución de la cromatografía de intercambio catiónico para el enriquecimiento de PLB	25
	3		Programación del equipo de IEF para la separación de proteínas de PLB en 1-D.	26
	4		Datos clínicos de los pacientes con diagnóstico de APLB.	31
		1	% de frecuencia de manifestaciones clínicas gastrointestinales y extraintestinales en los pacientes	32
	5		Valores de absorbancia para IgE	34
7			Dot-Blot para la detección de IgE	35
		2	Absorbancias a 490 nm vs diluciones de suero para la detección de IgG	37
	6		Valores de absorbancia para IgG	40
8			Subclasificación de IgG	42
9			Cromatograma de las fracciones de PLB	44
10			SDS-PAGE-2D de cada fracción de PLB	45
		3	Aumento de reconocimiento de las IgGs en cada paciente con respecto a cada una de las fracciones de leche.	46
	7		Relación de pacientes que aumentaron el reconocimiento en cada una de las fracciones	47
11			Western blots y localización de proteínas antigénicas en los SDS-PAGE-2D	47
	8		Proteínas antigénicas identificadas	50
12			Receptores	57
13			Mecanismos inmunológicos	59

ABREVIATURAS.

ACN (acetonitrilo)

APLB (Alergia a las Proteínas de Leche Bovina)

BCA (bicinchoninine acid assay)

CHCA (ácido α -ciano-4-hodriximetil cinamínico)

cm (centímetro)

CPA (Célula Presentadora de Antígeno)

CTLA-4 (Antígeno de Linfocito-T citotóxico 4)

DTT (ditiotreitól)

ELISA (Enzyme-*Linked* ImmunoSorbent Assay)

EM (Espectrometría de Masas)

Fc ϵ RI (Fc-epsilon receptor type I)

Fc γ RI (Fc-gamma receptor type I)

FEIA (Fluorezymeimmunoassay)

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

g (fuerza *g* de centrifugación)

GALT (Téjido Linfoide Asociado al Intestino)

GFP (gluco fibrinopéptido)

HCl (ácido clorhídrico)

HRP (horseradish peroxidase)

hrs (horas)

IEF (Isoelectroenfoque)

IgA (Inmunoglobulina tipo A)

IgE (inmunoglobulina tipo E)

IgG (Inmunoglobulina tipo G)

IgM (inmunoglobulina tipo M)

IL-2 (Interleucina 2)

IL-4 (Interleucina 4)

IL-5 (Interleucina 5)

IL-6 (Interleucina 6)

IL-10 (Interleucina 10)

INF- γ (Interferón gamma)

INP (Instituto Nacional de Pediatría)

kU_A/L (kilounidades de alérgeno por litro)

MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (desorción/ionización láser asistida por matriz)

mA (miliamperios)

Met (metionina)

Met-OH (metanol)

MHC-2 (Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2)

min (minuto)

M (concentración molar)

mM (concentración milimolar)

m/z (relación masa-carga)

NK (Células Natural Killer)

nm (nanómetros)

PBS (phosphate buffer saline)

pI (punto isoeléctrico)

PLB (proteínas de leche de bovina)

PVDF (polyvinylidene fluoride)

PVP (polivinilpirrolidona)

RAST (Prueba de Radioalergoabsorbencia)

SDS (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta)

Th1, 2 ó 3 (Linfocitos T cooperadores 1, 2 ó 3)

TLR (Receptores tipo Toll-like)

μ L (microlitro)

μ g/mL (microgamo por mililitro)

v/v (volume/ volumen)

WAO (World Allergy Organization)

2-D (Doble dimensión)

$^{\circ}$ C (grado centígrado)

I. MARCO TEÓRICO.

GENERALIDADES.

1.1 ALERGIA A LOS ALIMENTOS.

Las reacciones adversas a los alimentos se definen como una reacción clínica que se presenta después de la ingesta de ciertos alimentos, estas reacciones adversas también se conocen como reacciones de hipersensibilidad. La clasificación propuesta por la WAO (World Allergy Organization), nos lleva a organizar estas reacciones en dos grupos ^[1]:

- **Hipersensibilidad Alimentaria Alérgica**: Cuando se demuestra la intervención de mecanismos inmunológicos en los procesos patológicos:
 - **Alergia mediada por IgE**: hipersensibilidad inmediata.
 - **Alergia no mediada por IgE**: hipersensibilidad tardía mediada por anticuerpos (IgG, IgA, IgM) o por células T.
- **Hipersensibilidad Alimentaria no Alérgica**: conocida comúnmente como intolerancia a los alimentos, se define como una reacción adversa a ingredientes alimentarios específicos. Estas reacciones no dependen de mecanismos inmunológicos, sino que pueden inducirse por deficiencias enzimáticas del paciente; por ejemplo, la diarrea producida por intolerancia a la lactosa de la leche debida a la carencia de la lactasa intestinal ^[1-3].

De los casos reportados en pacientes pediátricos con reacciones adversas a los alimentos, la incidencia de las reacciones de hipersensibilidad alimentaria alérgica oscila entre un 5% al 15%, mientras que para la hipersensibilidad alimentaria no alérgica la incidencia es del 85% al 90% ^[4,5].

Los alimentos más frecuentemente asociados a la hipersensibilidad alimentaria son la leche de vaca, huevo, cacahuete, pescado, mariscos y semillas como nueces, soya y trigo^[3,5,6]. La hipersensibilidad alimentaria alérgica es una enfermedad compleja que depende de la herencia y de factores ambientales ^[7, 8].

1.2 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA INMUNE EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

En general, la naturaleza de la respuesta a la alergia a los alimentos es similar a cualquier otra respuesta inmune. Se requiere de un estímulo antigénico, un

antecedente genético apropiado del huésped y la influencia del microambiente. Todo lo anterior dicta la naturaleza de la reacción a través de las células del sistema inmune. A continuación, se describe el sistema inmunológico intestinal en donde se realizan los diferentes tipos de reacción alérgica, los cuales se detallan posteriormente.

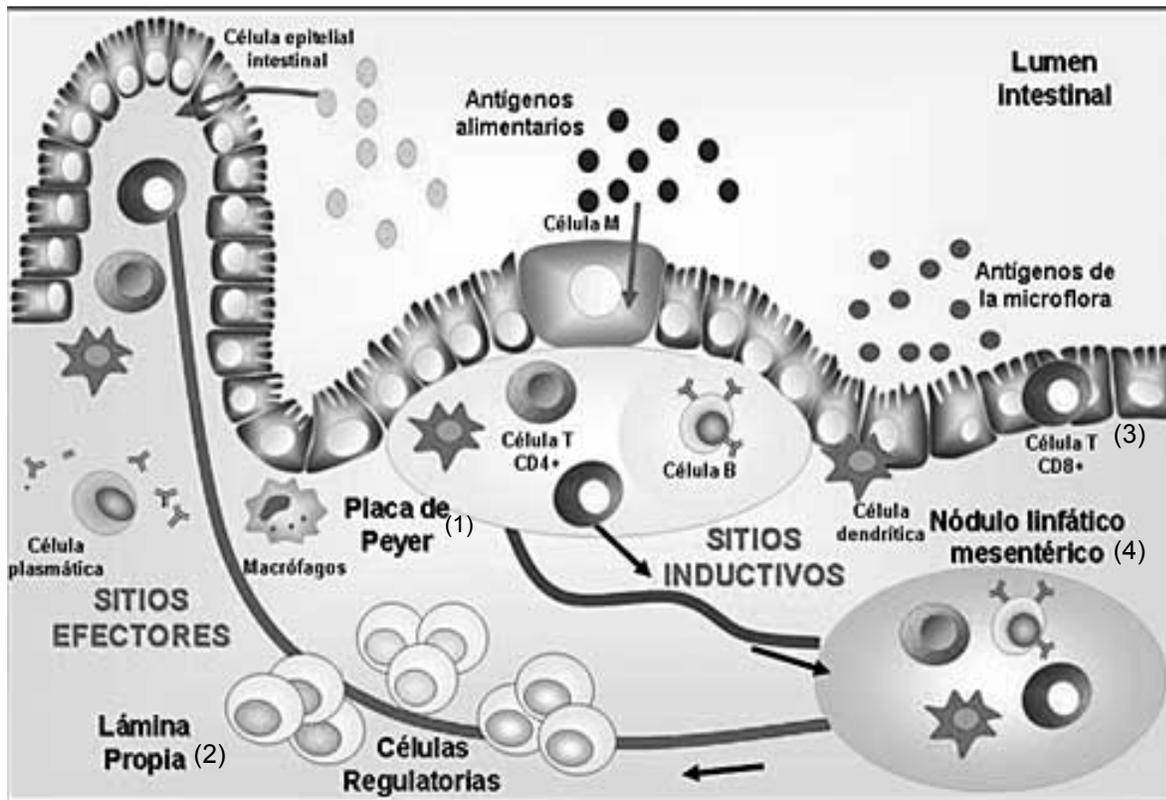


Figura 1. Sistema inmune en el tracto gastrointestinal ^[9]. El tejido linfoide asociado a intestino (GALT) se compone de cuatro compartimentos linfoides distintos:

1. Folículos linfoides dispuestos en las placas de Peyer, el apéndice y los nódulos linfáticos aislados. Las placas de Peyer contienen áreas ricas en células B y T.
2. Linfocitos, células T activadas, linfocitos B, células dendríticas y células plasmáticas de la lámina propia. Cuando estas células se activan en condiciones normales, permanecen en una condición denominada como controlada.
3. Linfocitos intraepiteliales localizados entre las microvellosidades de los enterocitos.
4. Nódulos linfáticos mesentéricos.

A las pocas horas del nacimiento, se desarrolla un sistema de digestión y protección inmunológica por el tracto gastrointestinal. La barrera inmunológica intestinal se conforma principalmente por inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina M de secreción (IgM) y el tejido linfoide asociado a intestino (GALT). GALT es el

lugar de inducción más importante del sistema inmunológico y su organización es crítica para una coexistencia pacífica (Figura 1). Es importante señalar que existen barreras físicas (piel y mucosa epitelial) que impiden el paso de antígenos. Sin embargo, aún con la integridad de los componentes de la barrera intestinal en el tubo digestivo maduro, en niños y adultos cerca del 2% de los antígenos de alimentos ingeridos se absorben y transportan en forma intacta. Las proteínas que se reconocen inmunológicamente llegan a la circulación y, en la mayoría de los individuos, no provocan reacciones adversas y desarrollan tolerancia. En contraste, en individuos susceptibles pueden favorecer procesos de hipersensibilidad alérgica [7,15]. Para el caso de patógenos, algunos de sus antígenos son seleccionados en el lumen para acarrearlos por las células M hasta el subepitelio, donde son entregados posteriormente a las células diferenciadas y macrófagos. Después, los antígenos se llevan hacia las placas de Peyer donde desencadenan una respuesta de secreción de IgA. Las IgA unidas a las células B migran fuera de la placa y drenan en el nodo linfático mesentérico, luego hacia el ducto torácico y, por último, a la vena cava. Una vez en circulación sistémica, estas células migran hacia otros sitios de mucosas donde mediarán una protección más amplia en contra del patógeno ofensor. Así, la IgA secretada es la respuesta inicial que ocurre en las superficies de las mucosas. En consecuencia, el sistema inmune está preparado para producir anticuerpos séricos e inmunidad mediada por células que protegen al huésped en contra de antígenos invasores y exposiciones subsecuentes. Para la mayoría de las proteínas de la dieta y las bacterias comensales, existe un estado de tolerancia inmunológica que protege del daño inmune activo potencial cuando el antígeno se encuentra en subsecuentes ocasiones^[16]. Los componentes tanto de la respuesta innata como adquirida, se unen para promover la tolerancia de antígenos no patógenos (alimentos) y la inmunidad activa contra patógenos. En la interfaz de la inmunidad innata y adaptativa se encuentran los receptores Toll-like (TLRs), que tiene el papel de disminuir y mejorar la respuesta inmune. Después del reconocimiento de patógenos microbianos, los TLRs disparan la inducción de citocinas inflamatorias tipo interferón y quimiocinas. Los receptores también incrementan a las células dendríticas, las cuales son coestimuladoras; éste es un proceso esencial para inducir

la respuesta inmune adaptativa específica para patógenos. Las proteínas ingeridas de la dieta se degradan y sus epítopes conformacionales se destruyen por la acidez del jugo gástrico y por proteasas. Esto regularmente destruye los epítopes inmunogénicos; sin embargo, la ingesta de proteínas que no se desnaturalizaron por el ácido gástrico o por digestión de proteasas intestinales, pueden alterar la tolerancia previamente establecida.

Las proteínas sin digerir o sin procesar en el lumen del intestino, se pondrán en contacto con el epitelio y la mucosa del sistema inmune de varias formas. En la luz intestinal, las células dendríticas muestrean los antígenos mediante procesos de extensión a través del epitelio hacia el lumen. Las células M de las placas de Peyer pueden tomar partículas antigénicas y llevarlas a las células dendríticas del subepitelio. Los antígenos solubles posiblemente cruzan el epitelio a través de rutas transcelulares o paracelulares para encontrarse con las células T o macrófagos en la lámina propia. Las proteínas de la dieta que escaparon de la proteólisis intestinal pueden tomarse por las células epiteliales del intestino. Las células epiteliales actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) a las células T.

Las CPA profesionales son principalmente células dendríticas y macrófagos que procesan los antígenos y los presentan a los linfocitos T cooperadores (Th). Cuando se activan los linfocitos Th producen diferentes citocinas; dependiendo de qué citocinas se produzcan, los linfocitos T se diferencian en tres fenotipos conocidos como Th1, Th2 y T reguladores (Th3). Por otra parte, los linfocitos B pueden activarse y convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos ^[3,16,17].

1.2.1 TOLERANCIA ORAL.

Este proceso es una respuesta de hipo o nula reactividad de las células maduras B y T a la exposición de antígenos ingeridos por vía oral. Por tanto, se define como la supresión de la respuesta inmune celular o humoral hacia un antígeno que previamente se administró por vía oral. La hipersensibilidad alérgica alimentaria resulta de la falla por establecer tolerancia oral, o bien, de la pérdida de la tolerancia existente ^[18,19]. Existen tres mecanismos efectores primarios para inducir la tolerancia oral: i) supresión activa por las células Th3 y citocinas, ii) anergia y iii) ablación

clonal. El mecanismo involucrado dependerá de la magnitud de la dosis antigénica administrada. A dosis bajas de antígeno, se induce un efecto supresor a través de las células Th3 y citocinas solubles asociadas a superficie como IL-4, IL-10 y el TGF- β . En particular, las Th3 CD4+ y CD25+ median la supresión a través del TGF- β unido a las superficies celulares. Las células CD4+ y CD25+ expresan factores de transcripción (FOXP3), los cuales se piensa que ayudan a bloquear las respuestas de los linfocitos Th1 y Th2^[16, 17, 20]. Para el caso de altas dosis de antígeno, se favorece la tolerancia mediante las vías de anergia de linfocitos o de ablación clonal. La anergia puede ocurrir a través de ligandos del receptor de células T en la ausencia de señales coestimuladoras originadas por citocinas solubles, tales como IL-2. También puede ocurrir por la interacción entre el receptor de células T CTLA4 y sus contrareceptores en CPA (CD80 y CD86). La ablación clonal ocurre por medio de la apoptosis mediada por la proteína FAS. Se ha sugerido que las respuestas a dosis bajas y altas no son mutuamente excluyentes y pueden sobreponerse funcionalmente. Las células T apoptóticas liberan TGF- β tanto en forma latente como en forma bioactiva, mientras que los macrófagos producen TGF- β en las células apoptóticas digeridas. Las células Th3 son potentes fuentes de TGF- β . Estas células se generan en la mucosa del tejido linfático en respuesta a bajas dosis de antígenos y median la tolerancia dentro del tracto gastrointestinal inhibiendo la activación de los linfocitos de los alrededores. Los defectos en la actividad de las células Th3 parecen contribuir al desarrollo de la alergia alimentaria^[21-23]

ANTECEDENTES.

1.3 ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA (APLB).

Las proteínas de la leche bovina (PLB) son los primeros antígenos introducidos a la dieta a los que se exponen los niños en fase de lactancia. En la mayoría de los lactantes los antígenos de proteínas de leche no promueven una respuesta alérgica (**tolerancia**). Sin embargo, un porcentaje de la población infantil desarrolla un cuadro de APLB (**sensibilización**). En este sentido, la hipersensibilidad alérgica y no alérgica a las PLB son la causa más común de enfermedades de tipo alimentaria en

lactantes. El equilibrio entre la tolerancia y la sensibilización depende de varios factores incluyendo:

- 1) antecedentes genéticos, por ejemplo antecedentes de alergia en algún familiar (atopia).
- 2) la naturaleza y la dosis del antígeno.
- 3) la frecuencia de administración.
- 4) edad de la primera exposición al antígeno; los niños recién nacidos son más susceptibles de desarrollar alergias debido a la inmadurez de su sistema inmune.
- 5) el estado inmunológico del huésped; por ejemplo, inmadurez del sistema inmunológico de la mucosa gástrica, aumento en la permeabilidad de la mucosa gástrica, determinantes genéticas sesgadas al desarrollo de células Th2, polimorfismos de las citocinas Th2 o de los genes de los receptores de IgE, bajos niveles de TGF- β y
- 6) transmisión del antígeno a través de la leche materna ^[10,11].

La leche de bovino (*Bos taurus*) contiene cerca de 200 proteínas ^[11] las cuales podrían ser potenciales alérgenos en humanos. Los alérgenos principales son la β -lactoglobulina, proteínas de la familia de las caseínas, la lactoalbúmina y la albúmina sérica bovina. Las caseínas generalmente se encuentran en complejos micelares y le confieren la apariencia lechosa a este alimento; estas proteínas constituyen del 76% al 86% del total de PLB. Los tratamientos convencionales usados en la pasteurización de rutina no aseguran la pérdida de alergenicidad de las proteínas; de hecho, se ha demostrado que al promover su desnaturalización se exponen nuevas regiones que pueden ser potencialmente alergénicas, como es el caso de la β -lactoglobulina ^[13, 14].

1.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA APLB.

La APLB resulta de una reacción inmunológica a una o varias proteínas de la leche. Existen cuatro posibles mecanismos de hipersensibilidad que, como se mencionó anteriormente, es el sistema inmune junto con su medioambiente los que dictan el tipo de reacción.

- *Tipo I o hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.* Se genera en un tiempo menor a 2 horas posterior a la ingesta de la proteína. Se produce en respuesta a ciertos antígenos llamados alérgenos. Los síntomas se relacionan con el órgano o sistema donde las células plasmáticas se activen. Los antígenos se captan y procesan por las CPA y presentan los epítopes a las células Th2. Las Th2 comienzan a secretar IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 favoreciendo la producción de anticuerpos IgE por los linfocitos B. Éstos últimos tienen gran afinidad por los receptores FcεRI de mastocitos y basófilos. La subsecuente exposición al alérgeno promueve una interacción IgE-Fcε promoviendo la degranulación de los mastocitos y basófilos. Esto libera diversas sustancias proinflamatorias como histamina y los factores granulocíticos quimiotácticos [12, 24,25-27,29].
- *Tipo II o reacción citotóxica.* Esta reacción afecta una gran variedad de órganos y tejidos. Es mediada principalmente por anticuerpos de la clase IgM, IgG y factores del complemento. La trombocitopenia inducida por APLB es un ejemplo de esta reacción. Las IgM e IgG se unen a los antígenos depositados en las membranas de las células; esto puede provocar tres situaciones: 1) Activación de la cascada del complemento; 2) Lisis celular por activación de las células *natural killers* (NK); 3) Liberación de factores tóxicos al medio extracelular debido a la fagocitosis frustrada. El desenlace de estas tres situaciones es la destrucción celular y el daño a tejido [17, 26-28].
- *Tipo III o complejos inmunes.* Esta reacción se produce por la deposición de agregados antígeno-anticuerpo o de complejos inmunes en tejidos particulares, esto provoca una respuesta de inflamación local. Las IgG, IgM y los factores de la cascada del complemento (C3a, 4a y 5a) se unen a los antígenos circulantes formando complejos inmunes solubles. Los complejos interaccionan con el endotelio de los vasos de pequeño calibre desencadenando un proceso inflamatorio llamado vasculitis. Como consecuencia, se induce daño al tejido del vaso por medio de plaquetas y neutrófilos; las manifestaciones clínicas de esta patología dependerán del grado y extensión de la lesión [24-26,28].
- *Tipo IV o reacción mediada por células.* En esta reacción intervienen linfocitos T, monocitos y macrófagos. Los alérgenos reaccionan directamente con las Th1

provocando la secreción de citocinas que activan a los macrófagos. Se caracteriza por ser una reacción retardada que puede presentarse junto con la reacción tipo III. Las CPA son, en este caso, los macrófagos que secretan IL-12 que estimula la proliferación de más linfocitos T. Los Th1 también secretan IL-2 e interferón gamma estimulando aún más la liberación de citocinas; en esta forma se media la respuesta inmunitaria. Las células NK destruyen a las células diana cuando se contactan, mientras que los macrófagos activados producen proteasas. Ante ciertos patógenos intracelulares los macrófagos se transforman en células gigantes multinucleadas ^[26-29].

1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA APLB.

No existe un síntoma patognomónico de APLB, sin embargo, las manifestaciones pueden dividirse en reacciones inmediatas (mediadas por IgE) o reacciones tardías (mediadas por IgE y células o no mediadas por IgE). Las manifestaciones mediadas por IgE son las más características de una reacción alérgica alimentaria, por lo general, se presentan de manera inmediata. Las manifestaciones mediadas o no por IgE se pueden dividir en síntomas gastrointestinales, síntomas extragastrointestinales y síntomas generalizados (Cuadro 1).

Una variedad de síntomas se asocian con las reacciones alérgicas mediadas por IgE, como son las manifestaciones generalizadas (hipotensión, choque), cutáneas (urticaria, angioedema y rash morbiliforme prurítico), orales y gastrointestinales (edema de labios, lengua y prurito de paladar, vómito y diarrea), respiratorios altos y bajos (prurito ocular y lagrimeo, congestión nasal, edema faríngeo y sibilancias). La dermatitis atópica y la hiper-reactividad de la vía aérea (asma) involucra la activación de otros tipos de células a través de los mecanismos mediados por IgE (Cuadro 1). La hipersensibilidad tipo IV contribuye a un gran número de alteraciones gastrointestinales, tales como la esofagitis y gastroenteritis eosinofílica, dermatitis atópica y la enfermedad celiaca.

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas de la APLB. [8, 30, 31]	
Mediadas por IgE.	
Síntomas gastrointestinales	<ul style="list-style-type: none"> • Edema de labios • Vómito • Diarrea • Reflujo gastroesofágico • Cólicos/irritabilidad • Disquecia/estreñimiento • Sangrado de tubo digestivo alto y/o bajo
Síntomas dermatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Urticaria • Angioedema • Rash morbiliforme • Síndrome de alergia oral
Síntomas Respiratorios	<ul style="list-style-type: none"> • Rinitis • Asma • Rinoconjuntivitis • Broncoespasmo • Laringoespasmo • Cianosis • Tos crónica • Apneas • Síndrome de muerte súbita del paciente • Otitis media crónica
Síntomas generalizados	<ul style="list-style-type: none"> • Edema de glotis • Choque anafiláctico
No Mediadas por IgE	
Síntomas gastrointestinales	<ul style="list-style-type: none"> • Esofagitis • Gastritis • Gastroenterocolitis eosinofílica • Enterocolitis • Proctitis • Síndrome de enteropatía por sensibilización a PLB • Cólico de lactante • Síndrome de malabsorción
Síntomas dermatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Dermatitis atópica • Dermatitis herpetiforme
Síntomas respiratorios	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad pulmonar crónica inducida por PLB • Síndrome de Heiner

1.6 EPIDEMIOLOGÍA.

La APLB es más común en lactantes, la reacción inmunológica se acompaña de diferentes signos y síntomas clínicos ^[2-6]. La incidencia a nivel mundial de la APLB es del 2-3% de los lactantes en el primer año de vida; cerca del 60% es a través de mecanismos que involucran la generación de IgE contra alguna de las PLB ^[12]. Se ha observado que alrededor del 15% al 20% de los pacientes que presentaron APLB en edad pediátrica, la continuarán a lo largo de su vida ^[13]. En México se desconoce la incidencia de esta patología pero podría oscilar entre el 5 al 7%, actualmente se tiene la percepción clínica de que es un problema creciente. Los mecanismos responsables aún no se comprenden claramente pero se ha demostrado que la presencia de IgE contra distintos epítopes de las PLB pueden utilizarse como marcadores de alergia persistente ^[18,32].

1.7 DIAGNÓSTICO DE LA APLB.

Una historia clínica detallada (incluyendo una historia de atopia) y una exploración física cuidadosa son fundamentales. Se menciona que el riesgo de atopia se incrementa si un padre o familiar ha tenido enfermedad atópica (20-40% y 25-35%, respectivamente) y es mayor si ambos padres presentaron atopia (40-60%) ^[31]. La APLB se puede desarrollar en lactantes alimentados con seno materno parcial o exclusivo, por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado disminuyen el riesgo de retraso en el crecimiento.

Usualmente se miden las reacciones de pruebas cutáneas, se analizan los títulos de IgE específicas, o ambos en el suero de los pacientes. Sin embargo, hay pacientes con APLB que muestran datos clínicos agudos de alergia sin niveles detectables de IgE específica. Por lo que el estándar de oro para el diagnóstico continúa siendo el reto de alimentos oral, doble ciego, controlado con placebo. Se sabe ahora que en los pacientes con APLB mediada por IgE, la respuesta a la exposición de la leche es inmediata ^[32-35]. Este tipo de estudios permiten realizar el diagnóstico, sin embargo, los resultados individuales no proveen información pronóstica ni distinguen entre los diferentes fenotipos de la alergia alimentaria. Es por ello que actualmente se han desarrollado nuevos métodos para tratar de

correlacionar los datos clínicos que muestran los pacientes (fenotipos de alergia) y los mediadores inmunológicos relacionados con la sensibilización e incluso el desarrollo de la tolerancia.

En general, el papel de las pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la APLB es debatible. Las pruebas empleadas en la práctica clínica sólo revelan la sensibilización a las proteínas de la leche, lo cual no es necesariamente seguida de una relevancia clínica. Alrededor del 50% de los niños sensibilizados no presentan alergia alimentaria. Las pruebas *in vitro* que identifican IgE específico para alérgenos (incluyendo el RAST, ELISA, CAP system FEIA, y UniCAP) se utilizan para medición sérica de IgE dirigida contra alérgenos de alimentos. Mientras que éstos se consideran menos sensibles que las pruebas en piel, un estudio comparativo entre la prueba de Phadebas RAST y el reto con doble ciego encontró que las pruebas cutáneas y el RAST tienen una sensibilidad y especificidad muy similar al reto con alimentos. En los últimos años, el uso de medidas cuantitativas de anticuerpos IgE específicos para alimentos (Sistema CAP, UniCAP) mostró ser más predictivo para la alergia alimentaria mediada por IgE. Los niveles de IgE específicos para alimentos que exceden los valores diagnósticos indican que el paciente tienen una probabilidad mayor del 95% en experimentar una reacción alérgica si ingiere un alimento específico. Además, los niveles de IgE pueden monitorearse y, si estos caen por <2 kilounidades de alérgeno por litro (kU_A/L) para leche, el paciente debe realizarse un nuevo reto para determinar si ha superado la alergia alimentaria ^[36- 38].

1.8 TRATAMIENTO.

En la actualidad, la única opción terapéutica en la práctica general para la APLB es la dieta de eliminación de los productos que contiene las proteínas de la leche. Sin embargo, esta medida es difícil de establecer en niños mayores y pueden estar en riesgo de ingestión accidental. Por lo que estudios recientes investigan el tratamiento con inmunoterapia, la mayoría mediante la ruta oral o sublingual, pero también recientemente por vía epicutánea ^[39]. Por otro lado, en la mayoría de los casos con la administración de fórmulas hipoalérgicas a base de hidrolizados de proteínas

de leche o fórmulas a base de soya se busca disminuir la sintomatología de los pacientes con APLB ^[40].

1.9 PROTEÓMICA

A continuación, se describen brevemente algunos fundamentos de la proteómica, así como de las herramientas más comunes que esta ciencia utiliza para su desarrollo. Esta información es requerida para comprender la relación que se desea realizar entre el estudio de la APLB y el uso de las estrategias propuestas en este proyecto; lo anterior nos permitirá obtener diagnósticos más certeros y pruebas menos riesgosas para el paciente.

La proteómica es la ciencia que determina la expresión de las proteínas que se producen en una célula, tejido u organismo en condiciones determinadas, normales o fisiopatológicas, así como la identificación precisa e inequívoca de aquellas proteínas de interés. Además, se encarga de establecer las propiedades funcionales y posibles modificaciones post-traduccionales de dichas proteínas ^[41].

Los objetivos de la proteómica se realizan principalmente en dos pasos: a) estudiar los cambios globales de la expresión de las proteínas celulares y b) determinar la identidad y función de aquellas proteínas que fueron de interés. Al conjunto completo de proteínas sintetizadas por una célula se le denomina como proteoma ^[41,42]. Las aplicaciones potenciales de la investigación proteómica son cuantiosas y variadas, además de proporcionar oportunidades para resolver problemas biológicos básicos. Entre las últimas investigaciones se encuentran las causas y los diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas y las enfocadas en la búsqueda de nuevos fármacos y biomarcadores.

La proteómica puede clasificarse en cinco grandes áreas de aplicación:

- Identificación masiva de proteínas.
- Microcaracterización de proteínas (análisis de modificaciones postraduccionales).
- Análisis de expresión diferencial (cuantificación relativa y absoluta).
- Análisis de las interacciones proteína-proteína.
- Búsqueda, verificación y validación de biomarcadores proteicos ^[43].

En la actualidad, la investigación de los proteomas se apoya principalmente en el desarrollo de métodos exactos y relativamente rápidos para identificar y caracterizar a las proteínas, las principales tecnologías en desarrollo son las siguientes:

- Tecnología de electroforesis en geles de 2-dimensiones (2-D).
- Tecnología de tinción y análisis de los geles.
- Tecnología para la identificación de las proteínas mediante la espectrometría de masas.
- Tecnologías de manejo de la información obtenida de bases de datos (de genomas y de proteínas), así como el desarrollo de algoritmos de búsqueda y de recuperación de datos ^[41-43].

1.9.1 ALGUNAS HERRAMIENTAS DE LA PROTEÓMICA.

a) Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (Geles 2-D).

La expresión de las proteínas se puede analizar con geles bidimensionales (2-D). En esta técnica primero se extraen las proteínas de las células o de los tejidos y, posteriormente, se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida. En la primera dimensión, las proteínas se separan dentro de un gradiente de pH, dependiendo de su punto isoeléctrico (pI). A continuación, el gel se corre en una segunda dimensión añadiendo el detergente dodecil sulfato sódico (SDS). En la segunda dimensión, las proteínas se separan en la segunda dimensión por diferencias de masa molecular. Normalmente pueden visualizarse cientos de proteínas, utilizando técnicas de tinción muy sensibles como la tinción con Sypro, tinción con plata, tinción con azul de Coomassie coloidal, etc. Posteriormente, los geles 2-D se digitalizan y sus imágenes se analizan mediante programas especializados para determinar la presencia, ausencia o cambio de intensidad de las diferentes proteínas (Figura 2) ^[44-47,49]. Con lo anterior, se obtiene un patrón de proteínas que pudieron cambiar de expresión al compararse con otra condición, por ejemplo, fisiológica *versus* patológica. En esta etapa se obtiene además, información sobre el peso molecular y el pI relativos de dichas proteínas. Sin embargo, debido a

que la información anterior es relativa y con un grado de imprecisión importante, es imposible identificar a las proteínas directamente de los geles.

Para la identificación de las proteínas, una técnica a utilizarse es la denominada como *fingerprint*, que consiste en extraer las proteínas del gel, hidrolizarlas con proteasa para obtener pequeños péptidos y analizarlos posteriormente por espectrometría de masas [48].

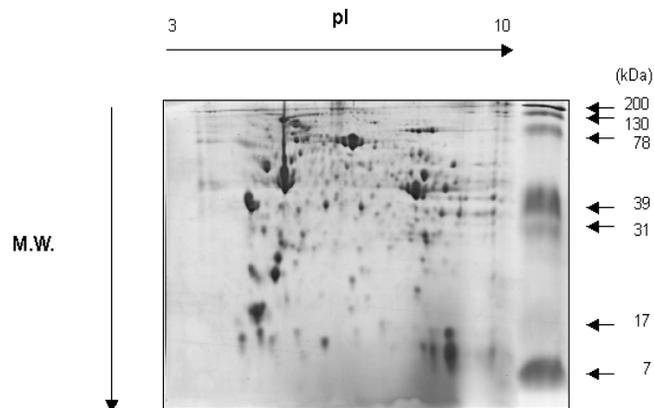


Figura 2. Patrón bidimensional en gel. La separación de las proteínas por su carga o pI se realiza horizontalmente a esta figura. La separación por peso molecular se realiza verticalmente. Cada mancha o *spot*, representa una o más proteínas que fueron teñidas con el colorante Azul de Commassie.

b) Espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos.

En años recientes, los bioquímicos abandonaron el método de degradación de Edman para secuenciar proteínas. Ahora se utiliza con más frecuencia la espectrometría de masas (EM), una técnica poderosa y sensible para identificar moléculas y determinar su masa aprovechando diferencias en sus relaciones entre masa y carga (m/z).

En un espectrómetro de masas, fluyen moléculas ionizadas por un campo magnético. La fuerza del campo magnético desvía los iones dependiendo de las proporciones m/z ; el detector mide la señal de cada ion y el tiempo que tarda en llegar a dicho detector. Además de la identificación de proteínas y de la determinación de la masa, la EM también permite detectar cofactores ligados y modificaciones en las proteínas. Debido a que el análisis por EM implica la ionización y la vaporización de las sustancias por investigar, el uso de macromoléculas térmicamente inestables como proteínas y ácidos nucleicos no fue factible hasta que

se desarrollaron métodos como la ionización por electroaspersión y la ionización/desabsorción asistida por matriz (MALDI) [50,51].

MALDI-ToF

MALDI-ToF es una técnica de ionización suave utilizada en EM. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desabsorción/ ionización con láser asistida por matriz) y ToF por el separador de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-of-Flight* (tiempo de vuelo).

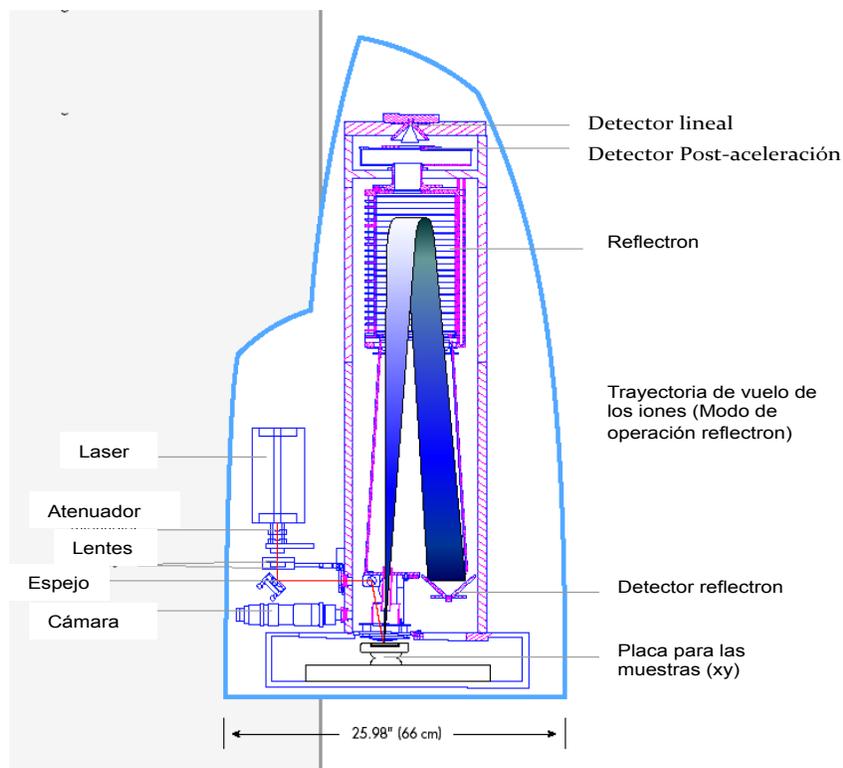


Figura 3. Corte transversal de Maldi-ToF modo Reflectrón, el cual se encuentra en la Unidad de Proteómica del INP.

En MALDI-ToF (Figura 3), un pulso láser vaporiza los péptidos de la proteína, la cual ha sido proteolizada anteriormente y que se combina con una matriz que favorece la ionización de los péptidos. Una vez que la muestra se ioniza, los iones (ahora en la fase gaseosa) se aceleran conforme atraviesan el tubo de vuelo debido a un pulso de voltaje y un campo eléctrico aplicado. La combinación de ambas contribuciones genera que los iones adquieran energía cinética (KE). El valor del

cociente m/z de los iones individuales se calculan basándose en el tiempo en que atraviesan el tubo. Los péptidos con elevada masa tienen un tiempo de vuelo mayor en el tubo antes de alcanzar el detector al final de su recorrido a través del tubo de vuelo; esto en concordancia con la ecuación (1).

$$T = \left\{ \left[\frac{(m/z)(d^2)}{2E} \right] \right\}^{1/2} \quad (1)$$

Donde T es el tiempo de vuelo de un ión, m/z es la relación masa/carga del ión, d es la distancia de vuelo y E es la contribución del campo eléctrico y el pulso de voltaje. El impacto de los iones contra el detector genera una señal que forma un perfil espectrométrico particular para cada proteína (Figura 3), denominado como *fingerprint*.

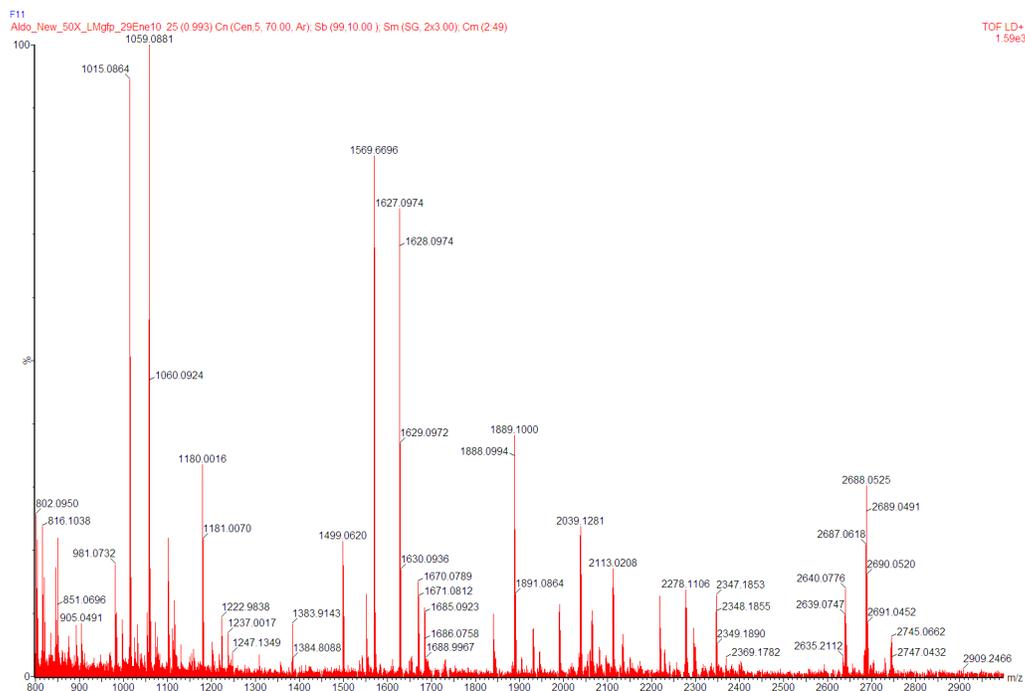


Figura 4. Perfil espectrométrico representativo de una muestra de proteína tripsinizada y analizada por EM tipo MALDI-ToF. El valor de las ordenadas representa la abundancia de los iones; el valor de las abscisas representa el valor de la relación m/z de cada ión. Posteriormente, en un proceso asistido por computadora, la información concerniente a la masa de cada ion se compara con datos de iones de estructura conocida y se usa a fin de determinar la identidad de la proteína de la muestra [52, 53].

II. JUSTIFICACIÓN.

La APLB es la alergia alimentaria más común en infantes. En las últimas décadas la incidencia mundial de esta patología está incrementando principalmente en países en desarrollo debido primordialmente a la disminución de la lactancia materna durante los primeros meses de vida. Lo anterior trae como consecuencia la exposición temprana a proteínas de carácter alergénico en recién nacidos. En México, la incidencia de la APLB se desconoce; sin embargo, se calcula que afecta entre un 5 a 7% de los lactantes.

La APLB es un desorden complejo debido a que pueden ser afectados varios órganos y sistemas, por lo que un paciente puede presentar gran diversidad de manifestaciones clínicas. Lo anterior acompañado de técnicas de detección de anticuerpos IgE (Prick) e IgG (precipitinas) con poca especificidad y sensibilidad, puede llevar a un diagnóstico inadecuado que impacta directamente en el desarrollo y estado nutricional del lactante. Otro punto importante es que la mayoría de las técnicas utilizadas se basan en la búsqueda de anticuerpos específicos contra los alérgenos más abundantes que se encuentran en la leche bovina como caseínas, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y albúmina sérica bovina dejando de lado las proteínas que se encuentran en el suero de la leche en menor abundancia pero que potencialmente pueden tener capacidad alergénica. Por otro lado, en la población mexicana no existen estudios acerca de cuál es el mecanismo más frecuente de hipersensibilidad que provoca la sintomatología de la APLB. Asimismo, se desconoce cuál o cuáles son las proteínas más antigénicas que causan la respuesta inmune en la población mexicana.

La identificación del grupo de proteínas de la leche bovina más antigénicas en nuestra población, así como saber cuál es la respuesta inmunológica más frecuente en la alergia a tales proteínas, nos permitirá contribuir en el conocimiento de esta patología y apoyar al diagnóstico certero de esta enfermedad que afecta a la población pediátrica.

III. HIPÓTESIS.

Las proteínas de leche bovina causantes de alergia pueden localizarse y posteriormente identificarse utilizando las inmunoglobulinas vinculadas a los mecanismos inmunológicos desarrollados en pacientes pediátricos.

Los pacientes con alergia a proteínas de la leche bovina pueden desarrollar reacciones de hipersensibilidad combinadas.

IV. OBJETIVOS.

GENERAL:

- Identificar a las proteínas de la leche bovina con potencial alergénico y a los anticuerpos que más frecuentemente están involucrados en la APLB en población pediátrica.

PARTICULARES:

- Determinar la presencia de inmunoglobulina E específica contra proteínas de leche bovina en suero de pacientes.
- Determinar la presencia de inmunoglobulina G específica contra proteínas de leche bovina en suero de pacientes.
- Determinar las subclases de IgG específicas contra proteínas de leche presentes en suero de pacientes.
- Enriquecer proteínas de baja abundancia para mejorar el reconocimiento Ag-Ab (antígeno-anticuerpo).
- Identificar las proteínas reconocidas como alergénicas por las inmunoglobulinas de los pacientes.

V. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.

5.1 TIPO DE ESTUDIO.

Estudio observacional, prospectivo, transversal.

5.2 PACIENTES.

Las muestras de los pacientes se obtuvieron de los servicios de Alergia y Gastroenterología del Instituto Nacional de Pediatría. Las muestras utilizadas como controles se obtuvieron de lactantes que acudieron a el servicio de Urgencias del INP por traumatismo y que no presentaron manifestaciones de alergia. Lo anterior se determinó mediante interrogatorio previo sobre antecedentes de atopia familiar y la historia personal de manifestaciones de alergia alimentaria, sibilancias, dermatitis atópica y específicos como sangrado de tubo digestivo bajo, diarrea y vómito. Las muestras control se utilizaron para obtener los valores basales de los ensayos inmunológicos realizados.

Población objetivo: Se incluyeron 17 niños y niñas menores de dos años atendidos en los servicios de Gastroenterología y de Alergia del INP, durante el período 2012-2013 con sintomatología sugestiva de APLB.

Criterios de Inclusión: Todos los infantes cumplieron con la definición operacional de la APLB (se describe mas adelante). Para garantizar la presencia de los anticuerpos elevados, producto de los mecanismos inmunológicos responsables del cuadro clínico, únicamente se incluyeron los pacientes con menos de tres meses de tratamiento (supresión de leche bovina). Los padres aceptaron participar en el estudio firmando la carta de consentimiento informado correspondiente.

5.3 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LA APLB.

Al momento de la toma de muestra, los pacientes presentaron al menos una de las manifestaciones gastrointestinales (cólico persistente, irritabilidad, reflujo gastroesofágico de difícil control, diarrea crónica, evacuaciones con sangre macroscópica o sangrado microscópico evidenciado por prueba positiva de sangre oculta en heces y/o anemia microcítica hipocrómica) con al menos una de las siguientes manifestaciones: (1) Evidencia histológica de daño inmunológico (por ej. Esofagitis eosinofílica, hiperplasia nodular linfoide, inflamación con infiltrado linfoide

intraepitelial, atrofia de vellosidades, etc. (2) IgE positivo contra proteínas de la leche de vaca (por prueba de Prick, EASTo Immunocap), o sensibilización por mecanismos diferentes a la IgE mediante prueba de parche positiva. Adicionalmente, las manifestaciones extraintestinales como sibilancias y dermatitis atópica, se incluyeron como apoyo al diagnóstico.

5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS.

En concordancia con el cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas, así como a los lineamientos internacionales que protegen los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos, en acuerdo con lo establecido en la Declaración de Helsinki, este estudio se llevó a cabo bajo el estricto respeto de dichos lineamientos, manejando en forma anónima y confidencial los datos y resultados obtenidos.

Para cumplir con lo anterior, se realizaron los siguientes mecanismos:

1. Revisión del Protocolo por los Comités de Investigación y de Ética del INP debiendo esperar su aprobación para la ejecución del mismo.
2. La información obtenida se encuentra archivada, bajo resguardo y a disposición del Comité de Investigación y del Comité de Ética.
3. Se aseguró la confidencialidad de la identidad de los pacientes y de la información obtenida del estudio.

5.5 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando la fórmula (2)

$$n = \left[\frac{(Z_{1-\alpha/2})^2 (pq)}{e^2} \right]$$

Donde n es el tamaño de la muestra; $Z_{1-\alpha/2}$ corresponde al error alfa y es igual a 1.96 ; p es la frecuencia esperada del factor a estudiar; q corresponde al valor $1-p$; e es igual al error admitido en la estimación del intervalo de confianza. Para nuestro caso, se consideró un error del 10%.

En el 2004, se reportó un estudio de APLB en 20 pacientes pediátricos italianos, de entre 1-14 meses de edad, afectados por dermatitis atópica. A partir de estudios de inmunoblot y espectrometría de masas, se reportaron las prevalencias de alergia

para un grupo de proteínas de leche bovina ^[19], mismas que se señalan en la Tabla 2. Considerando los valores de prevalencia de las ocho proteínas evaluadas en la referencia 19, los valores máximos y mínimos de tamaño de muestra fueron, respectivamente, 96 y 18. Tomando en cuenta estos valores y la posible negación de participación, así como posible deserción del protocolo, consideramos que un número aceptable de pacientes diagnosticados con APLB que deberán estudiarse en este proyecto sería de 100.

Tabla 2. Prevalencias de las proteínas de leche de vaca con actividad alérgica ^[19].

Proteína	% de prevalencia	Tamaño de la muestra requerido.
α -s1-caseína	55%	95
α -s2-caseína	90%	34.6
β -caseína	15%	49
κ -caseína	50%	96
β -lactoglobulina	45%	95
BSA	45%	95
Cadena pesada de IgG	95%	18
Lactoferrina	50%	96
α -lactalbúmina	0%	95

VI. MÉTODOS.

6.1 PLAN DE TRABAJO.

El plan de trabajo general se esquematiza en la Figura 5. Después de identificar clínicamente a los pacientes con APLB, se les extrajo sangre venosa y se separó el suero del paquete celular. El suero se utilizó para identificar el tipo de inmunoglobulina (IgG e IgE), así como los subtipos de IgGs que reconocen a las PLB, con el uso de ensayos de ELISA.

Se conoce que el número aproximado de proteínas presentes en la leche de vaca, considerando proteínas únicas e isoformas, es alrededor de 200 (Uniprot). Sin embargo, no todas las proteínas se encuentran en la misma abundancia encontrándose algunas en muy baja proporción. Para enriquecer a las PLB de baja abundancia y facilitar el reconocimiento de éstas por anticuerpos específicos, la leche se redujo en caseínas y se fraccionó utilizando FPLC. Posteriormente, se

realizaron ensayos de ELISA para aislar las fracciones de proteínas que fueron más antigénicas. Para el aislamiento de las PLB alergénicas, se tomaron las fracciones de leche con mayor reacción y se realizó Western-blot en dos dimensiones. Los anticuerpos presentes en el suero de cada paciente se utilizaron como primer anticuerpo. Las proteínas detectadas se extrajeron de los geles y se identificaron por el método de huella digital (*Fingerprint*) mediante EM-MALDI-ToF.

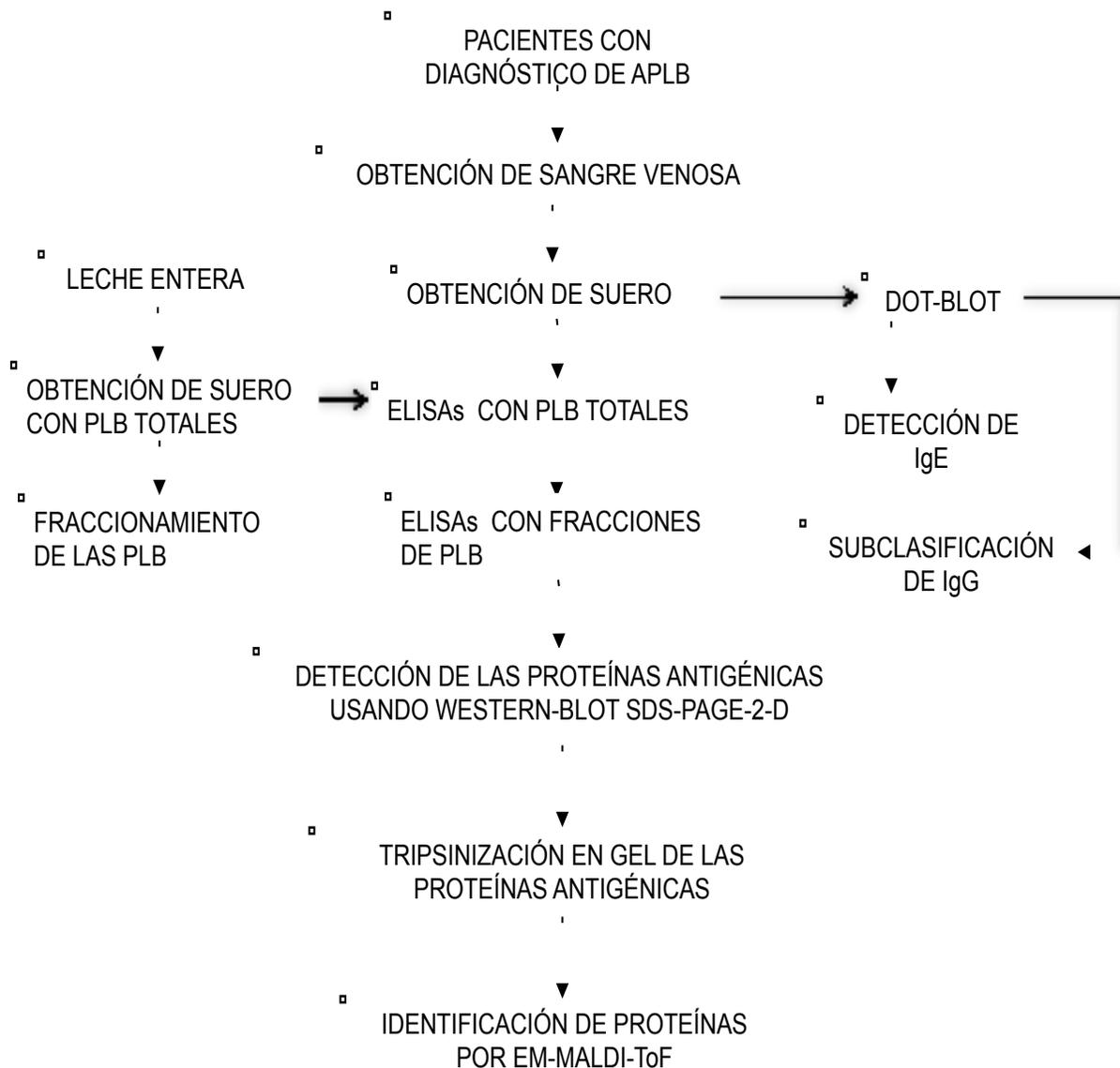


Figura 5. Plan de trabajo general para identificar el tipo de inmunoglobulina presente en el suero de pacientes con APLB así como las proteínas bovinas causantes de la alergia.

A) OBTENCIÓN DE SUEROS.

i) EXTRACCIÓN DE SUERO VENOSO.

Se tomaron de 3 a 5mL de sangre venosa de pacientes con diagnóstico clínico de APLB y de controles obtenidos del Departamento de Urgencias. Los controles son pareados por edad. Las muestras sanguíneas se almacenaron en tubos Vacutainer de tapón rojo (sin anticoagulante), se incubaron 30min a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugaron a 525g/20min a 25°C para separar las células del suero. Los sueros sanguíneos se recuperaron con ayuda de una pipeta Pasteur, los sueros se centrifugaron a 12,096g/20min a 4°C para eliminar todo el resto celular. Los sueros se recuperaron nuevamente y se les determinó la concentración de proteína por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA)^[53]. Los sueros se fraccionaron en volúmenes de 100µL y se almacenaron a -70°C para su preservación por tiempo prolongado.

ii) OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE LECHE.

Para la obtención de las proteínas bovinas, la leche se procesó como se describe a continuación^[54]. Para remover los lípidos, grasas y gran parte de las caseínas, se tomaron 100mL de leche entera de vaca y en agitación se le agregó HCl concentrado. El pH se llevó a 5. La muestra se incubó a 4°C toda la noche, posteriormente, se centrifugó a 6,804g/20min a 4°C. Inmediatamente se extrajo el suero con una pipeta evitando tomar la fracción que contiene lípidos y grasas. La centrifugación se repitió para remover lo mejor posible los lípidos y grasas: a continuación, el pH se disminuyó a 4.6 con HCl. Posteriormente, la muestra se incubó a 4°C toda la noche para permitir la precipitación de una parte de las caseínas. La muestra se centrifugó a 70,560g/30min a 10°C y el suero se recuperó y se le determinó la concentración de proteína por el método colorimétrico de BCA. Se prepararon alícuotas de 15mL y se almacenaron a -70°C para su preservación.

B) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN SUERO SANGUÍNEO Y SUERO DE LECHE BOVINA.

La concentración de proteína total en los sueros sanguíneos y del suero de proteínas de leche bovina (PLB) se determinó por el método del ácido bicinconínico [53]. La curva de calibración se generó utilizando como estándar la albúmina sérica bovina, cuya concentración se determinó espectrofotométricamente a 280nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $47790\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

C) DETECCIÓN POR INMUNOENSAYOS (ELISAs) DE INMUNOGLOBULINAS “G” Y “E” ESPECÍFICAS CONTRA PROTEÍNAS DE LECHE [55,56].

Los inmunoensayos indirectos (ELISA) tanto de las proteínas totales como de las diferentes fracciones de PLB, se realizaron siguiendo el método reportado por E. Medina, et al. (2000) [55]. Para los ensayos de IgG e IgE las concentraciones de antígeno (PLB) usadas fueron: 2.5, 1.25 y 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las diluciones de sueros de pacientes y controles fueron: 1:50, 1:100 y 1: 200 para determinar IgE, y 1:200, 1:400 y 1:800 para el ensayo de IgG. Los anticuerpos secundarios anti-IgE-HRP y anti-IgG-HRP se usaron a una dilución 1:2500 y 1:5000 respectivamente

Para los ensayos de las fracciones de PLB, se usaron 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno, una dilución de sueros en 1:400 y una dilución del anti-IgG-HRP de 1:500. Después de revelar las placas con orto-fenilendiamina, la absorbancia se midió a 490nm.

D) ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS DE LECHE POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

1. DIÁLISIS DEL SUERO DE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA (PLB).

Se tomaron 10mL de suero de PLB y se dializaron en amortiguador de ácido acético 20mM pH 5.0. El suero dializado se centrifugó y filtró, quedando sólo las proteínas solubles. Posteriormente, se determinó su concentración de proteína.

2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO.

Para el enriquecimiento de las PLB, se utilizó una columna Mono S (8mL) y amortiguadores de ácido acético 20mM pH 5.0 (**amortiguador A**) y ácido acético

20mM/NaCl 1M pH 5.0 (**amortiguador B**). Después de lavar y equilibrar la columna, se siguió el esquema 1 para realizar la cromatografía.

La cromatografía se repitió al menos 5 veces, los diferentes picos de elución se colectaron y se realizó un “pool” con las fracciones similares. Las fracciones se concentraron y se les determinó la proteína total. Posteriormente, se realizaron gels de una y dos dimensiones para observar el enriquecimiento de las proteínas en las diferentes fracciones.

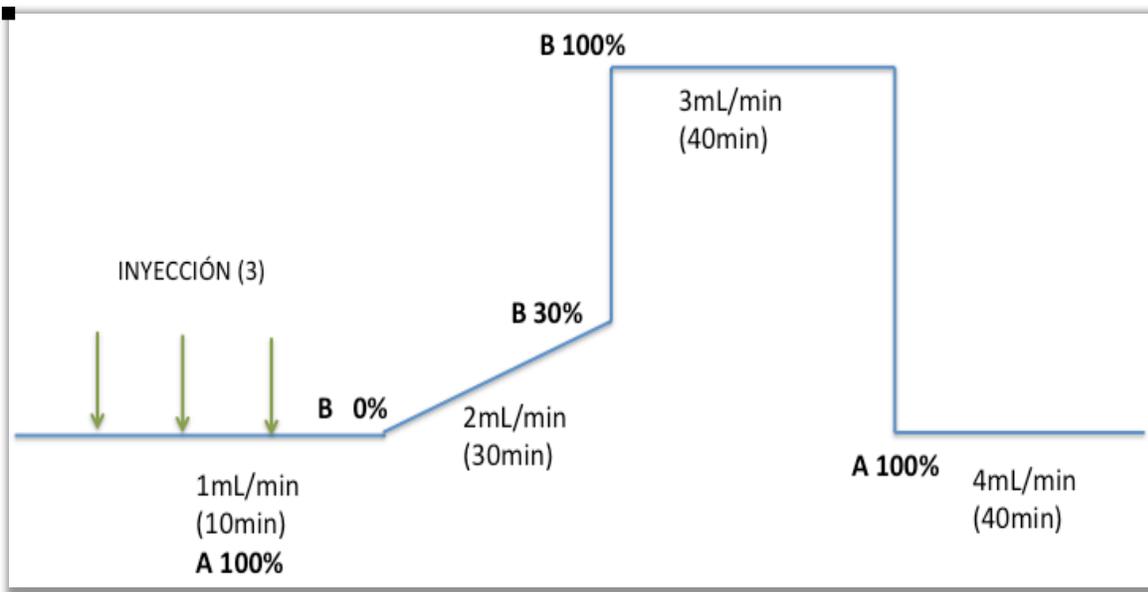


Figura 6. Esquema de inyección y elución de la cromatografía de intercambio catiónico para el enriquecimiento de PLB. Se realizaron 3 inyecciones de 1 mL por corrida, los gradientes de los amortiguadores A y B; así como las velocidades y los tiempos de flujo empleados se muestran en el esquema.

E) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN UNA DIMENSIÓN (1-D).

Los gels desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% se prepararon conforme describe el método de Laemmli ^[45]. Para su preparación, se utilizó el sistema *Bio-Rad*, todos los gels utilizados fueron de un grosor de 1mm.

Preparación de muestras.

Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (Tris 0.5M, SDS 10%, Glicerol 20%, Azul de Bromofenol 0.1%) complementado con 25mM de DTT. Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 1min en baño María. En cada

corrida electroforética se incluyeron estándares de pesos moleculares. La electroforesis se realizó a 90Volts constantes por 15min y, posteriormente, a 120Volts hasta que el frente esté por salir. Al término de la electroforesis, se procedió a teñir el gel con la técnica de Coomassie Coloidal^[48] la cual es compatible con espectrometría de masas.

F) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN DOS DIMENSIONES (2-D).

I. ISOELECTROENFOQUE (PRIMERA DIMENSIÓN).

La electroforesis 2-D se realizó conforme se describe anteriormente ^[46] con algunas modificaciones. Las muestras para el IEF se prepararon de la siguiente manera: para un volumen final de 125µL, se colocaron 150µg de PLB, 1.25µL de anfólitos (*Bio-Rad*) equivalentes a 1% final, 1.5µL de DTT equivalente a 1.2% final y amortiguador de IEF (Urea 8M, Tiourea 2M, Chaps 2%, Azul de Bromofenol 0.001%) para ajustar el volumen final. La muestra se colocó a lo largo del pozo de la cámara de IEF. Se colocó una tira de IEF (*Bio-Rad*) de 7cm/pH 3-10 encima del pozo conteniendo la muestra y posteriormente, se cubrió con 1mL de aceite mineral. El equipo se programó con las condiciones mostradas en la tabla 3:

Paso de rehidratación	12hrs	20°C	(PASIVA)	
Paso 1	250 v	20min	LINEAL	↙
Paso 2	4000v	2hrs	LINEAL	↙
Paso 3	4000v	10000/hr	RÁPIDA	→
Mantenimiento (opcional)	500v	8hrs	RÁPIDA	→

Tabla 3. Programación del equipo de IEF para la separación de proteínas en la primera dimensión (1-D).

Al terminar de correr el programa en el IEF, la tira se escurrió para eliminar el exceso de aceite mineral. La tira se incubó 10min en agitación con 800µL de Amortiguador I (Tris 0.5M, Urea 8M, Tiourea 2M, SDS 2%) suplementado con 25mM de DTT. Posteriormente, a la tira se le quitó el exceso de amortiguador y se incubó nuevamente durante 10min en agitación y oscuridad con 800µL de Amortiguador I, ahora suplementado con 100mM de iodoacetamida. Finalmente, la tira se lavó con Amortiguador I para remover el exceso de iodoacetamida sin reaccionar.

II. SEGUNDA DIMENSIÓN.

Se preparó un SDS-PAGE al 12% dejando un espacio de 1.5cm en el borde superior y sin colocar gel concentrador. Se preparó una tira de papel filtro con el marcador de peso molecular, (1µL de marcador + 1µL de Buffer de carga). Se colocaron 400µL de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en el espacio que queda en el borde superior del gel. La tira del IEF se colocó sobre el gel resolvidor, mientras que la tira con los marcadores se ubicó en el extremo izquierdo del SDS-PAGE. Después que la agarosa polimerizó, se realizó la electroforesis a 120Volts constantes hasta que el frente del gel se encontró al borde de los vidrios. Al término de la corrida, se procedió a teñir el gel para observar las proteínas contenidas en las muestras, o bien, a transferir a membrana de PVDF para el Western-blot.

G) WESTERN-BLOT CON ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES.

Al término de la electroforesis 2-D conteniendo las fracciones de PLB, el gel se embebió en amortiguador de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM pH 8.3 y MetOH 20% v/v) por 15min. La cámara de transferencia semiseca se preparó colocando los papeles filtro, sobre de estos la membrana de PVDF o nitrocelulosa y posteriormente el gel que se cubre con los papel filtro restantes ^[57]. El sistema debe estar lo suficientemente húmedo para que no se seque durante la transferencia. La transferencia se realizó a 271mA/30 min por gel transferido. Después de la corrida, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para asegurar la eficiencia de la transferencia. La membrana se destiñó con agua desionizada y posteriormente con PBS-Tween 20.

El bloqueó de las membranas se realizó con diferentes agentes como BSA (2%), gelatina de cerdo (3%) y con Polivinilpirrolidona (PVP 4%). En los diferentes ensayos, se observó un mejor bloqueo con PVP 4%/MetOH 20% incubando a 37°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados a las membranas con PBS-Tween 20. Los sueros de los pacientes con sintomatología contienen los anticuerpos (IgE y/o IgG) que reconocen las PLB antigénicas, por lo que los sueros se diluyeron 1:1000 y se agregaron a la membrana incubando 2hrs/37°C/agitación suave. Después de la incubación se repitió el lavado. El anti-IgG-HRP se diluyó a 1:5,000 y se incubó con

la membrana durante 2hrs/37°C/agitación suave. Después de la incubación, se repitió el lavado. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia usando el reactivo Luminata™ Forte (Western HRP Substrate). Después de incubar a la membrana 30seg, las membranas se fotodocumentaron en un equipo CHEMI-DOC-XRS (*Bio-Rad*), las imágenes se tomaron cada 10-15seg durante 1-2min.

H) DOT- BLOT PARA DETECTAR LAS SUBCLASES DE IgG Y LA PRESENCIA DE IgE EN SUERO.

Para realizar los Dot-Blot, se cortaron membranas de nitrocelulosa de un tamaño de 7x11cm y se embebieron en Met-OH 20%; posteriormente, se dejaron secar. La membrana se colocó en un equipo de Dot-Blot con sistema de vacío y se agregó a cada pozo 4 µL de una solución de PLB a 3mg/mL, la membrana se dejó secar y se bloqueó con PVP al 4%/Met-OH 20%/PBS-Tween 20 por 30min/25°C/agitación suave. Posteriormente, la membrana se lavó y recortó tomando tres spots. Los trozos de membrana se colocaron en tubos identificados para incubarlos con los sueros sanguíneos a diluciones de 1:250 y 1:50 por 30 min/25°C/agitación suave.

Finalmente, las membranas se lavaron e incubaron por 45min/25°C/agitación suave con el anticuerpo secundario correspondiente a las siguientes diluciones: anti-IgG-HRP: 1:5000, anti-IgG1-HRP: 1:750, anti-IgG2-HRP: 1:1500, Anti-IgG3-HRP: 1:1500, Anti-IgG4-HRP: 1:1500 y anti-IgE-HRP:1:1000. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia conforme se reportó para el ensayo tipo Western-blot.

I) FINGERPRINT DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DE DIGESTIÓN IN-GEL CON TRIPSINA.

Se realizaron por duplicado geles-2D de las fracciones con mayor carácter inmunogénico; una de las réplicas se utilizó para transferir a membrana de nitrocelulosa y realizar el Western-blot y el otro gel se tiñó con Commassie Coloidal ^[49,47] que es una técnica compatible con espectrometría de masas.

Después de localizar las proteínas en los geles-2D en base a lo que se observa en el Western-blot, los fragmentos de gel se extrajeron, se cortaron en pequeños pedazos, se destiñeron y deshidrataron con ACN 100%. Las proteínas contenidas en los fragmentos de gel se digirieron con Tripsina (Golden Promega) a una

concentración de 25µg/mL, los péptidos se extrajeron de los geles, se concentraron y purificaron usando puntas Zip-Tip^[52].

Para colocar las muestras en el equipo MALDI-ToF, se tomaron 2µL de éstas y se mezclaron con 2µL de CHCA (ácido α-ciano-4-hodriximetil cinamínico) y se aplicó 1µL de la mezcla en la placa del MALDI^[50].

J) IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ANÁLISIS DE FINGER-PRINT EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN FORMATO MALDI-ToF.

Las muestras colocadas en el MALDI-ToF (MALDI micro MXTM, Waters) se analizaron por duplicado. Los parámetros para obtener los perfiles espectrométricos fueron los siguientes: Modo: Reflectron, Lasser: 180-250% poder, LockMass: GFP, Pulso: 2007, Detector: 1987, Suppression: 900. Aquellas muestras cuyas imágenes no presentaron más de 30 cuentas por disparo de laser se eliminaron. Cada muestra se analizó por duplicado y se colectaron de 400 a 450 imágenes integrándose en una sola colección de datos para aumentar la resolución y calidad de los datos. Cada proteína presenta un perfil espectrométrico de péptidos generando una lista de las relaciones m/z (masa /carga); la lista se utiliza para identificar a la proteína existente en las bases de datos del NCBI y Expasy; éstas contienen datos del genoma bovino y de múltiples organismos. Se utilizó el programa ProteinLynx alimentado de las bases de datos **Bovine** y **Bovine-Milk** con 117,686 y 3,472 proteínas, respectivamente, provenientes del NCBI y Expasy en formato tipo FASTA. Las bases de datos utilizadas para la identificación de las proteínas antigénicas se obtuvieron del servidor de UNIPROT. La identificación se realizó por comparación de las relaciones m/z obtenidas experimentalmente con las relaciones m/z teóricas de los péptidos generados de las secuencias de las proteínas en las bases de datos. Los sistemas de puntuación (Score) generan una lista de las mejores proteínas candidatas tomando en cuenta diferentes variables para producir un score robusto. Estas variables incluyen la proteasa utilizada para generar los péptidos, disimilaridades en las masas de los péptidos debidos a errores de calibración, intensidad de los picos esperados, señal de ruido, contaminantes, presencia de modificaciones post-traduccionales como carboximetilaciones y oxidación de Met^[51].

RESULTADOS.

7.1 DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

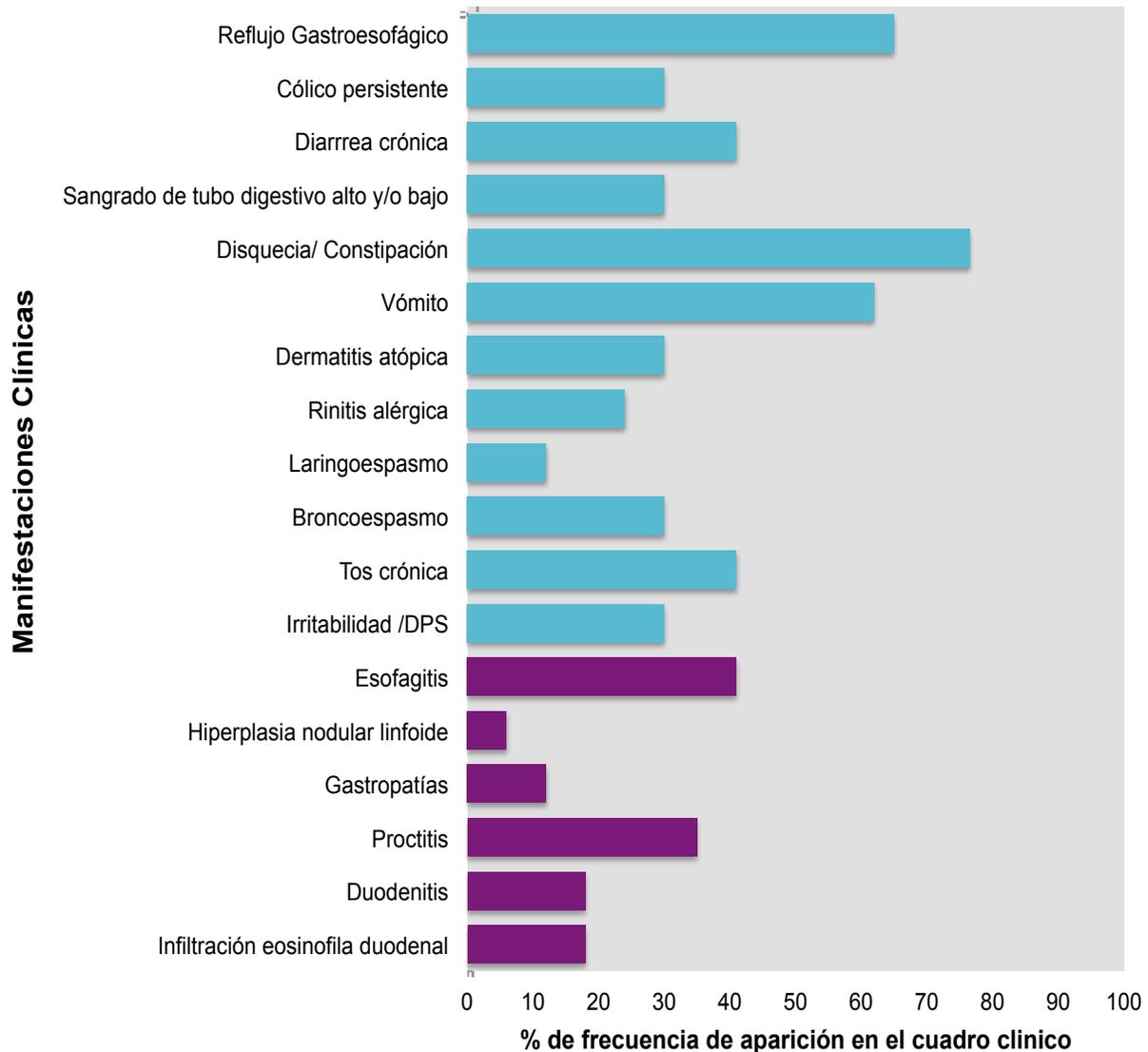
Durante el período de septiembre del 2012 a septiembre del 2013, se incluyeron al estudio 17 pacientes provenientes de los Departamentos de Gastroenterología y Alergias del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con diagnóstico clínico de Alergia a las Proteínas de Leche Bovina (APLB). Además, se incluyeron dos individuos control pareados por edad para el estudio (uno con edad de 1 año 7 meses y el otro con 2.5 meses de vida); el primero ingresó al Departamento de Urgencias por traumatismo sin antecedentes de alergias y el segundo es lactante sano que participa con consentimiento de los padres. Se tomaron muestras sanguíneas para la obtención de suero y se les determinó la concentración de proteína total por el método de BCA (ANEXO 1A).

Los pacientes presentaron diferentes manifestaciones clínicas que abarcaron desde las gastrointestinales hasta las respiratorias y dermatológicas. El reflujo gastroesofágico (65%), la disquecia y/o constipación (76%), el vómito (47%), la diarrea crónica (41%), la tos crónica (41%), la esofagitis (41%) y la proctitis (35%), son las manifestaciones más frecuentes en estos pacientes. Los datos relevantes y la frecuencia de las diversas manifestaciones clínicas de los pacientes se muestran en el cuadro 4 y en gráfica 1, respectivamente.

Cabe señalar que la mayoría de los pacientes fueron ingresados al área hospitalaria por la manifestación de síntomas clínicos agudos. De los 17 pacientes en este estudio, 16 presentaron alimentación con fórmulas desde los primeros días de vida y sólo uno fue alimentado exclusivamente con leche materna. Lo anterior evidencia una exposición crónica al antígeno en los pacientes incluidos en nuestro estudio.

Es importante mencionar que el 76% de los pacientes presentaron manifestaciones clínicas combinadas relacionadas a Alergia alimentaria mediada por IgE y Alergia no mediada por IgE; el 24% restante sólo presentan manifestaciones clínicas relacionadas a la Alergia alimentaria mediada por IgE (P8, P9, P10 y P13).

Tabla 4. Datos clínicos relevantes de los pacientes que fueron diagnosticados con Alergia a las Proteínas de Leche Bovina.	
Edad	<ul style="list-style-type: none"> • Edades de los pacientes al momento de la toma de muestra: 3 pacientes con 1 año 3 meses, 1 paciente con 8 meses y 13 pacientes con menos de 6 meses de edad.
Sexo	<ul style="list-style-type: none"> • 8 varones y 9 mujeres.
Prematurez	<ul style="list-style-type: none"> • 5:17 (29%) reportados como neonatos prematuros (<37 SDG).
Estado nutricional	<ul style="list-style-type: none"> • Al momento del diagnóstico se reporta que: 9:17 (53%) llegan con desnutrición, 7:17 (41%) lactantes eutróficos y uno sin determinar.
Antecedentes familiares de alergias	<ul style="list-style-type: none"> • 11:17(65%) con antecedentes de atopia en familiares cercanos.
Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> • 16:17 (94%) alimentación con fórmula: Donde 13:17 (76%) son alimentados con fórmula entre el día 1-15 de vida y 3:17 (18%) son alimentados con fórmula entre los 3-6 meses de vida. • Solo 1:17 (6%) alimentación exclusiva de leche materna.
Manifestaciones Gastrointestinales	<ul style="list-style-type: none"> • El 100% de los pacientes presentaron al menos una manifestación clínica gastrointestinal, entre las más frecuentes se encontró: Reflujo gastroesofágico, Cólico persistente, Diarrea crónica, Sangrado de tubo digestivo alto y/o bajo (Hematemesis, Hematoquecia y Rectorragia), Disquecia, Constipación, Vómito.
Manifestaciones Extraintestinales	<ul style="list-style-type: none"> • 8:17 (47%) presentaron manifestaciones clínicas extraintestinales como: dermatitis atópica, rinitis alérgica, broncoespasmo, tos crónica, alteraciones en el patrón del sueño e irritabilidad.
Hallazgos endoscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • 16:17 (94%) fueron sometidos a pruebas endoscópicas con extracción de biopsias, de estos sólo 7:16 (43.8%) presentaron desordenes clínicos como: Esofagitis, Hiperplasia nodular linfoide, Proctitis crónica, Gastropatía Erosiva leve, Gastropatía Eosinofílica, Bulboduodenitis nodular moderada, Duodenitis erosiva leve, Infiltración eosinofila duodenal.



Gráfica 1. Frecuencia de las manifestaciones clínicas gastrointestinales y extraintestinales presentadas por los pacientes con diagnóstico clínico de APLB. En azul se muestran las manifestaciones clínicas relacionadas a alergia alimentaria mediada por IgE y en magenta, las manifestaciones clínicas relacionadas a la alergia alimentaria no mediada por IgE.

7.2 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ANTICUERPO PRESENTE EN SUERO.

En esta primer parte del trabajo, únicamente se consideró las reacciones de hipersensibilidad que están mediadas por anticuerpos. El enfoque fue identificar el tipo de inmunoglobulinas (IgE y/o IgG) expresadas en el suero de los pacientes y que son específicas contra PLB. Posteriormente, se realizó la identificación de proteínas de carácter alérgico que desencadenan la respuesta inmune.

A) DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA “E” ESPECÍFICA CONTRA PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA.

I) DETECCIÓN DE IgE CON IMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISA).

Los pacientes se dividieron en dos grupos para hacer una mejor comparación con los controles:

- **Grupo 1:** Pacientes y control con menos de un año de edad.
- **Grupo 2:** Pacientes y control entre 1 y 2 años.

El ensayo realizado a 2.5µg/mL de PLB y una dilución de suero 1:50 fue donde se observó una señal considerable; sin embargo en todos los casos se obtuvieron señales de absorbancia muy bajas que fueron desde 0.1009 hasta 0.2961 (Tabla 5). Con las señales de absorbancia, se realizó el calculo del número de veces que aumentó el reconocimiento de las IgE's en el suero de los pacientes con respecto al control (Tabla 5).

Al analizar estos datos observamos 3 situaciones:

- 1) Aumento en la absorbancia con respecto al control (pacientes: P1, P2, P3, P9, P11, P12, P14, P15, P17, P18), desde 1.13 hasta 1.37 veces, el máximo aumento se obtuvo en el P14 (1.37 veces).
- 2) Disminución en la absorbancia con respecto al control (pacientes: P5, P7, P8, P13, P16)
- 3) Misma absorbancia con respecto al control (pacientes: P6 y P10).

Debido a las bajas absorbancias que se obtuvieron en el ensayo, se evaluó la sensibilidad para IgE. Al realizar una curva de concentración de IgE encontramos que por debajo de los 25ng de IgE el sistema pierde sensibilidad manteniéndose la señal por debajo de los 0.2 U.A. (ANEXO 2).

En conjunto, los resultados mostraron un incremento en la señal en el 59% de los pacientes en comparación con los controles. Sin embargo, la poca sensibilidad del ELISA dificultó discernir entre la señal de las IgE presentes en suero con respecto al ruido intrínseco del ensayo. Para lograr determinar la existencia de IgE específica contra PLB en el suero de los pacientes, buscamos una técnica con mayor sensibilidad. La técnica de Dot-blot revelada por quimioluminiscencia nos permitió detectar hasta 3.6ng de IgE (ANEXO 3).

Muestra de Suero	ABS (490 nm) ABS ± DE	Coefficiente de Variación %C.V.	(ABS.Pn)/(ABS.CTL) No. de veces que aumenta el reconocimiento de las IgE vs las PLB.
CTL1*	0.2961 ± 0.0252	8.53	-----
CTL2	0.1388 ± 0.0019	1.43	-----
P1	0.1626 ± 0.0042	2.61	1.17
P2	0.1685 ± 0.0057	3.36	1.21
P3	0.15725 ± 0.0136	8.68	1.13
P5*	0.22645 ± 0.0035	1.53	0.76
P6	0.1394 ± 0.0042	3.04	1.00
P7*	0.22495 ± 7.1E-05	0.03	0.76
P8	0.1178 ± 0.0052	4.38	0.85
P9	0.1591 ± 0.0088	5.56	1.15
P10	0.1394 ± 0.0163	11.67	1.00
P11	0.1737 ± 0.001	0.57	1.25
P12	0.1900 ± 0.0058	3.05	1.37
P13	0.1009 ± 0.0052	5.19	0.73
P14	0.1897 ± 0.0078	4.14	1.37
P15	0.1751 ± 0.0060	3.43	1.26
P16*	0.2863 ± 0.0274	9.58	0.97
P17	0.1871 ± 0.0253	13.53	1.35
P18	0.1725 ± 0.0076	4.43	1.24

Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos con los ensayos a 2.5µg/mL de antígeno y dilución 1:50. Los valores de absorbancia se obtuvieron al realizar 3 repeticiones de los ensayos, el CV muestra la variabilidad que existe entre ellas. Los cocientes de las absorbancias de cada uno de los pacientes entre la absorbancia del control (ABS. Pn/ABS. CTL) muestra el número de veces que aumenta el reconocimiento de las IgE por las PLB en los pacientes con respecto al control, correspondiente según la clasificación por edad.

(*) Se muestra los pacientes y control que se encuentran entre 1 y 2 años de edad (Grupo2).

II) DETECCIÓN DE IgE CON DOT-BLOT.

Con la técnica de Dot-Blot se logró observar presencia de IgE específica contra PLB en el suero del 76% de los pacientes. La Figura 7 ilustra que las muestras de los pacientes P1, P5, P6, P8, P9, P10, P11 y P16 presentaron una señal definida de IgE; las muestras P2, P3, P7, P12 y P13 exhibieron una señal discreta contra el anticuerpo, en tanto que en las muestras P14, P15, P17 y P18 no se observó señal para IgE. En comparación con la ELISA la técnica de Dot-Blot nos permitió

determinar la presencia de IgE específica contra PLB, aunque la información que brinda es cualitativa.

Detección de IgE por Dot-blot						
CTL1	CTL2	P1	P2	P3	P5	P6
P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
P14	P15	P16	P17	P18		

Figura 7. Dot-Blot para detección de IgE. Las flechas indican las membranas donde se observó una señal clara a causa de la presencia de IgE en el suero de los pacientes. Las flechas azules indican las membranas con una señal clara, las flechas rojas indican presencia de una señal tenue.

Los experimentos de Dot-blot mostraron discrepancia con los resultados obtenidos por ELISA. En los ensayos tipo ELISA, se observó que los pacientes P14, P15, P17 y P18 tuvieron señales mayores en comparación al control (ver Tabla 5). Con el Dot-blot, en ninguno de estos casos se obtuvo señal. Esta discrepancia puede explicarse a que los valores de absorbancia obtenidos en la ELISA para tales muestras se localizaron donde la señal permanece constante y pierde sensibilidad, por lo que los valores se mantuvieron en el rango del ruido impidiendo cuantificar claramente la presencia de IgE. Otro dato interesante se observó en las muestras de pacientes con manifestaciones clínicas relacionadas exclusivamente a la alergia alimentaria mediada por IgE (P8, P9, P10 y P13). En el caso de la ELISA, únicamente P9 tuvo una señal de absorbancia de 1.15 veces por arriba del control, mientras que con Dot Blot se observaron señales de IgE en todos estos casos.

B) DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G ESPECÍFICA CONTRA PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA.

Para la determinación de IgG, se observaron buenas señales en las diferentes condiciones. Para seleccionar las mejores condiciones en las que se observa el reconocimiento de las IgGs contra las PLB, se realizaron gráficos de absorbancia a 490 nm vs diluciones de suero en las diferentes concentraciones de antígeno (gráficas 2A, 2B y 2C). Las gráficas se compararon para elegir la condición donde se puede observar una mayor diferencia entre los valores de absorbancia del control con respecto a los valores de los paciente con menor reacción a las PLB.

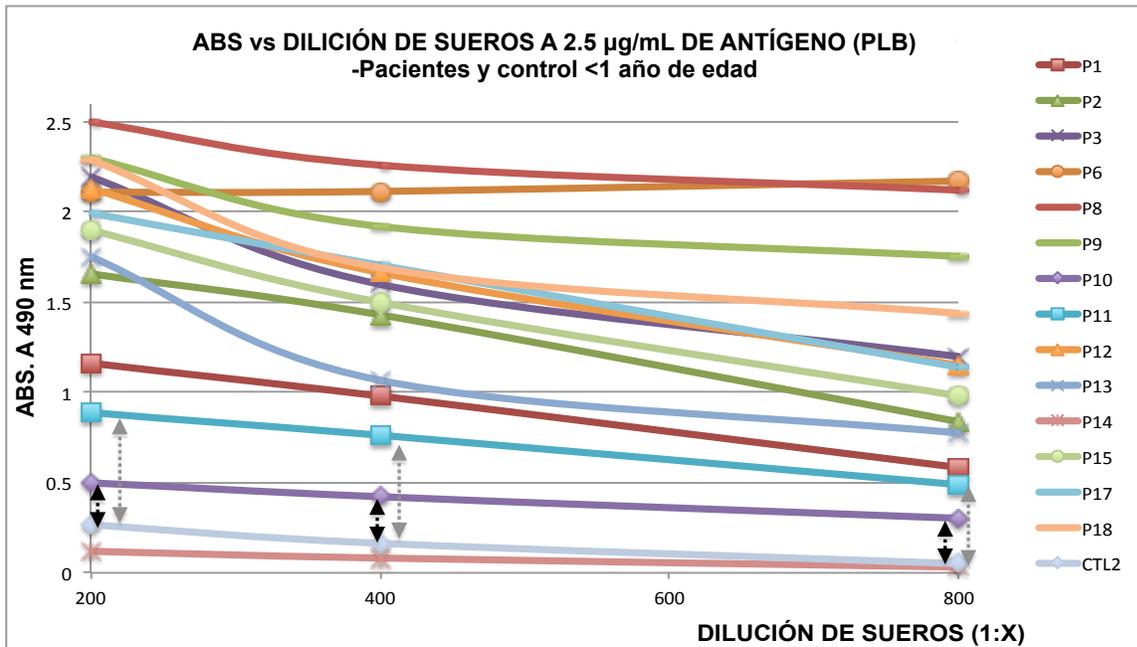
Los pacientes se dividieron en dos grupos para hacer una mejor comparación con los controles:

- **Grupo 1:** Pacientes y control con menos de un año de edad.
- **Grupo 2:** Pacientes y control entre 1 y 2 años.

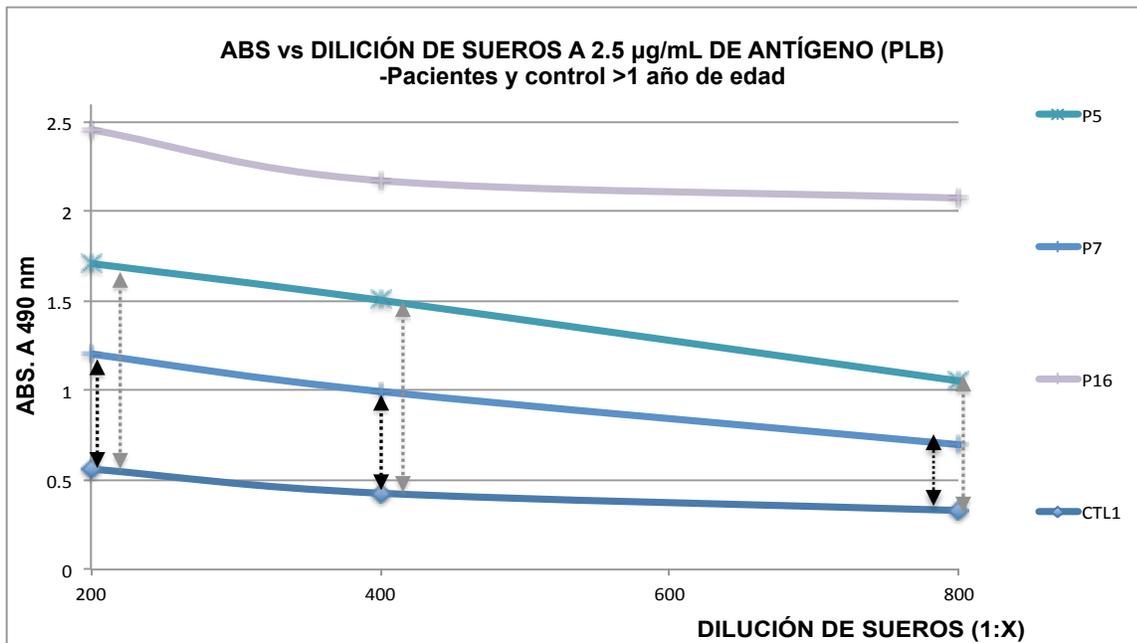
Para hacer la selección de las condiciones óptimas del ensayo en el Grupo 1, se descartó la muestra P14 por poseer los valores de absorbancia más bajos; incluso por debajo de los valores del control, por lo que se tomaron los valores de absorbancia de P10 y P11. En el caso del Grupo 2, se usaron los valores de absorbancia de P7 y P5 para comparar con el control.

Los gráficos 2A a C, muestran que en el caso del Grupo 1 las diferencias de absorbancia se observan más acentuadas en los ensayos que se realizaron a una dilución 1:200 y una concentración de antígeno de 2.5µg/mL con 0.2318 y 0.5825 U.A entre el control y el P10 y P11 respectivamente. Por otro lado, en el Grupo 2, con las concentraciones de antígeno de 2.5 y dilución de suero 1: 200, las diferencias de absorbancia entre el control, el P5 y P7 fueron 1.1845 y 0.6643 U.A. En las condiciones restantes, las diferencias de absorbancia fueron menores. Por tanto, los ensayos fueron repetidos en tres ocasiones usando diluciones 1:200 y concentración de antígeno de 2.5µg/mL, en la tabla 6 se muestran las absorbancias promedio con su desviación estándar, incluyendo el número de veces que aumenta el reconocimiento de las IgGs en el suero de cada uno de los pacientes respecto al control. Se encontró que a excepción de la muestra P14, la reacción de las IgG específicas contra PLB fueron desde 2.1 hasta 9.2 veces en comparación al control.

I)



II)



Grafica 2A. Gráficas de Absorbancia a 490 nm vs diluciones de suero (1:200, 1:400 y 1:800) con antígeno (PLB) a 2.5µg/mL para la detección de IgG específica vs las PLB.

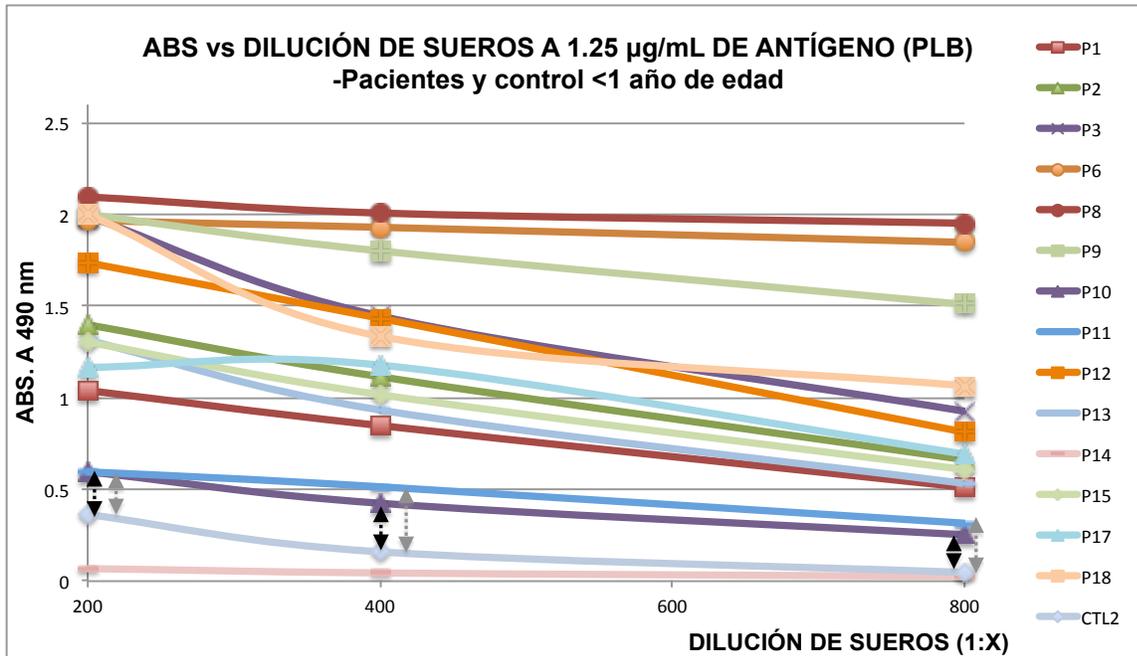
I) Grupo 1: pacientes con menos de 1 año de edad (P1, P2, P3, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18 y control 2 (CTL2)).

II) Grupo 2: pacientes entre 1 y 2 años (P5, P7, P16 y control 1(CTL1)).

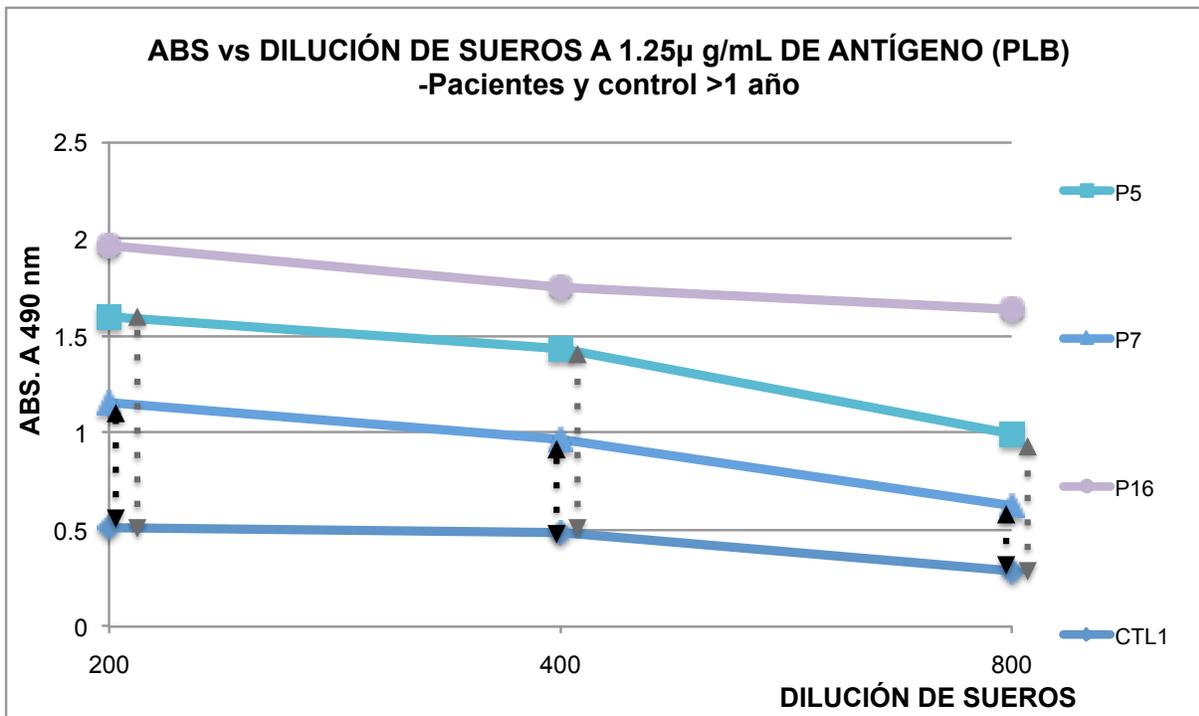
◄●●●► Indican la distancia entre el control y el paciente con menor respuesta en cada grupo.

◄●●●► Indican la distancia entre el control y el paciente que sigue en menor respuesta.

I)



II)



Grafica 2B. Gráficas de Absorbancia a 490 nm vs diluciones de suero (1:200, 1:400 y 1:800) con antígeno (PLB) a 1.25µg/mL para la detección de IgG específica vs PLB.

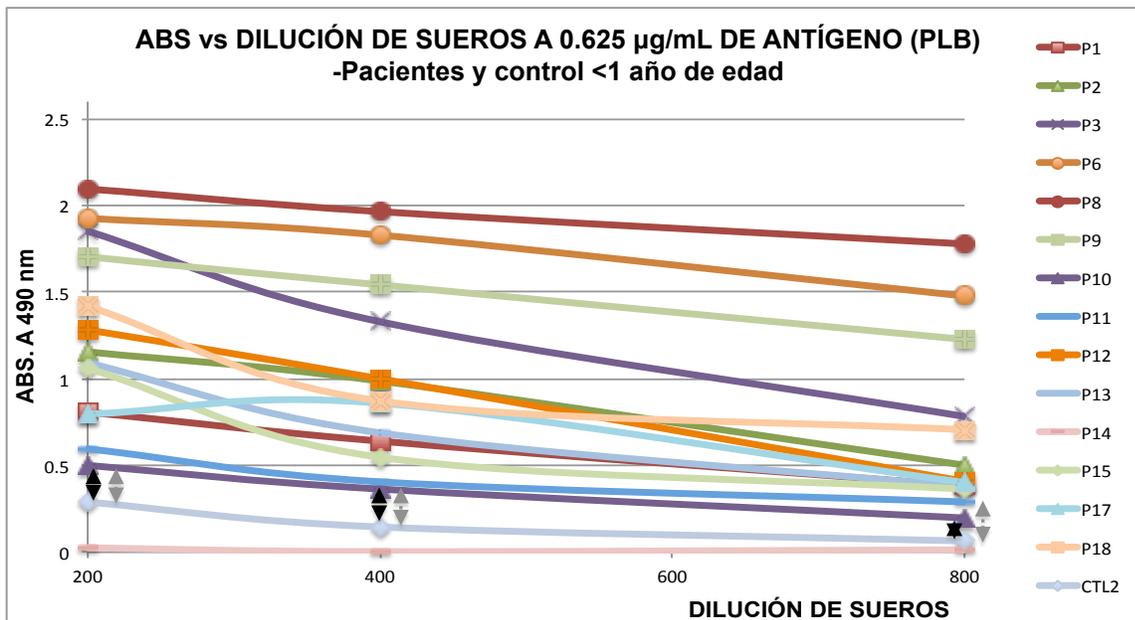
I) Grupo 1: pacientes con menos de 1 año de edad (P1, P2, P3, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18 y control 2 (CTL2)).

II) Grupo 2: pacientes entre 1 y 2 años (P5, P7, P16 y control 1(CTL1)).

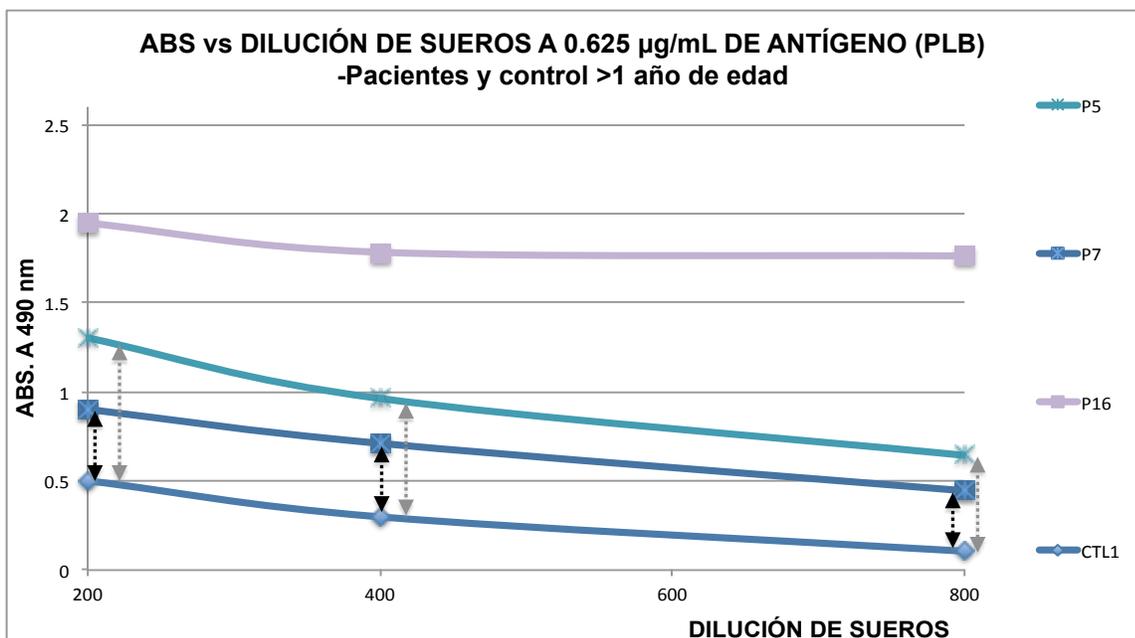
◄◄◄◄ Indican la distancia entre el control y el paciente con menor respuesta en cada grupo.

◄◄◄◄ Indican la distancia entre el control y el paciente que sigue en menor respuesta.

I)



II)



Grafica 2C. Gráficas de Absorbancia a 490 nm vs diluciones de suero (1:200, 1:400 y 1:800) con antígeno (PLB) a 0.625µg/mL para la detección de IgG específica vs PLB.

I) Grupo 1: pacientes con menos de 1 año de edad (P1, P2, P3, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18 y control 2 (CTL2)).

II) Grupo 2: pacientes entre 1 y 2 años (P5, P7, P16 y control 1(CTL1)).

◄◄◄◄ Indican la distancia entre el control y el paciente con menor respuesta en cada grupo.

◄◄◄◄ Indican la distancia entre el control y el paciente que sigue en menor respuesta.

Muestra de Suero	ABS (490 nm) ABS ± DE	Coefficiente de Variación (%) %C.V.	(ABS.Pn)/(ABS.CTL) No. de veces que aumenta el reconocimiento de las IgG vs las PLB.
CTL1*	0.5544 ± 0.0236	4.26	-----
CTL2	0.2641 ± 0.0121	4.57	-----
P1	1.6127 ± 0.0825	5.11	6.11
P2	2.0957 ± 0.0849	4.05	7.94
P3	2.1782 ± 0.0697	3.20	8.25
P5*	2.0157 ± 0.1104	5.48	3.64
P6	2.4216 ± 0.0726	3.00	9.17
P7*	1.6191 ± 0.0266	1.64	2.92
P8	2.5250 ± 0.0611	2.42	9.56
P9	2.2461 ± 0.0521	2.32	8.51
P10	0.5580 ± 0.0194	3.47	2.11
P11	0.8362 ± 0.0427	5.11	3.17
P12	1.8007 ± 0.0526	2.92	6.82
P13	1.6532 ± 0.0710	4.29	6.26
P14	0.1086 ± 0.0098	9.05	0.4
P15	1.8693 ± 0.1491	7.97	7.08
P16*	2.4074 ± 0.0743	3.09	4.34
P17	1.9169 ± 0.0623	3.25	7.26
P18	2.1027 ± 0.0919	4.37	7.96

TABLA 6. Valores de absorbancia obtenidos con los ensayos a 2.5µg/mL de antígeno y dilución 1:200. Los valores de absorbancia se obtuvieron del promedio de 3 repeticiones de ensayos. El %CV muestra la variabilidad que existe entre las muestras. Los cocientes de las absorbancias de cada uno de los pacientes entre la absorbancia del control (ABS. Pn/ABS. CTL) muestra el número de veces que aumentó el reconocimiento de las IgGs por las PLB en los pacientes respecto al control, correspondiente según la clasificación por edad.

(*) Se muestra los pacientes y control que se encuentran entre 1 y 2 años de edad (Grupo2).

Es importante señalar que los pacientes que presentaron únicamente manifestaciones clínicas relacionadas a la alergia alimentaria mediada por IgE (P8,P9,P10 y P13), muestran interesantemente altas señales para IgG específica contra PLB, con 9.56, 8.51, 2.11 y 6.26 veces respecto al control.

Estos resultados muestran que el 94% de los pacientes desarrollaron IgG específica contra PLB en altos niveles. Los datos contrastan con la evidencia clínica que indica que el 76% de los pacientes presentan manifestaciones relacionadas a una alergia alimentaria no mediada por IgE ^[30,31]. Lo anterior es interesante desde el punto de vista de los mecanismos inmunológicos que se han descrito y de la consideración de

que la IgE es la inmunoglobulina de mayor importancia en el desarrollo de las alergias.

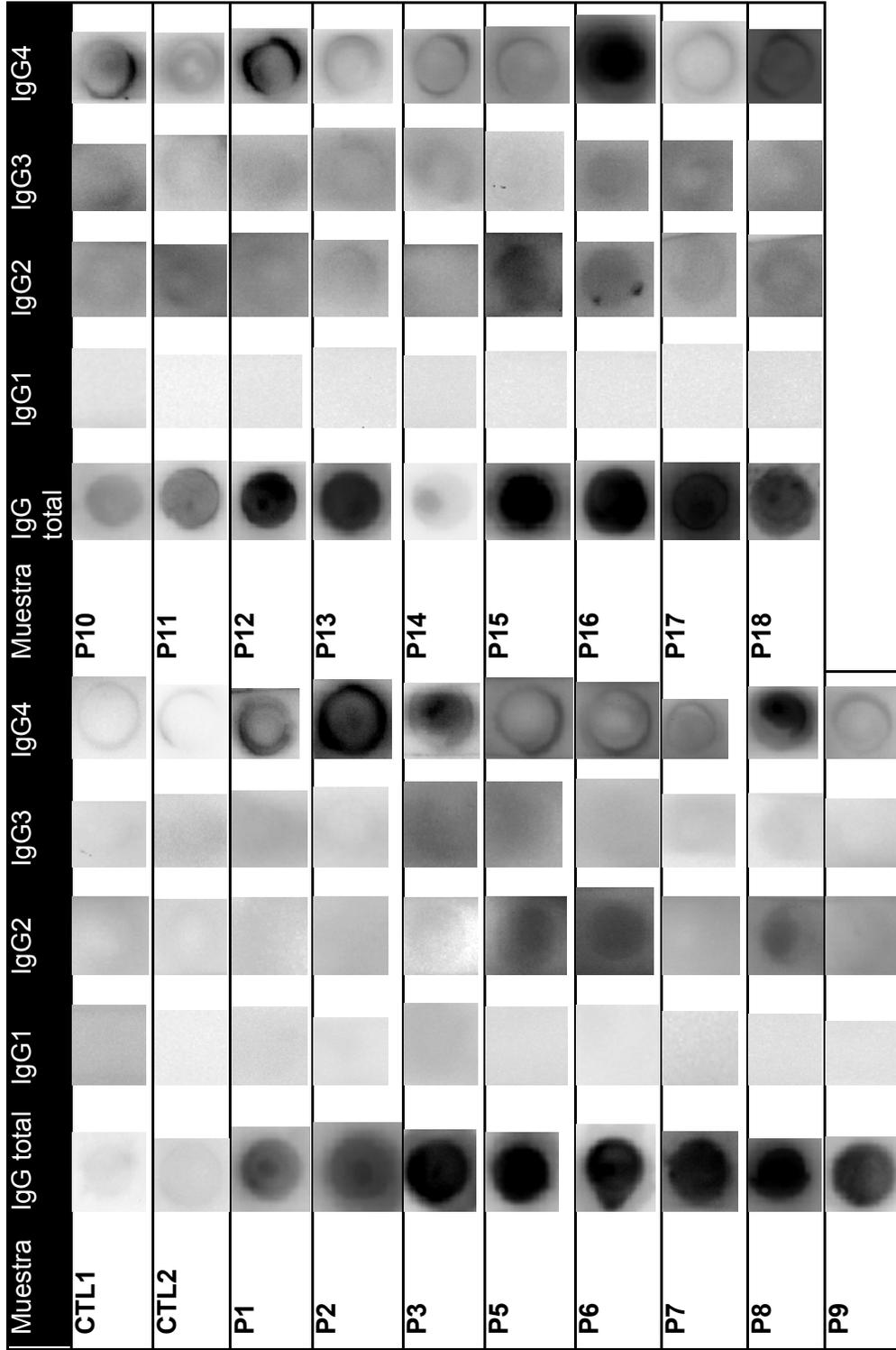
7.3 DETERMINACIÓN DE SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINA G.

Para determinar qué subclase de IgG está presente en los sueros de los pacientes, se realizó una tipificación con Dot-blot (Figura 8). Los resultados se describen a continuación:

- **IgG1:** Para ninguna muestra se logró percibir.
- **IgG2:** P5, P6, P8, P11, P12, P13, P15, P16, P17 y P18.
- **IgG3:** P3, P5, P6, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16 y P17.
- **IgG4:** P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17 y P18.

En resumen, la señal más clara correspondió a la IgG4 que se puede observar en todos los pacientes. Los controles exhibieron una señal muy discreta para IgG. Para IgG2 e IgG3, se observó una señal baja únicamente en algunos pacientes. La muestra P14 mostró una señal por debajo del control tanto en las ELISAs como en el Dot-blot para IgG total. Con este ensayo, fue posible observar una señal más evidente para los subtipos IgG3 e IgG4. Además, es importante aclarar que para realizar la detección de IgG1 se ensayaron diluciones más bajas para el anticuerpo secundario, a pesar de esto, en ninguna muestra se logró obtener señal.

Figura 8. Subclases de la IgG en el suero de los diferentes pacientes se realizó con Dot-Blot. Diferentes membranas con PLB se incubaron con los sueros de los pacientes y controles, en experimentos



7.4 ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA EN BAJA CONCENTRACIÓN USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

En el suero de Leche Bovina, existen alrededor de 200 diferentes proteínas; sin embargo, algunas proteínas como las caseínas y sus diferentes isoformas se encuentran en altas concentraciones, mientras que la abundancia de las proteínas restantes es muy baja. Por esta razón, es difícil observar a estas últimas, tanto en geles de una dimensión (separación por peso molecular) como en geles 2-D (separación de proteínas por punto isoeléctrico y por peso molecular)(ANEXO 4) .

Con el propósito de aumentar la concentración de proteínas de menor abundancia, realizamos una separación por cromatografía de intercambio catiónico con la cual se consiguieron 5 fracciones (Figura 9A). La separación cromatográfica se realizó por triplicado, cada una de las fracciones se concentró y dializó para posteriormente determinar la concentración de proteína total por BCA (ANEXO 1). Las diferentes fracciones se colocaron en un SDS-PAGE para observar el patrón de enriquecimiento en cada una de ellas y compararlas contra el suero de proteínas de leche bovina (PLB). La figura 9B muestra que existen proteínas que se encuentran en más de una fracción; tal es el caso de las proteínas que tienen peso molecular cercano a 21 KDa, 31 KDa y 60 KDa. Esto podría explicarse al considerar que las caseínas presentan diferentes isoformas de distinto pI y forman complejos con otras proteínas que son difíciles de separar^[81]. Por otro lado, al comparar cada una de las fracciones mediante geles bidimensionales, se observa con más claridad el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia (Figura 10).

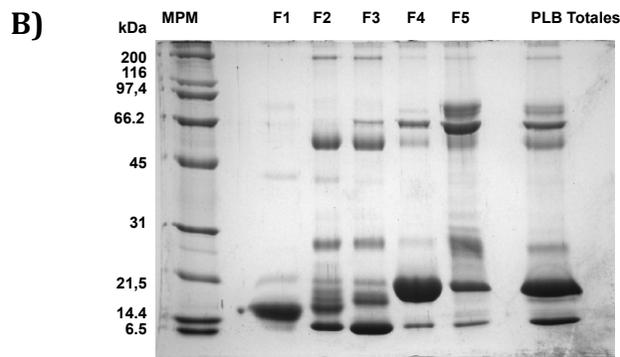
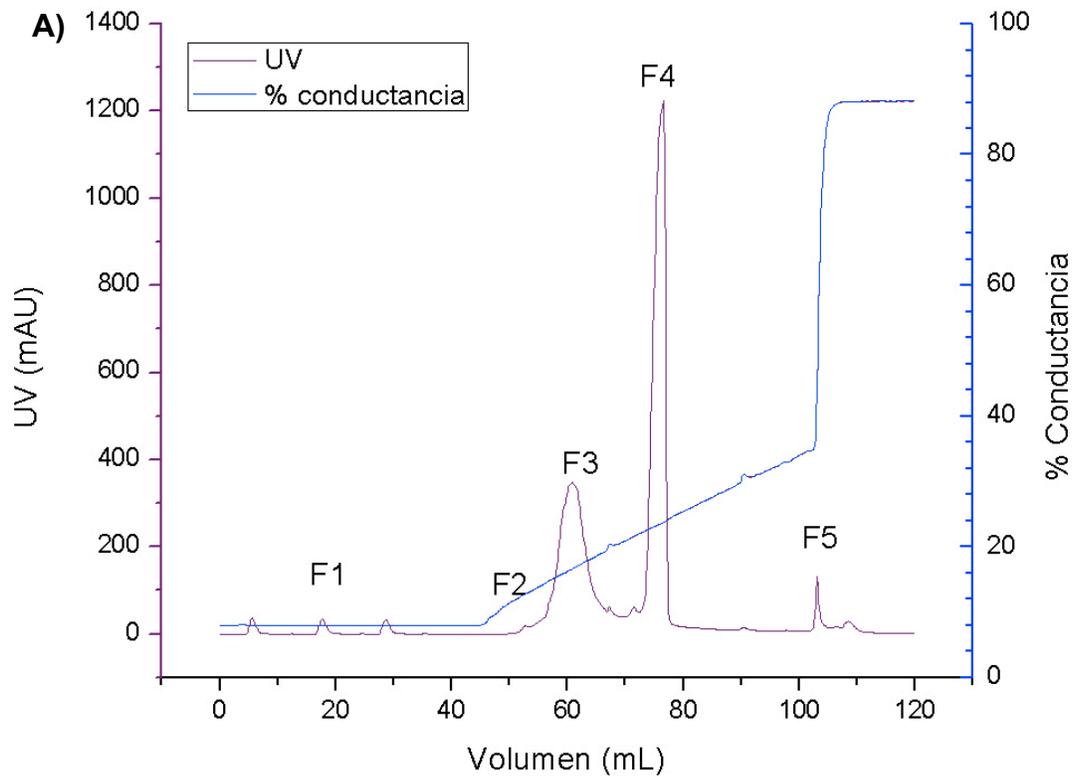


Figura 9. (A) Cromatograma de las fracciones de suero de leche bovina, donde se obtuvieron 5 fracciones. Los primeros 3 picos (Fracción 1) corresponden a lo que no se retuvo en la columna después de 3 inyecciones de muestra. U.A (unidades arbitrarias de absorbancia). **(B)** SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas, se observa que las proteínas de Peso molecular (PM) de 21 KDa, 31 KDa y 60 KDa se encuentran presentes en las diferentes fracciones.

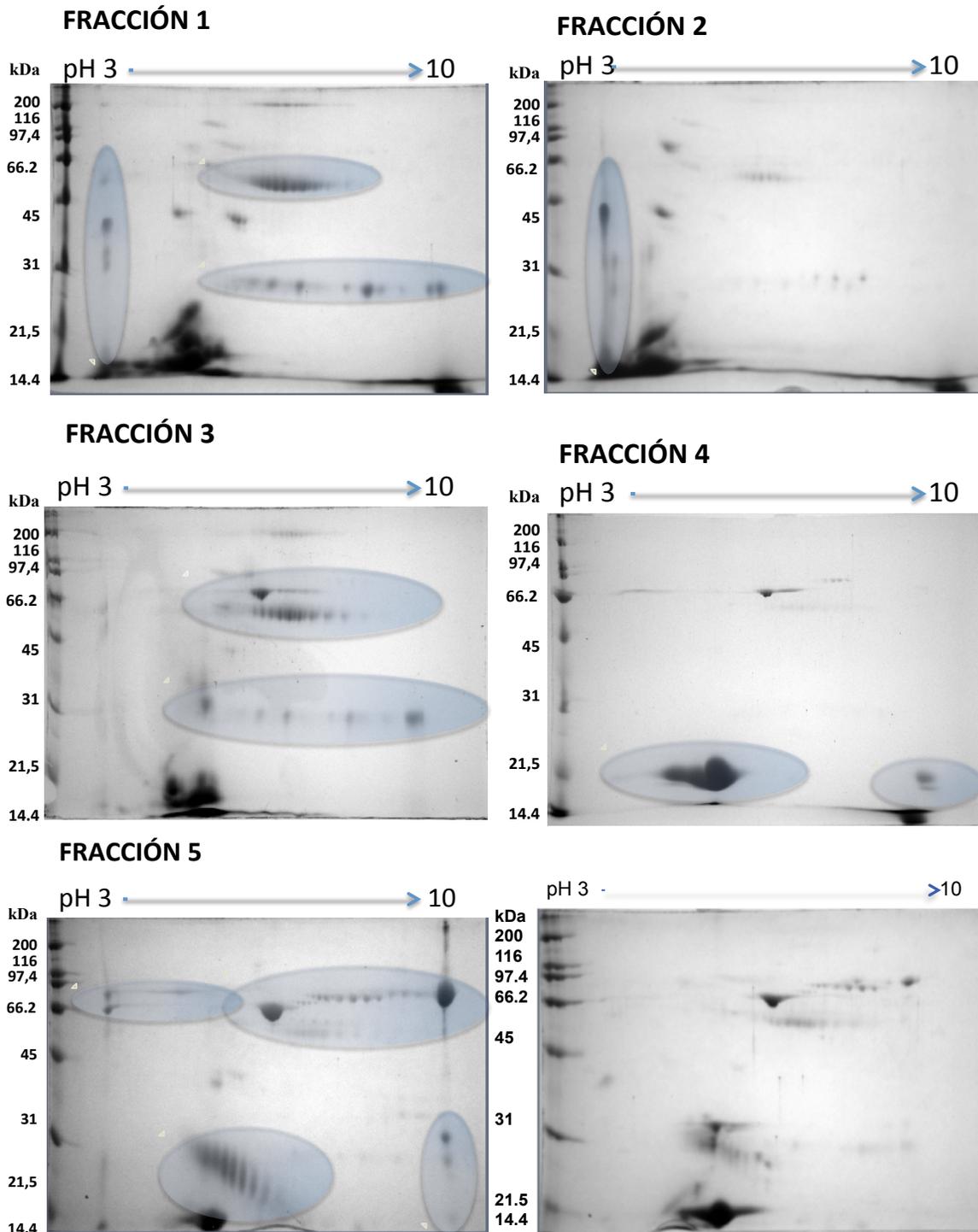
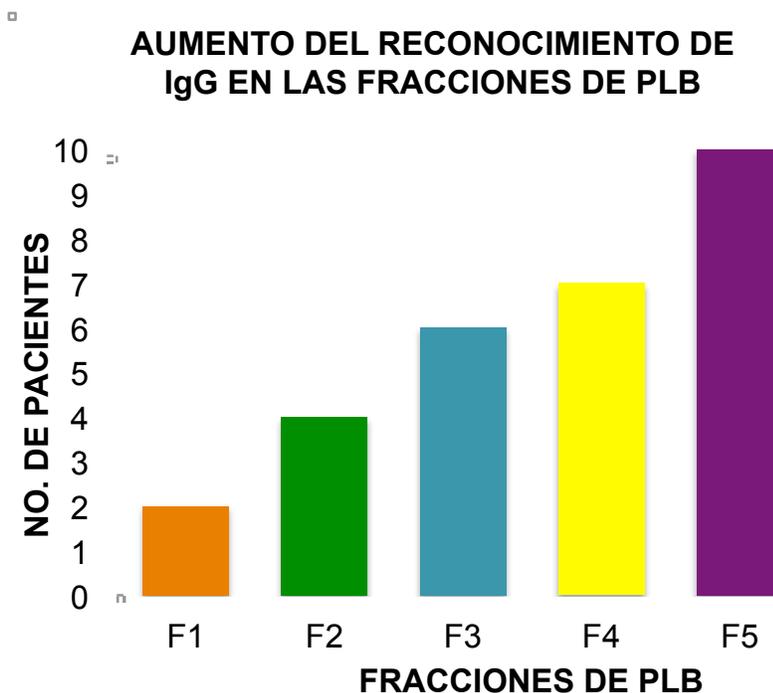


Figura 10. SDS-PAGE 2-D para observar el patrón proteico en cada fracción de PLB. Para realizar la separación por punto isoeléctrico en cada una de las tiras de isoelectroenfoque (pH 3-10, 7cm) se colocó 150µg de cada fracción, posteriormente, se realizó la separación por peso molecular. En los óvalos se muestran las regiones donde hubo mayor enriquecimiento en cada fracción.

7.5 INMUNOENSAYOS PARA DETERMINAR LAS FRACCIONES DE LECHE BOVINA CON LAS PROTEÍNAS MÁS ALERGÉNICAS.

Aprovechando las altas señales obtenidas con IgG, decidimos usar esta inmunoglobulina para realizar la identificación de proteínas alergénicas en la leche bovina. Con las diferentes fracciones, se realizaron inmunoensayos indirectos (ELISAs) para determinar si en alguna fracción se enriquecen las proteínas de leche bovina con carácter alergénico. Con los datos de absorbancia de cada paciente, se graficó el cociente de la absorbancia obtenida en cada una de las fracciones entre la absorbancia obtenida con las PLB totales (ANEXO 5).

En este caso, la respuesta en la que nos enfocamos es el aumento en el reconocimiento de los anticuerpos; ya que indica un aumento en la concentración de proteínas de carácter alergénico. Siguiendo estas respuestas, se observa que las fracciones que tienden a aumentar en mayor medida el reconocimiento de los anticuerpos son las fracciones 3, 4 y 5 (gráfica 3). En la tabla 7 se muestran los pacientes que aumentaron la respuesta en cada una de las fracciones.



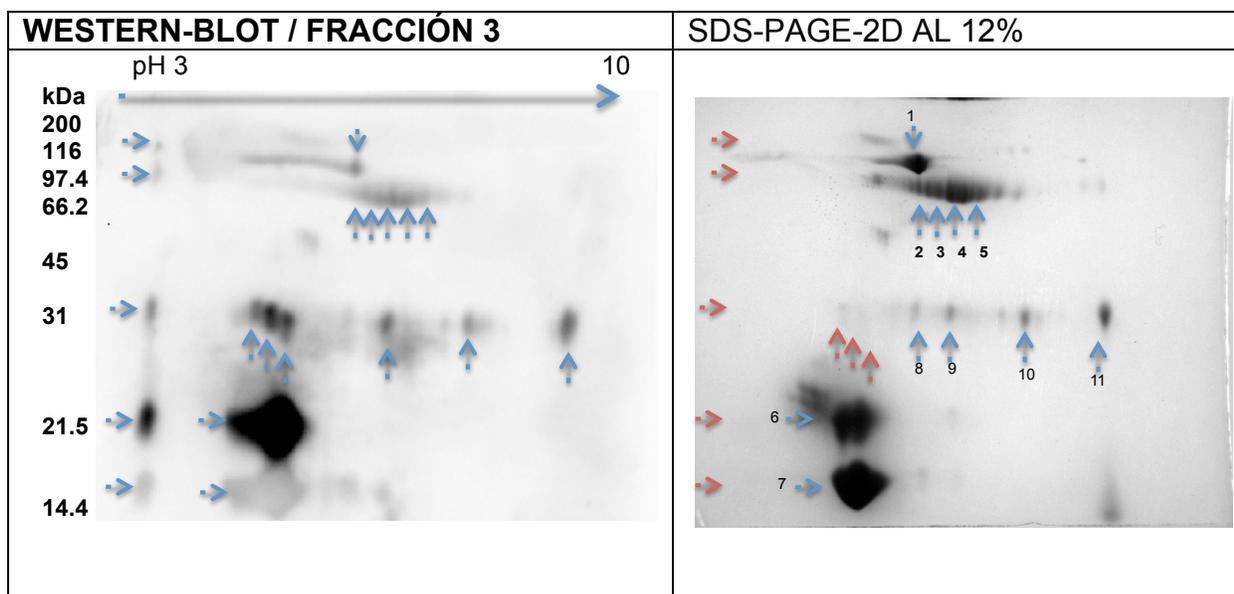
Gráfica 3. Aumento en el reconocimiento de IgG vs las fracciones de PLB. Las señales de absorbancia aumentaron notoriamente en las fracciones 3, 4 y 5 con 35%, 42% y 59%, respectivamente.

Fracción	Pacientes donde se observó el aumento en el reconocimiento de las IgGs en las diferentes fracciones
F1	P8 y P9
F2	P5, P8, P9 y P11
F3	P7, P9, P11, P13, P14, P16
F4	CTL1, P1, P9, P10, P12, P13, P15
F5	P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11

Tabla 7. Relación de los pacientes que aumentaron el reconocimiento con respecto a cada fracción. Las fracciones con mayor señal fueron la Fracción 3, 4 y 5, reconocidas por diferentes pacientes.

7.6 LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA INMUNOGÉNICAS MEDIANTE WESTERN-BLOT.

Para localizar las proteínas que son reconocidas por las IgGs en los sueros de los pacientes, se realizaron Western-blot a partir de SDS-PAGE-2D. Se usaron las fracciones determinadas con mayor carácter antigénico (F3, F4 y F5) y se realizó un Western-blot por cada paciente (ANEXO 6) con la fracción en la que aumentó más el reconocimiento de las IgG. Para condensar el total de las proteínas reconocidas por los pacientes en cada fracción, se realizó un Western-blot con un “pool” de los sueros en cada una de las fracciones (Figura 11). Los SDS-PAGE-2D se realizaron por duplicado, uno para transferirlo a membrana de nitrocelulosa para el Western-blot y el otro para teñirlo con Commassie Coloidal y extraer las proteínas para su identificación.



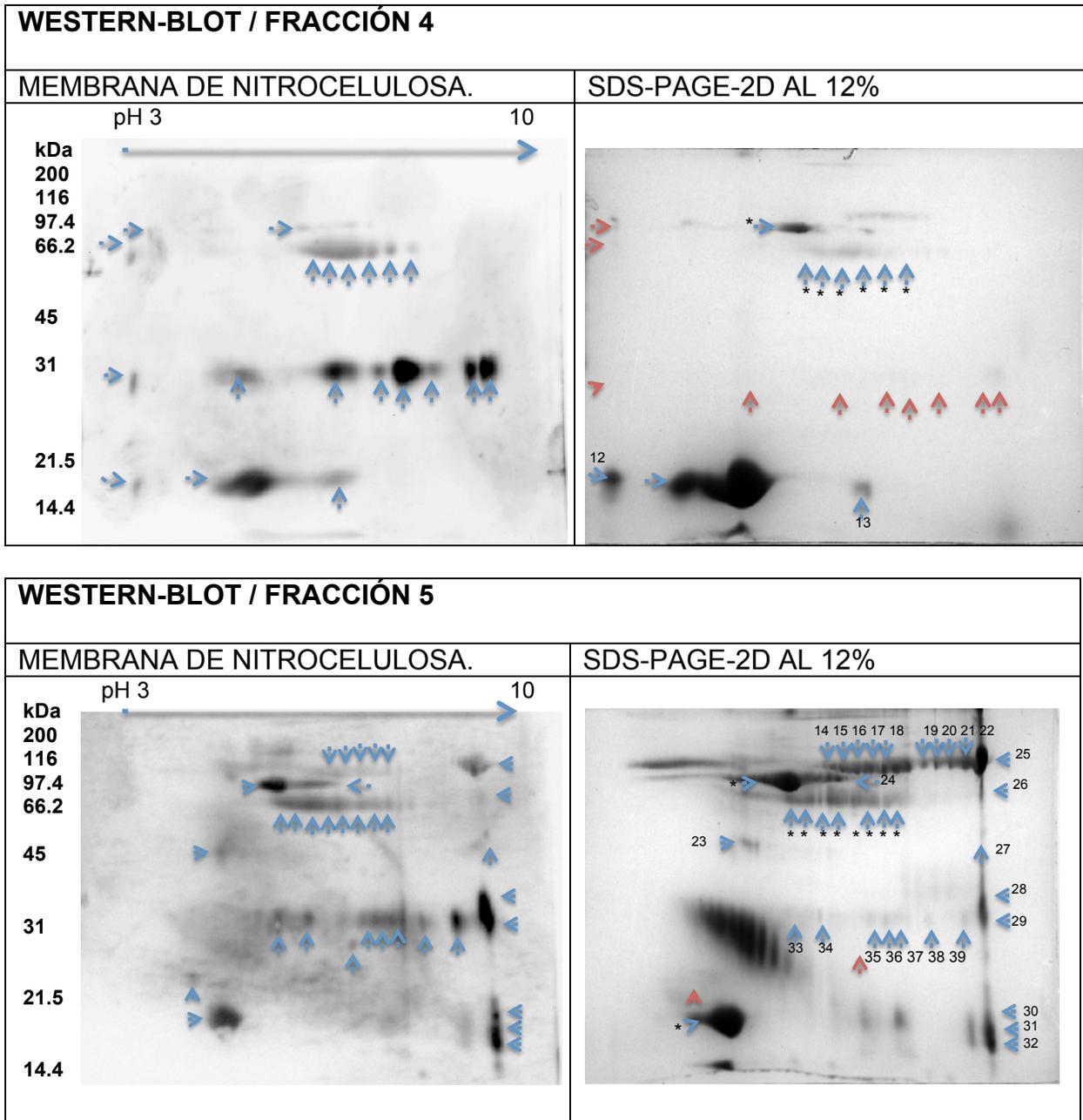


Figura 11. Western-blot con las fracciones de mayor antigenicidad. El Western-blot de cada una de las fracciones se realizó con un "pool" de los sueros de aquellos pacientes que aumentaron su reconocimiento por dichas fracciones.

F3: P7, P11, P16

F4: P8, P12, P13, P15, P17, P18

F5: P1, P2, P3, P5, P6, P9, P10, P14

Se realizaron duplicados de los SDS-PAGE-2D, uno para realizar el Western-blot y el otro para teñirlo con Commassie Coloidal y extraer las proteínas antigénicas para su identificación. En las membranas se señalan las proteínas reconocidas por las IgG de los pacientes; en el panel de los SDS-PAGE-2D se señalan las proteínas que se visualizaron (35 proteínas). Las flechas rojas indican proteínas localizadas en la membrana pero que no se observan en los geles y las flechas con (*) indican las proteínas que se repiten en las fracciones.

La **Figura 11** ilustra un rango amplio de proteínas antigénicas detectadas, desde las que tienen peso molecular (PM) cercano a los 14KDa hasta las cercanas a 97 KDa, y punto isoeléctrico (pI) de entre 3 a 10. Al realizar la comparación de las membranas con el gel, encontramos proteínas que pueden observarse en la membrana pero no en el gel, lo que podría indicar que proteínas que se encuentran en muy bajas concentraciones en la leche pueden actuar como potentes alérgenos. Otro punto interesante es que al realizar la comparación entre los Western-blot que se realizaron individualmente (Anexo 6) y el Western que se realizó con el pool de sueros de pacientes (Figura 11); se observaron 20 proteínas que individualmente no pueden observarse, siendo la fracción 4 donde se puede apreciar mejor esta particularidad. Lo anterior puede deberse a un efecto sinérgico de los anticuerpos al realizar el pool. En general, con los Western-blot se localizaron cerca de 59 proteínas que fueron reconocidas en las diferentes fracciones por las IgGs en los sueros de los pacientes; sin embargo, sólo 39 se visualizan en los geles. Estas proteínas se colectarán posteriormente para su identificación.

7.7 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS POR EM-MALDI-ToF.

Las proteínas antigénicas que pueden visualizarse en los geles de las diferentes fracciones se extrajeron y procesaron para su identificación por Finger-Print en EM-MALDI-ToF. Los datos de espectrometría de masas son procesados en el programa Proteín-Lynx alimentado de las bases de datos BOVINE y BOVINE-MILK de UNIPROT; cada base de datos contiene 117,686 y 3,472 proteínas, respectivamente. Los resultados obtenidos del análisis para la identificación se asocian con los datos de PM y pI observados en los geles. Las proteínas identificadas hasta ahora se describen en la Tabla 5. albúmina sérica, α -S1-caseína, α -S2-caseína, α -lactalbúmina, lactoperoxidasa y Protein-FAM13A (Tabla 8).

De las proteínas que se identificaron, es evidente que 10 de los 17 pacientes identifican a la proteína s1-caseína como antigénica. Sin embargo, es difícil realizar la misma comparación con el resto de las proteínas, esta comparación se espera que sea más sencilla realizar al finalizar la identificación de todas las proteínas.

Fracción	Spot	Código de acceso	Nombre de la proteína	PM (KDa)/pI Experimental	PM (KDa)/pI Calculado por secuencia	No. de péptidos	Covertura (%)	Score
F3, F4	1	P02769	Albúmina sérica	71.3 / 6	69.25 / 5.76	8	14.5	99.8
F3	6	B5B3R8	α -s1-caseína	25 / 5	24.4 / 4.9	4	19.6	39.3
F3, F4	7	P00712	α -Latalbúmina	17.8 / 5.2	16.25 / 5.06	7	41	69
F5	19,20, 21,22	P80025	Lactoperoxidasa	89 / 8.5	80.6 / 8.83	39	53	99.3
F5	25	P80025	Lactoperoxidasa	89 / 8.5	80.6 / 8.83	39	53	74.2
F5	24	Q8HYW0	PROTEIN FAM 13A	80.3 / 6	80.1 / 5.45	12	25.5	100
F5	33	P04655	α -s2-caseína	32.8 / 6.5	25.8 / 5.88	7	20	100
F5	34	P02663	α -s2-caseína	29.8 / 9	26.02 / 8.55	13	49.5	57

Tabla 8. Proteínas antigénicas de la leche bovina identificadas. Se muestran las fracciones en las que se encuentran estas proteínas, los datos experimentales y calculados por secuencia del Peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI), la cobertura y el score de identificación de cada proteína.

VIII. DISCUSIÓN.

La APLB es la alergia alimentaria más común en infantes. En las últimas décadas la incidencia mundial de esta patología está incrementando principalmente en países en desarrollo debido primordialmente a la disminución de la lactancia materna durante los primeros meses de vida. Lo anterior trae como consecuencia la exposición temprana a proteínas de carácter alergénico en recién nacidos ^[58, 59]. El diagnóstico de la APLB es complejo y tiene que realizarse con el uso de varias pruebas diagnósticas; las dietas de eliminación y las pruebas de reto al alimento son esenciales para el diagnóstico y tratamiento de este problema ^[60,61].

En el INP, el diagnóstico que se realiza para estos pacientes se basa principalmente en su historia clínica, la búsqueda histológica de daño inmunológico por medio de pruebas endoscópicas y, en la minoría de los casos, la determinación de inmunoglobulinas totales en suero. En la mayoría de los pacientes, las pruebas endoscópicas muestran poca o nula evidencia del daño inmunológico en tejidos. En nuestro caso, de los 17 niños reclutados el 94% fue sometido a pruebas endoscópicas encontrando evidencia de daño inmunológico en el 44%. Por otro lado, la determinación de inmunoglobulinas realizadas por los laboratorios de rutina se centran únicamente en la determinación de inmunoglobulinas totales en lugar de realizar la búsqueda de inmunoglobulinas específicas contra el alérgeno causante de

la sintomatología. C. Vieira et al, (2010)^[62] plantea que la prescripción efectiva de las dietas de eliminación junto con adecuadas dietas de sustitución en infantes con síntomas sugestivos de APLB, son necesarias para controlar los síntomas de la alergia y la desnutrición en infantes^[62]. Esto se debe de efectuar partiendo del diagnóstico adecuado de los pacientes con posible APLB, este diagnóstico debe estar basado en los mecanismos inmunológicos que se desarrollan en esta patología así como en las proteínas de leche de carácter alergénico que producen la sintomatología. Tal información se vuelve esencial para el correcto tratamiento a seguir.

En general, la mayoría de los autores aceptan que la APLB es mediada o no por IgE, con el desarrollo de 4 tipos de mecanismos inmunológicos que pueden presentarse individual o combinadamente (**ANEXO 7**). Sin embargo, se estima que el mecanismo más frecuente en la APLB es el mediado por la IgE, por lo que se ha considerado como un marcador de persistencia en la alergia alimentaria y la inmunoglobulina más importante en los procesos de alergia.

De acuerdo a los datos clínicos de los pacientes resumidos en la tabla 4 y gráfica 1 y considerando la clasificación de los síntomas descritas en la tabla 1, el 100% de los pacientes presentaron manifestaciones clínicas relacionadas con la alergia alimentaria mediada por IgE. Sin embargo, es interesante destacar que dentro de este grupo encontramos que el 76% presentan manifestaciones clínicas combinadas de alergia alimentaria mediada y no mediada por IgE. El 24% que presentó exclusivamente las manifestaciones de alergia mediada por IgE lo integran los pacientes P8, P9, P10 y P13.

Partiendo de esta primera observación, podemos afirmar que si bien se describe en la literatura a la reacción mediada por IgE como la principal forma de manifestación, en nuestro grupo poblacional encontramos una mayor prevalencia de pacientes que clínicamente serían clasificados con reacción alérgica combinada. En este contexto, es importante destacar que 16 de nuestros pacientes presentaron exposición de leche bovina a muy temprana edad, circunstancia que puede explicar la combinación de manifestaciones.

8.1 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE INMUNOGLOBULINA ESPECÍFICA CONTRA PLB EN SUERO DE PACIENTES.

En base a la evidencia inmunológica derivada de las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes, realizamos varios ensayos para determinar la presencia de IgG e IgE en suero de los pacientes específicas contra PLB.

Los inmunoensayos tipo ELISA no fueron concluyentes para demostrar la presencia de IgE en suero de los pacientes (Tabla 5). Sin embargo, el ensayo Dot-Blot demostró cualitativamente la presencia de esta inmunoglobulina en 13 de los 17 pacientes. Esto indica que en el 76% de los pacientes la reacción tipo I está interviniendo en las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes.

Por otro lado, los inmunoensayos realizados para la determinación de IgG específica contra PLB no dejaron dudas de la presencia de IgG específica contra proteínas de leche bovina (PLB), obteniéndose grandes diferencias de absorbancia en comparación con los controles; desde 2.1 veces hasta 9.2 veces (Tabla 6). Incluso los pacientes que sólo presentaron manifestaciones clínicas mediadas por IgE mostraron IgG incrementadas. Además, todos los pacientes presentaron niveles detectables de IgG4 por Dot-blot (Figura 2).

El uso de técnicas más sensibles y alérgeno-específicas, como el ensayo de ELISA por quimioluminiscencia, podría resolver el problema de detección de IgE. En nuestro laboratorio se están llevando a cabo ensayos para montar este tipo de metodología. Por otro lado, el uso de radioinmunoensayo (RIA) que es una técnica más sensible, puede ayudar a observar con mayor claridad la presencia de IgE específica contra PLB.

8.2 ¿MECANISMO INMUNOLÓGICO MEDIADO O NO POR IgE?

Lo anteriormente expuesto nos lleva a plantear diversas preguntas: ¿Porqué si las manifestaciones clínicas indican presencia de IgE es tan difícil determinarla? Si la alergia alimentaria es comúnmente mediada por IgE, ¿porqué la IgG se encuentra en niveles tan elevados? ¿Qué papel tiene la IgG, en especial la IgG4, en el desarrollo de la APLB? A continuación, describimos las posibles respuestas a estas incógnitas.

La *IgE* es el anticuerpo producido en las reacciones alérgicas y en las reacciones de defensa contra parásitos. De los 5 isotipos de inmunoglobulinas (*IgA*, *IgG*, *IgM*, *IgD* e *IgE*), la concentración en suero de *IgE* es la más baja. Esta circunstancia dificulta su cuantificación. En ausencia de enfermedad, los niveles en cordón umbilical son bajos (<2 kIU/L; <4.8 mg/L) y se incrementa gradualmente durante la infancia llegando a un pico máximo entre los 10 y 15 años de edad y disminuye a lo largo de la edad adulta (D.K. Stone et al 2010)^[69]. Por otro lado, la *IgE* tiene una vida media corta de aproximadamente 2 días en circulación, por lo que es difícil determinarla cuando se toman muestras posteriores al tiempo en que se presentó la exposición a un alérgeno. De acuerdo al Colegio Mexicano de Pediatras Especialistas en Inmunología Clínica y Alergia^[63] los individuos alérgicos frecuentemente tienen niveles mucho más altos de *IgE* en su sangre que los no alérgicos. Sin embargo, algunos alérgicos tienen valores normales de *IgE* en su sangre y puede también haber individuos con *IgE* elevada en su sangre sin ser alérgica. Estos inconvenientes deben de tomarse en cuenta cuando se realiza la búsqueda de *IgE* en suero ya que pueden darse falsos positivos o falsos negativos con las pruebas de rutina^[34,35,37].

Se sabe que la síntesis de *IgE* por las células B ocurre en baja razón comparada con otros isotipos de inmunoglobulinas, tal como *IgG1*, *IgG4* e *IgA*, incluso en situaciones de alergia (Aelberse, et al 2004)^[64]. Estas células plasmáticas necesitan interaccionar primero con células Th2 y recibir señales para realizar el cambio de isotipo, estas señales son provistas principalmente por IL-4 e IL-13. En las últimas dos décadas, se ha propuesto que algunas citocinas promueven la síntesis de *IgG4* en la misma vía en la que se desarrolla la *IgE* (reacción de hipersensibilidad tipo I), esto depende del microambiente celular generado por la liberación de diferentes interleucinas. En este sentido, Ishizaka et al. (1990)^[65] estudiaron el efecto inductor de la IL-4 en la síntesis de *IgG4* e *IgE* en linfocito de sangre periférica humana donde obtuvo varias conclusiones:

- La IL-4 induce la síntesis de *IgG4* e *IgE*, mientras que dicha interleucina no afectó la síntesis de *IgG1*, *IgG2* e *IgG3*.

- La síntesis de IgG4 se induce de manera dosis-dependiente a la presencia de IL-4.

En el mismo trabajo, se evaluó el efecto inhibitor del INF- γ observando que IgG4 es menos sensible que la IgE a estos efectos de inhibición; a bajas concentraciones de INF- γ , las células B continúan sintetizando IgG4.

Jenmalm et al. (1999) ^[66] estudiaron la dependencia que existe entre la secreción de citocinas inducidas por alérgenos, su asociación a síntomas atópicos y a la síntesis de subclases de IgG e IgE. Utilizando muestras de pacientes pediátricos con síntomas de atopia, asoció la expresión de interleucinas y las inmunoglobulinas encontradas en suero, los resultados sobresalientes fueron:

- IL-4: Asociada a la síntesis de IgE en células B.
- IL-4 e IL-6: Asociadas a la síntesis de IgG4.
- IL-6 e IL-10: Asociadas a la síntesis de IgG4 e IgG2.
- IL-13: Induce la síntesis de IgE independientemente de la IL-4.
- IL-5: Causa inflamación alérgica por promover la maduración de eosinofilos, adhesión a endotelio, cebadores de la respuesta quimiotáctica, activación, degranulación, supervivencia y citotoxicidad.

Finalmente, concluyó que los síntomas atópicos están relacionados con altos niveles de IgG4 expresándose predominantemente en condiciones de exposición crónica al antígeno y que en pacientes con síntomas de atopia, los niveles de IgG4 son similares a los niveles de IgG1.

Otros autores relacionaron a la IgG4 como una inmunoglobulina alérgeno-específica en enfermedades atópicas (Aelberse et al, 1993)^[67] o en algunos casos, causantes de la exposición de nuevos epítopes en la superficie del alérgeno, posterior a la unión de IgG4; lo que puede llevar al aumento de la reacción alérgica al facilitar el reconocimiento de IgE por la presencia de estos nuevos epítopes (Eibensteiner et al, 1999).

Para comprender de qué manera podrían estar involucradas las IgG en el desarrollo de la APLB, es necesario entender la función de los receptores de alta afinidad en mastocitos, ya que estas células se encuentran principalmente en el

tracto gastrointestinal y en superficie de mucosas provocando las principales manifestaciones relacionadas a la alergia alimentaria mediada por IgE.

8.3 RECEPTORES EN MASTOCITOS.

Existen 2 receptores para IgE: uno de baja afinidad **FcεRII:CD23**, expresado en la superficie de las células B y en otras células hematopoyéticas, el otro receptor de gran afinidad es **FcεRI** (K_d : 10^{-9} a 10^{-10} M), expresado en mastocitos y basófilos como tetrámero ($\alpha\beta\gamma_2$) y células presentadoras de antígeno como trímero ($\alpha\gamma_2$). La expresión de las cadenas β en mastocitos incrementan en su superficie la expresión de FcεRI y la amplificación de la señal a través del receptor.

Los FcεRI no tienen una actividad enzimática conocida, sin embargo, su señal se asocia a tirosin-quinasas citoplasmáticas. Las cadenas α de FcεRI se unen a la porción Fc de las IgE; estas cadenas consisten en un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un tallo corto citoplasmático. La subunidad β consiste de 4 dominios transmembranales con un único ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) asociado a Lyn cinasa. La subunidad γ forma un dímero con puentes disulfuro, cada subunidad γ contiene un ITAM.

Después de la agregación de FcεRI por el reconocimiento de un antígeno multivalente por la IgE, Lyn cinasa fosforila residuos de tirosina en las ITAMs de las subunidades β y γ , las ITAM entonces reclutan a Syk cinasa que activa una serie de eventos de señalización asociados a la activación y degranulación. En general, se induce la exocitosis de gránulos, generación de mediadores derivados del ácido araquidónico (leucotrienos y prostaglandinas) y una alta regulación de mRNA de un gran número de citocinas y quimiocinas (D.K. Stone et al, 2009) ^[69].

Dándole un giro inesperado a la firme idea de que la IgE es exclusiva de la mediación de la activación y degranulación de mastocitos y basófilos, Oettgen et al (1994)^[70], realizó un estudio con ratones IgE-deficientes. El grupo encontró que los ratones presentan anafilaxis activa y altas concentraciones de histamina al estar en contacto con un alérgeno; en su estudio concluyó que en roedores hay otros mecanismos que pueden activar la reacción de hipersensibilidad, independientes a la activación de los receptores FcεRI por IgE.

¿Pero en humanos existen otros mecanismos para activar estas reacciones de hipersensibilidad?

Recientemente, se ha reportado que mastocitos humanos expresan en su superficie receptores **Fc γ RI** después de ser sometidos a un tratamiento con IFN- γ . (Okayama et al, 2000) ^[71]. Desde 1991 Van de Winkel y Anderson ^[72], describieron al receptor **Fc γ RI** como un receptor de alta de afinidad para IgG (K_d : 10^{-9} a 10^{-10} M); es expresado en la superficie de mastocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y eosinófilos como un complejo trimérico $\alpha\gamma 2$ (Heijnen et al, 1997)^[73]. Este receptor presenta tres dominios extracelulares en la cadena α , los cuales reconocen la porción Fc en la IgG. Para el caso de los mastocitos, el reconocimiento de Fc de las IgG desencadena la señalización derivando la activación y degranulación por la misma vía donde intervine la IgE y su receptor (Figura 12).

Woolhiser et al (2001)^[74], Okayama et al (2001)^[75] y Tkaczyk et al (2001)^[76] estudiaron independientemente la activación de los receptores **Fc γ RI** (CD64) por IgG. Las conclusiones más interesantes de sus trabajos fueron:

- ❖ Los mastocitos humanos pueden activarse y degranularse en los sitios de inflamación a través de mecanismos IgG-dependientes.
- ❖ Los perfiles de mediación a través de la activación de Fc γ RI en mastocitos es indistinguible cualitativamente de la respuesta observada a través de los Fc ϵ RI de alta afinidad para IgE.
- ❖ La activación IgG-dependiente de mastocitos humanos *in vitro* se realiza después de la sub-regulación de Fc γ RI por INF- γ . Primordialmente, por interacción de los receptores con IgG1 e IgG4, donde la degranulación mediada por IgG1 ocurre independientemente de los receptores Fc ϵ RI y la degranulación mediada por IgG4 puede depender o no de Fc ϵ RI, ya que IgG4 puede unirse también a este receptor.

Receptores asociados a la activación de mastocitos y basófilos.

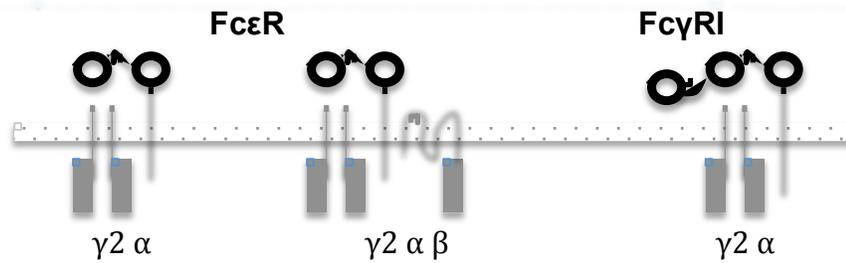


Figura 12. Receptores Fc para IgE (FcεRI) e IgG (FcγRI), ambos receptores están formados por una cadena α que reconoce el Fc de las inmunoglobulinas correspondientes y por un dímero de cadenas γ. En el caso de mastocitos y basófilos, los FcεRI se asocian con una cadena β extra.

Por último, las consecuencias biológicas observadas por la activación de mastocitos por los receptores para IgG son similares a las observadas en la activación IgE-dependiente:

- Liberación de mediadores proinflamatorios como proteasas e histamina.
- Generación de derivados de ácido araquidónico.
- Síntesis y liberación de citocinas y quimiocinas
- Exocitosis de los gránulos.

Es importante insistir que la expresión de los receptores FcγRI se vinculan fuertemente con la inducción por INF-γ. Analizando la figura 13, donde se representan las vías de señalización para cada tipo de reacción de hipersensibilidad, se observa que en la vía donde proliferan células Th1 (reacción tipo 4) se produce liberación de INF-γ, la cual de acuerdo a la evidencia anterior promueve la expresión de receptores FcγRI en mastocitos.

Generalmente, la literatura muestra que en la inducción de células T hacia Th1 o Th2, sólo una de las vías se desarrolla, esto depende de las citocinas secretadas al microambiente celular. Por un lado, la IL-4 promueve la proliferación de células Th2 las cuales a su vez, liberan citocinas que favorecen la síntesis de IgE e IgG4 e inhiben la liberación de INF-γ por las Th1. Mientras que la IL-2 promueve la proliferación de células Th1 promoviendo la liberación de INF-γ y la activación de numerosas células, lo que puede llevar a derivar en las reacciones de hipersensibilidad tipo 2 o 3 y en la inhibición de la proliferación de las Th2. Sin

embargo, en las reacciones de hipersensibilidad alimentaria parece ser que estos mecanismos inmunológicos pueden presentarse simultáneamente (Figura 13).

Otro dato interesante que evidencia la manifestación de mecanismos combinados, es que en la vía de las Th2 se favorece la proliferación de eosinófilos, los cuales se ha reportado su activación vía receptores de alta afinidad a IgG (FcγRI/CD32) e IgA (FcαRI/CD89), las cuales en su mayoría son sintetizadas por la vía de las Th1.

En conclusión, todo lo anterior plantea otras vías de activación y degranulación de mastocitos que hasta ahora se había relacionado solamente con la presencia de IgE y su interacción con receptores de alta afinidad.

8.4 IDENTIFICACIÓN POR INMUNOPROTEÓMICA DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS.

La leche bovina contiene diferentes proteínas, se considera que existen cerca de 200 proteínas diferentes en la leche bovina pero únicamente algunas se han reconocido como potenciales alérgenos.

Al acidificar la leche entera a un pH de 4.6/20°C, se pueden obtener 2 fracciones:

1. El coagulo que posee en su gran mayoría caseínas, las cuales forman el 80% de las proteínas totales en la leche.
2. Las proteínas del suero que representan el 20% restante del total de las proteínas en la leche.

En *Bos taurus domesticus*, la fracción de las caseínas (80% de las proteínas totales) consiste en 4 isoformas en diferentes proporciones: αS1-caseína (32%), α-S2-caseína (10%), β-caseína (28%) y κ-caseína (10%); de este grupo, la αS1-caseína se considera como el alérgeno más importante de este grupo.

Los alérgenos reportados que se encuentran en el suero son: α-Lactalbúmina (5%), β-lactaglobulina (10%), inmunoglobulinas, albúmina sérica bovina y trazas de lactoferrina. Se considera a la α-Lactalbúmina y la β-lactaglobulina como los alérgenos más importantes en las proteínas del suero de leche bovina. (Wal et al, 1998) ^[77].

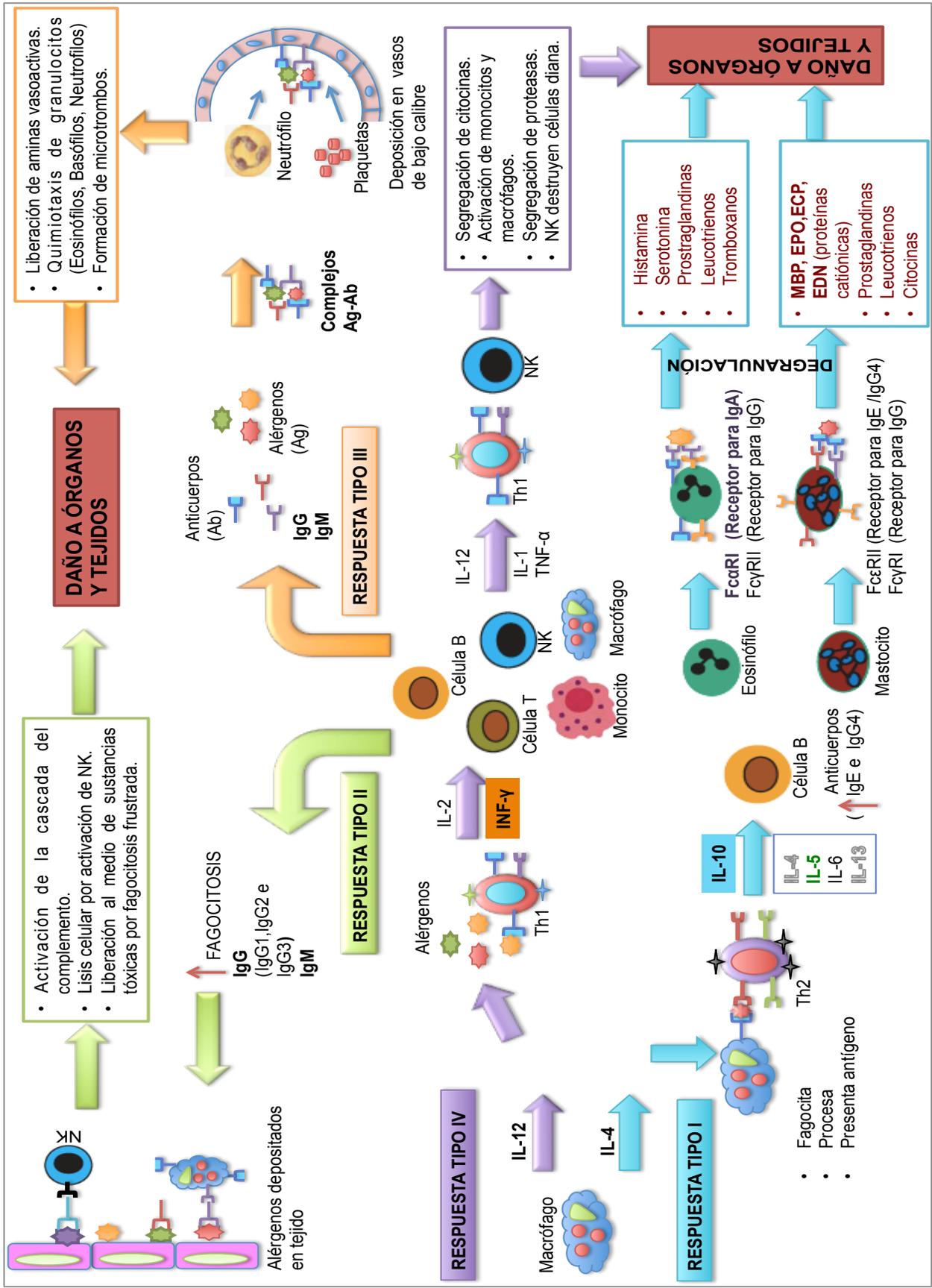


Figura 13. Respuestas de hipersensibilidad que se presentan en la Alergia alimentaria.

Contrario a estas observaciones, se encuentran los estudios de Massimo et al, 2004 ^[19], quienes realizaron estudios de prevalencias de diferentes proteínas relacionadas con la alergia a proteínas de leche bovina en suero de 20 pacientes con niveles detectables de IgE en suero, aplicando varias técnicas como RAST e inmunoblot en 2-D. Las prevalencias que se encontraron fueron: α -S1-caseína **50%**, α -S2-caseína **90%**, β -caseína **15%**, κ -caseína **50%**, β -lactoglobulina **45%**, Albúmina Sérica Bovina **45%**, Cadena pesada IgG **95%**, lactoferrina **50%** y α -lactalbúmina **0%**.

En el reporte de Wal et al 1998^[77], al igual que en el de Massimo^[19], se reportó que la α -S2-caseína es la isoforma más alergénica de todas las caseínas; el 90% de los pacientes presentó inmunoglobulinas específicas contra esta proteína en suero. Por otro lado, en el estudio de Wal ninguno de los pacientes reconoció a la α -lactalbúmina que ha sido reportada como un alérgeno mayor. Sin embargo, el 95% reconocieron como alergénicas las cadenas pesadas de las IgG bovinas, las cuales han sido reportadas como alérgenos menores por presentarse en menor número de casos como causantes de alergia. Lo anterior indica que pueden existir proteínas que derivan en reacciones de hipersensibilidad, incluso encontrándose en concentraciones traza en la leche bovina y que han sido reconocidas gracias a la implementación de técnicas más sensibles, que permiten el enriquecimiento y la visualización de estas proteínas.

D'Amato et al 2009^[78], realizaron un enriquecimiento de proteínas de baja abundancia en el suero de la leche con el uso de librerías de péptidos logrando observar en electroforesis 2-D hasta 149 proteínas, de las cuales, por medio de inmunoblot identificó a la β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, inmunoglobulinas y lactoferrina como alérgenos. Por su parte, Gasilova et al 2012^[79], realizaron un análisis de alérgenos mayores en el suero de la leche, β -lactoglobulina y α -lactalbúmina aplicando una electroforesis capilar de inmunoafinidad acoplada a un MALDI-MS para el análisis de las proteínas, con el propósito de identificar proteínas traza en alimentos.

En el caso de nuestro estudio, realizamos un fraccionamiento de las PLB por cromatografía de intercambio iónico obteniendo 5 fracciones con diferentes perfiles (figura 9 y 10). Con las diferentes fracciones se realizaron inmunoensayos (ELISA)

con los que se detectaron 3 fracciones con mayor capacidad alergénica: Fracción 3, 4 y 5 (gráfica 3). Considerando estas fracciones y aprovechando las altas concentraciones de IgG específica contra PLB, se realizaron Western-blots con los sueros de los pacientes (figura 11). Estos Western-blots mostraron proteínas que en gel no pueden visualizarse, por lo que es difícil extraer las proteínas y realizar su identificación. Sin embargo, es interesante la visualización de estas proteínas en la membrana ya que pueden tratarse de proteínas que pueden tener alta capacidad alergénica aún en muy bajas concentraciones, por lo que resulta importante su identificación. Por otro lado, el western-blot de la fracción 4 muestra gran cantidad de señales de proteínas reconocidas por los anticuerpos de los pacientes que no son observables en los Western-blots que se realizaron individualmente lo que podría ser ocasionado por un reconocimiento sinérgico de los anticuerpos al realizar el “pool” con las muestras de sueros de los diferentes pacientes.

De las proteínas localizadas en los geles, hemos identificado 11 (tabla 8), entre ellas la α -S1-caseína, α -S2-caseína, BSA, α -lactalbúmina, lactoperoxidasa y la ProteinFAM13A; estas dos últimas no han sido reportadas anteriormente como proteínas alergénicas. A continuación, se puntualizan datos relevantes de las proteínas que en este estudio se identificaron como antigénicas.

A) FRACCIÓN DE LAS CASEÍNAS

En solución, las 4 caseínas pueden formar complejos y agregados ordenados (micelas), estos complejos globulares son compuestos de una capa hidrofóbica periférica formada por la κ -caseína y un núcleo hidrofóbico formado por las alfa y beta caseínas. Las 4 moléculas de caseína tienen una estructura pequeña homóloga, todas ellas son proteínas fosforiladas y comparten características biofísicas como la resistencia al calentamiento (S. Marchesseau et al 2002) ^[80]. La α -S2-caseína no está presente en leche humana, lo que puede explicar su carácter alergénico.

B) ALÉRGENOS DEL SUERO DE LA LECHE.

La β -lactoglobulina es la proteína del suero en mayor concentración en la mayoría de las especies de mamíferos, esta proteína no se encuentra en humanos y

roedores. La alergenicidad de esta proteína se ha atribuido a la alta estabilidad contra proteasas e hidrólisis acida, así como el hecho de que no se encuentra presente en la leche humana. Sin embargo, datos recientes indican que la α -lactalbúmina es el más importante alérgeno en el suero de la leche. La α -lactalbúmina es pequeña (16kDa), ácida, une Ca^{2+} y es monomérica, la cual se estabiliza por 4 puentes disulfuro. Actúa como un componente regulador en el sistema galactosiltransferasa y puede interactuar con lípidos de membrana, ácido esteárico y palmítico. Muestra alta estabilidad térmica y capacidad de replegamiento.

La albumina sérica bovina cuenta con 607 aa, peso molecular de 69.3 KDa y contiene 17 puentes disulfuro, juega un rol importante en el transporte de Ca^{2+} , K^+ , agua, ácidos grasos, hormonas, en metabolismo, distribución de ligandos, presión osmótica de sangre y prevención de radicales libres.

Lactoperoxidasa actúa como agente microbiano, ayuda a proteger la ubre de infecciones y con ello promover el crecimiento de los terneros.

La proteína FAM13A se expresa en la glándula mamaria, sus niveles son similares en todos los estados de desarrollo (embarazo, lactancia e involución) ^[81].

De los datos anteriores podemos asegurar que el uso de técnicas proteómicas como la electroforesis 2-D y la identificación de espectrometría de masas han abierto una nueva puerta para la búsqueda de nuevos alérgenos. La amplificación de especies de baja abundancia es un camino para detectar alérgenos importantes y poco detectables, pues generalmente son cubiertos por la señal de las reacciones inmunológicas generadas por los alérgenos mayores, pero que parecen tener una alta capacidad alergénica en pacientes con APLB. Por otro lado, la aplicación de estas técnicas pueden sentar las bases para aclarar la clínica de la sensibilización y la relación que existe entre la gravedad de los síntomas con el tipo de alérgeno que induce la sensibilización.

IX. CONCLUSIONES.

- Los pacientes con sintomatología de APLB expresan altas concentraciones de IgG en especial de la subclase IgG4, lo que parece indicar la presencia de mecanismos inmunológicos combinados expresados en los procesos alérgicos; por lo que se debe considerar mecanismos alternos a la IgE capaces de desencadenar esta enfermedad.
- Con el enriquecimiento por cromatografía en combinación con la detección de anticuerpos específicos contra PLB, es posible encontrar proteínas de alta capacidad alérgica que no han sido relacionadas con el desarrollo de la APLB ya que su concentración en la leche bovina es muy baja. Tal es el caso de la ProteinFAM13-A y la lactoperoxidasa identificadas en este estudio.

X. PERSPECTIVAS.

1. Concluir con la identificación de las proteínas localizadas en cada una de las fracciones de leche en los pacientes que se incluyeron de 2012 a 2013.
2. Terminar de incluir a los pacientes en el estudio y realizar tanto la determinación de inmunoglobulinas en suero como la identificación de las proteínas antigénicas reconocidas por los pacientes.
3. Realizar cultivos celulares de muestras de pacientes para medir las citocinas y tipos celulares que se desarrollan al retar con proteínas de leche bovina, con el objetivo de obtener más información acerca de los mecanismos inmunológicos desarrollados en la alergia a las proteínas de leche bovina.

BIBLIOGRAFÍA.

1. S.G.O. Johansson, J. O'B Hourihane, J. Bousquet, C. Bruijnzeel, S. Dreborg, T. Haahtela, M.L. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, P. van Cauwenberge, M. van Hage. 2001. **"A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force"**. *Alergy*. 56: 813–824.
2. R. Cervantes, M.P. Sánchez, D. Bacarreza, E. Montijo, F. Zárate. 2007. **"Actualidades en alergia a la proteína de leche de vaca"**. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 21(82):51-59.
3. E.A. Lebrero, M.L. Fernández, A.M. Somoza. 2001. **"Alergia a alimentos en niños"**. *Allergol Inmunol Clin*. 16 (Extr Núm2): 96-115.
4. A. Host. 2002. **"Frequency of cow's milk allergy in childhood"**. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 89 (Suppl 1):33-37.
5. C. Venter and S. Hasan. 2011. **"Epidemiology of Food Allergy"**. *Pediatric Clinic of North America*. 58:327-349.
6. R. Fritsche. 2003. **"Role for technology in dairy allergy"**. *Journal Dairy Technology*. 58:89-91.
7. S. Héller, S. Flores, M.E. González, B. del Río, S. Placencia. 2005. **"Consenso de Alimentación en el Niño con Alergia Alimentaria. Asociación Mexicana de Pediatría"**. *Acta Pediátrica Mexicana*. 26(5):270-292.
8. P.G. Rodríguez, D. Muñoz, A. Arias, S.N. González, D. Herrera. 2009. **"Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey"**. *Revista Alergia México*. 56(6):185-191.
9. C. Porporatto, I.D. Bianco, S.G. Correa. 2007. **"Modulation of the mucosal immune system with polysaccharides. Basis for an attractive therapeutic alternative"**. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41(2): 203-211.
10. E.M. Hidalgo, B. del Rio, J.L. Sienra. 2010. **"Factores de riesgo de alergia alimentaria"**, *Revista Alergia México*. 56(5):158-164.
11. G. López, B.M. Morfín, J. Huerta, J. López, J.L. Rivera, L. López. 2010. **"Factores de riesgo relacionados con enfermedades alérgicas en la Ciudad de México"**, *Revista Alergia México*. 57(1):18-25.
12. Base de datos de *Bos Taurus* (sin fecha). Recuperado en Septiembre de 2010 de <http://www.uniprot.org/>.
13. S. Benot. 2000. **"Alergia a las proteínas de la leche de vaca. Edad límite de uso apropiado"**. AETA Informe de Evaluación. Noviembre.

14. G. Bu, Y. Lou, F. Chen, K. Liu, T. Zhu. 2013. **“Milk processing as a tool to reduce cow’s milk allergenicity: a mini-review”**. Dairy Sci. & Technol. 93:211-223.
15. K. Murphy, P.Travers, M. Walport. 2008. **“Inmunobiology”**. Garland Science, Taylor&Francis Group(Ed 7a). Pp:555-592.
16. A.W. Burks, S. Laubach, S.M. Jones. 2008. **“Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment”**. Journal of Allergy Clinic Immunology. 121:1344-50.
17. J.S. Menezes, D.S. Mucida, D.C. Cara, J.I. Álvarez, M. Russo, N.M. Vaz. 2003. **“Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system”**. International Immunology.15:447-55.
18. C.M. Frank Kneepkens and Y. Meijer. 2009. **“Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow’s milk allergy”**. European Journal of Pediatrics. 168:891–896.
19. N. Massino, C. Bisson, G. Monti, A. Peltran, L. Perono, S. Valentini, C. Fabris, E. Bertino, A. Coscia, A. Conti. 2004. **“Cow’s milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry”** Molecular Nutrition & Food Research. 48: 363-369.
20. A.E. Williams. 2012. **“Immunology: Mucosal and Body Surface Defences”**. Ed. Wiley-Blackwell. Pp:311-312.
21. J. Mestecky, Z. Moldoveanu, C.O Elson. 2005. **“Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens”**. Elsevier Vaccine. 23:1800-1803.
22. M.G. Spiekermann and W.A. Walker. 2001. **“Oral tolerance and its role in clinical disease”**. Journal of Pediatric, Gastroenterology and Nutrition. 32:237-255.
23. L. Mayer, K. Sperber, L. Chan, J. Child. 2001. **“Oral tolerance to protein antigens”**. Allergy. 56(Suppl 67):12-15.
24. H. Sampson. 2004. **“Update on food allergy”**. J Allergy Clin Immunol. 113(5):805-819.
25. R.G. Crittenden and L.E. Bennet. 2005. **“Cow’s Milk Allergy: A Complex Disorder”**.Journal of the American College Nutrition. 24(6):582S-591S.
26. J.G. Romero and R. Atilio. 2007. **“Reacciones de Hipersensibilidad”**. Revista de Posgrado Via Cátedra de Medicina. 168:11-17.

27. E.A. Lebrero and C. Pedrón. 2002. **“Reacciones adversas a las proteínas de leche”**, Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 6(26):141-151.
28. Immunology Chapter 17. Hypersensitivity Reactions (sin fecha). Recuperado en Agosto de 2010 de <http://www.microbiologybook.org/ghaffar/hyper00.htm>
29. K. Murphy, P. Travers, M. Walport. 2008. **“Inmunobiology”**, Garland Science, Taylor&Francis Group, LLC (Ed 7a) Pp: 555-592.
30. A.W. Burks, S. Laubach, S.M. Jones. 2008. **“Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment”**. Journal of Allergy Clin Immunology. 121(6):1344-1350.
31. B. Björkstén. 2005. **“Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy”**. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 5:249–253.
32. P. Chatchatee, K.M. Järvinen, L. Bardina, K. Beyer, H.A. Sampson. 2001. **“Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α 1-casein: Differences in patients with persistent and transient cow’s milk allergy”**. Journal of Allergy Clinical Immunology. 107:379-383.
33. C.B. Jensen, B.K. Ballmer-Weber, U. Bengtsson, C. Blanco, C. Ebner, J. Hourihane. 2004. **“Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology”**. Allergy. 59(7):690-697.
34. A.N. Wegrzyn, A.H. Assaad, S.L. Bahna, S.A. Bock, S.H. Sicherer, S.S. Teuber. 2009. **“Work group report: oral food challenge testing”**. Journal of Allergy Clinical Immunology. 123(Suppl 6):S365-S383.
35. T.T. Perry, E.C. Matsui, M.K. Conover-Walker, R.A. Wood. 2004. **“The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome”**. Journal of Allergy Clinical Immunology. 114:144-149.
36. K.M. Järvinen, S. Amalanayagam, W.G. Shreffler, S. Noone, S.H. Sicherer, H.A. Sampson. 2009. **“Epinephrine treatment is infrequent and biphasic reactions are rare in food-induced reactions during oral food challenges in children”**. Journal of Allergy Clinical Immunology. 124:1267-1272.
37. I. Cerededo, J. Zamora, W.G. Shreffler, J. Lin, L. Bardina, M.C. Dieguez. 2008. **“Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay”**. Journal of Allergy Clinical Immunology. 122:589-594.
38. J. Wang, J. Lin, L. Bardina, M. Goldis, A. Nowak-Wegrzyn, W.G. Shreffler, H.A. Sampson. 2010. **“Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-**

specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy".
Journal of Allergy Clinical Immunology. 125(3):695-702.

39. J.L. Brozek, L. Terraciano, J. Hsu, E. Compalati, N. Santesso, A. Fiocchi, H.J. Schunemann. 2012. **"Oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy: a systematic review and meta-analysis"**. Clinical and Experimental Allergy. 42(3):363-374.

40. M. Reche, C. Pascual, A. Fiandor, I. Polanco, M. Rivero-Urgell, R. Chifre, S. Johnston, M. Martin-Esteban. 2010. **"The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cows milk protein allergy"**, Pediatric Allergy Immunology. 21: 577–585.

41. A.M. Edwards, C.H. Arrowsmith. B. Pallieries. 2002. **"Proteomics: News tools for a new era"**, Modern Drug Discovery. 3: 34-45.

42. R.E. Banks, M.J. Dunn, D.F. Hochstrasser, J.C. Sánchez, W. Blackstock, D.J. Pappin, P.J.Selby. 2000. **"Proteomics: news perspectives, new biomedical opportunities"**. The Lancet. 356:1749-1756.

43. T. Mojica, O. Sánchez, L. Bodadilla. 2003. **"La proteómica, otra cara de la genómica"**. NOVA. 1: 1794-2370.

44. H.M. García. 2000. **"Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia"**. UNIV DIAG. 1(2):31-41.

45. A. Alban, S. O.David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, I. Currie. 2003. **"A novel experimental design for comparative two dimensional gel analysis: two- dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard"**. Proteomics. 3(1): 36-44.

46. G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci. 2004. **"Blue silver: A very sensitive colloidal comassie G-250 staining for proteome analisis"**. Electrophoresis. 25: 1327-1333.

47. M. Pink, N. Verma, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke. 2010. **"CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility"**. Electrophoresis. 31:593-598.

48. S. Encarnación, M. Hernández, G. Martínez-Batallar, S. Contreras, M. C. Vargas, J. Mora. 2005. **"Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria whit sequenced or partially sequenced genomes"**. Biological Procedures Online. 7(1): 117-135.

49. J.X. Yun, R. Wait, R. A. Harry, J.A. Westbrook, C. H. Wheeler, M. J. Dunn. 2000. **"A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible**

with matrix-assisted laser desorption\ ionization and electrospray ionization mass spectrometry ". Electrophoresis. 21:3666-3672.

50. K. Biemann. 1992. "**Mass spectrometry of peptides and proteins**", Rev Biochem. 61:997-1010.

51. K. Hjerno, P. Hojrup. 2007. "**Protein identification by MALDI-ToF MS and Data base searching**". Humana Press, 2007.

52. M. André, M. Karas. 2007. "**Investigation of sample-purification procedures for MALDI-based proteomic studies**". Analytical and Bioanalytical Chemistry. 389: 1047-1053.

53. P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K Fujimoto, N.M. Goetze.1985 "**Measurement of protein using bicinchoninic acid**". Analytical Biochemistry. 150:76-85 .

54. C. Kuns and B. Lønnerdal. 1989. "**Human milk proteins: separation of whey keys and their analysis by acrilamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography**", The American Journal of Clinical Nutrition. 49:464-70.

55. E. Medina, O. Mata, J.C. Carpio, A. Zavala, A. Ruiz, J. Gavilondo, M. Ayala, J. Vázquez, H. Bell, M. Dueñas. "**Manual de Técnicas Modernas en Inmunología Teoría y Practica**". Secretaria de Salud; 2000:15-41.

56. P.E. Gottschall, J.M. Ajmo, A.K. Eakin, M.D. Howell, L.A. Bailey. 2010. "**Panel of synaptic protein ELISAS for evaluating neurological phenotype**". Experimental Brain Research. 201:885-893.

57. B.S. Antharavally, B. Carter, P.A. Bell, K. Mallia. 2004. "**A high-affinity reversible protein stain for Western blots**". Analytical Biochemistry. 329: 276-280.

58. E. Isolauri, A. Huurre, S. Salminen, O. Impivaara. 2004. "**The Allergy epidemic extends beyond the past few decades**". Clinical and Experimental Allergy. 34:1007-1010.

59. C. Venter, B. Pereira, J. Grundy, C.B. Clayton, G. Roberts, B. Higgins. 2006. "**Incidence of parentally report and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life**". Journal of Allergy and Clinical Immunology. 117(5):1118-1124.

60. T. Keil. 2007. "**Epidemiology of food allergy: what's new? A critical appraisal of recent population-based studies**". Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 7: 259-263.

61. A. Host, B. Koletzco, S. Dreborg, A. Muraro, U. Whan, P. Agget. 1999. "**Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint**

Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Archives for Disease in Childhood*. 81:80-84

62. C. Viera, M.B. Morais, V.N. Spolidoro, M.S. Toporovski, A.L. Cardoso, T.B. Araujo, V. Nudelman, C.M. Fonseca. 2010. **"A survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow`milk allergy"**. *BMC Pediatrics*. 10:25.

63. Las Alergias (sin fecha). Recuperado en Diciembre del 2013 de <http://www.compedia.org.mx/>

64. R.C. Aalberse, A.E. Platts-Mills. 2004. **"How do we avoid developing allergy: Modifications of the T_H2 response from a B-cell perspective"**. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 113(5):983-986.

65. A. Ishizaka, Y. Sakiyama, M. Nakanishi, K. Tomizawa, E. Oshika, K. Kojima, Y. Taguchi, E. Kandil and S. Matsumoto. 1990. **"The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes"**. *Clinical and Experimental Immunology*. 79: 392:396.

66. M.C. Jenmalm, B. Björkstén, C. Macaubas, B.J. Holt, T.B. Smallacombe, P.G. Holt. 1999. **"Allergen-induced cytokine secretion in relation to atopic symptoms and immunoglobulin E and immunoglobulin G subclass antibody responses"**. *Pediatric Allergy and Immunology*. 10(3):168-177.

67. R.C. Aelberse, F. Van Milligen, K.Y Tan, S.O. Stapel. 1993. **"Allergen-specific IgG4 in atopic disease"**. *Allergy*. 48: 559-569.

68. P. Eibensteiner, S. Denépoux, P. Steinberger, D. Kraft, V. Visco, J. Banchereau, S. Lebecque, R. Valenta. 1999 **"Expression of a human IgG4 antibody, BAB2, with specificity for the major birch pollen allergen, Bet v 1 in Escherichia coli: Recombinant BAB2 Fabs enhance the allergic reaction"**. *International Archives of Allergy and Immunology*. 118:190-192.

69. D.K. Stone, C. Prussin, D.D. Metcalfe. 2010. **"IgE, mast cells, basophils, and eosinophils"**. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 125 (2): S73-S80.

70. C.H. Oettgen, T.R. Martin, A. Wynshaw-Boris, C. Deng, J.M. Drazen, P. Leder. 1994. **"Active anaphylaxis in IgE- deficient mice"**. *Nature*. 370:367-370.

71. Y. Okayama, A.S. Kirshenbaum, D.D. Metcalfe. 2000. **"Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma"**. *Journal of Immunology*. 15;164(8):4332-4339.

72. J.G. Van de Winkel and C.L. Anderson. 1991. "**Biology of human immunoglobulin G Fc receptors**". Journal of Leukocyte Biology. 49:511-524.
73. I.A. Heijnen and J.G. Van de Winkel. 1997. "**Human IgG Fc receptors**". International Review of Immunology. 16: 29-55.
74. M.R. Woolhiser, Y. Okayama, A.M. Gilfillan, D.D. Metcalfe. 2001. "**IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc γ RI by INF- γ** ". European Journal of Immunology. 31:3298-3307.
75. Y. Okayama, D.D. Hagan, D.D. Metcalfe. 2001. "**A comparison of mediators released or generated by IFN- γ - treated human mast cells following aggregation of Fc γ RI or Fc ϵ RI**". Journal of Immunology. 166(7):4705-4712.
76. C. Tkaczyk, Y. Okayama, M.R. Woolhiser, D.D. Hagan, A.M. Gilfillan, D.D. Metcalfe. 2001. "**Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor**". Molecular Immunology. 38:1289-1293.
77. J.M. Wal. 1998 "**An update on allergens: Cow's milk allergens**". Allergy. 53:1013-1022.
78. A. D'Amato, A. Bachi, E. Fasoli, E. Boscheti, G. Peltre, H. Séréchal, P.G. Righetti. 2009. "**In-Depth Exploration of Cow's Whey Proteome via Combinatorial Peptide Ligand Libraries**". Journal of Proteome Research. 8: 3925-3936.
79. N. Gasilova, A.L. Grassner, H.H. Girault. 2012. "**Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS**". Electrophoresis. 33: 2390-2398.
80. S. Marchesseau, J.C. Mani, P. Martineau, F. Roquet . 2002. "**Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique**". J Dairy Sci. 85(11):2711-2721.
81. H. Hochwallner, U. Schulmeister, I. Swoboda, S. Spitzauer and R. Valenta. 2013. "**Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention**". Methods. Aug 15. In Press.

ANEXOS.

ANEXO 1.

Concentración de sueros de los pacientes y el suero de las PLB determinado por BCA.

A. Tabla 1. Concentración de proteína total en los sueros de pacientes.

Muestra	Conc. (mg/mL)	Muestra	Conc. (mg/mL)
Paciente 1 (P1)	31.7	Paciente 12 (P12)	58.3
Paciente 2 (P2)	70.4	Paciente 13 (P13)	55.1
Paciente 3 (P3)	80.3	Paciente 14 (P14)	55.1
Paciente 5 (P5)	70.5	Paciente 15 (P15)	46.3
Paciente 6 (P6)	97.3	Paciente 16 (P16)	61.8
Paciente 7 (P7)	61.8	Paciente 17 (P17)	56.6
Paciente 8 (P8)	62.0	Paciente 18 (P18)	49.6
Paciente 9 (P9)	60.3	Control 1 (CTL1)	60.4
Paciente 10 (P10)	46.4	Control 2 (CTL2)	64.8
Paciente 11 (P11)	71.5		

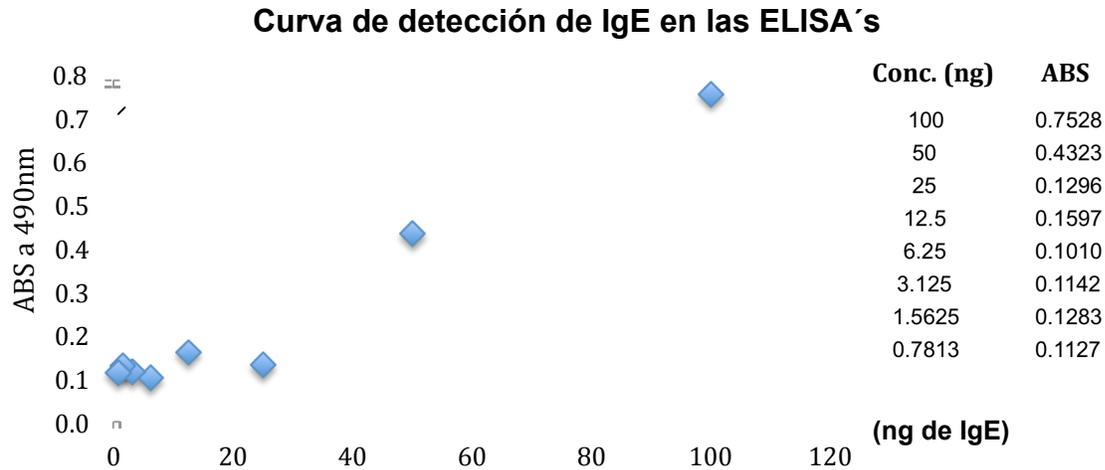
B. Tabla 2. Concentración de proteína total en el suero de proteínas de leche bovina y de las fracciones obtenidas después del enriquecimiento por cromatografía de intercambio catiónico.

Muestra	Conc. (mg/mL)
Proteínas de leche bovina (PLB)	9.5
Fracción 1	1.8
Fracción 2	0.665
Fracción 3	3.8
Fracción 4	11.96
Fracción 5	2.06

ANEXO 2.

Curva de Sensibilidad del inmunoensayo indirecto (ELISA) para la detección de IgE. La curva muestra que la absorbancia se mantuvo constante por debajo de los 25 ng de IgE.

□



Gráfica 1 . Detección de diferentes concentraciones de IgE (nanogramos) por el ensayo de ELISA. El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1:2000.

ANEXO 3.

Detección de IgE con Dot-blot. La concentración mínima de IgE en la que se puede observar una señal clara es con 3.6 nanogramos.

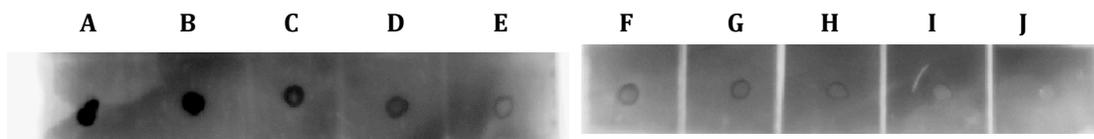


Figura 1. Dot blot revelado por quimioluminiscencia. Se realizó una curva de concentraciones para observar el mínimo reconocimiento de IgE. Las concentraciones de IgE fueron: (A) 229 NG, (B) 114.5 NG, (C) 57.25NG, (D) 28.625 NG, (E) 14.3 NG, (F) 7.15 NG, (G) 3.6 NG, (H)1.78 NG, (I) 0.89 NG y (J) 0.45 NG.

ANEXO 4.

Patrón de Proteínas de Leche Bovina en SDS-PAGE en una dimensión (1-D) y en dos dimensiones (2-D).

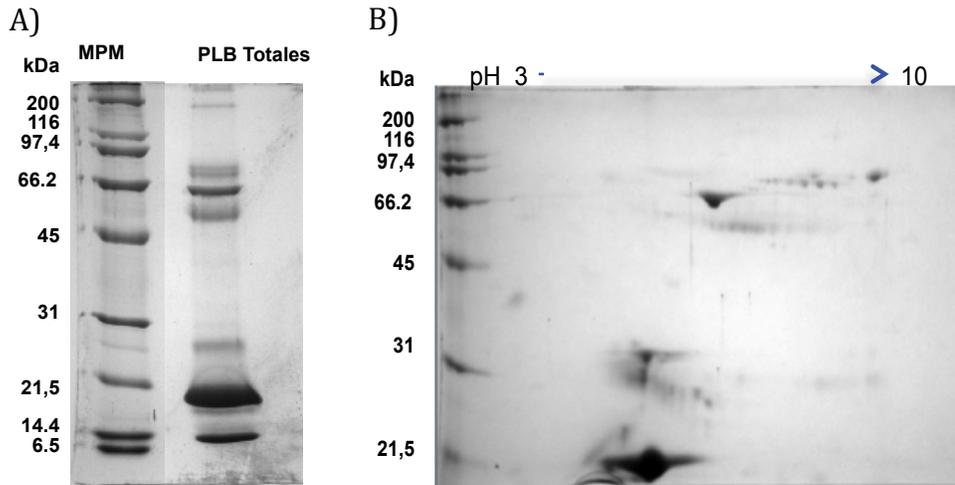


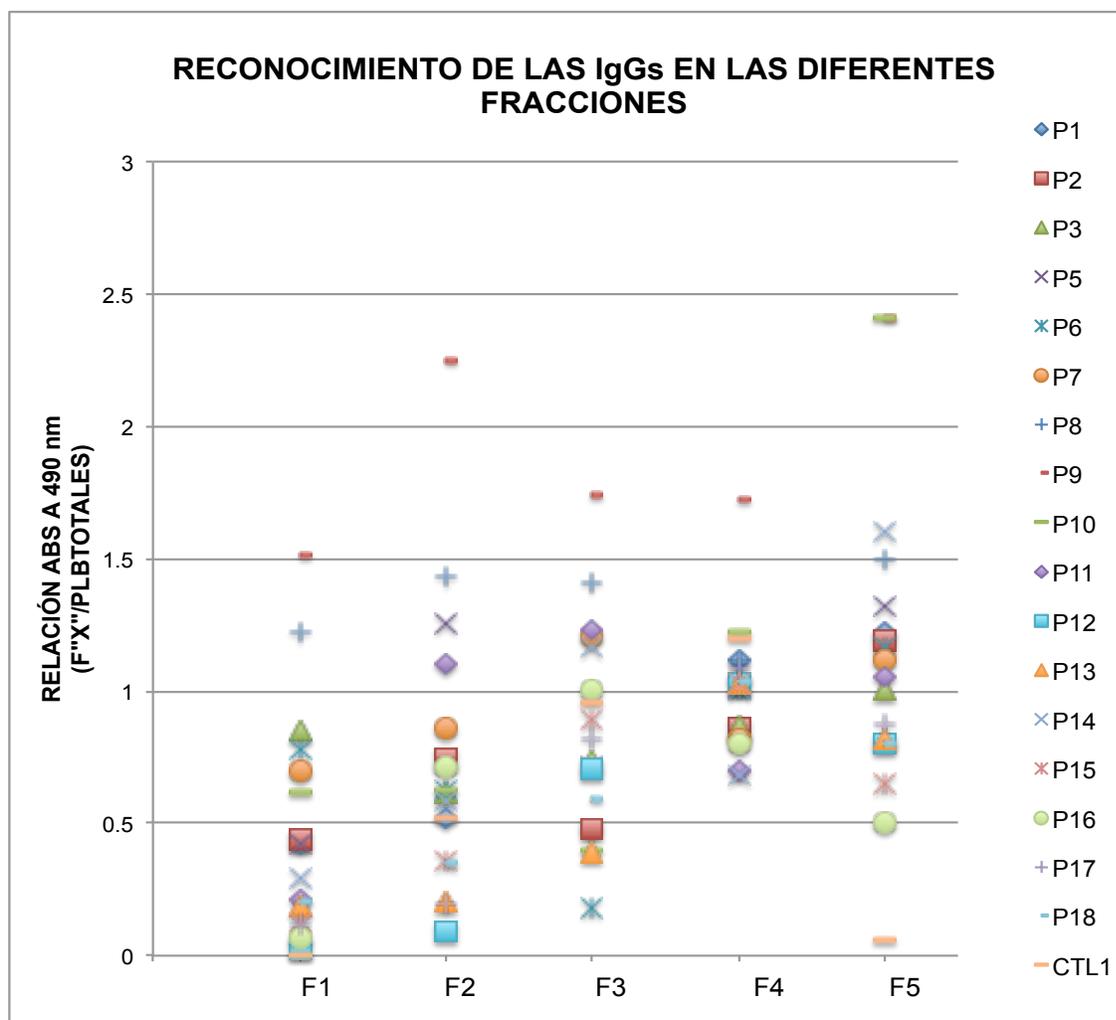
Figura 2. Patrón proteico del suero de leche bovina en (A) una dimensión (A) y en (B) 2-D. La separación por pl se realizó usando tiras de 7cm de un rango de pH 3-10.

ANEXO 5.

Determinación de fracciones con mayor carácter alergénico. Los ensayos se realizaron con los sueros de los diferentes pacientes y el control a una concentración de antígeno de 2.5µg/mL y dilución de sueros 1:400.

En la grafica se muestra la relación que existe entre la absorbancia obtenida en cada fracción con respecto a la absorbancia obtenida con las PLB totales. Esta relación indica si el reconocimiento de los anticuerpos (IgG) cambió entre las diferentes fracciones; la señal basal se obtuvo de la respuesta con las proteínas totales sin fraccionar. Los resultados se interpretaron de la siguiente forma:

- Si el cociente es <1 el reconocimiento de los anticuerpos disminuyó; lo que podría indicar que las proteínas alergénicas en dicha fracción son escasas.
- Si el cociente es >1 el reconocimiento de los anticuerpos aumento, lo que indicaría que se enriqueció la concentración de una o algunas proteínas de carácter alergénico.



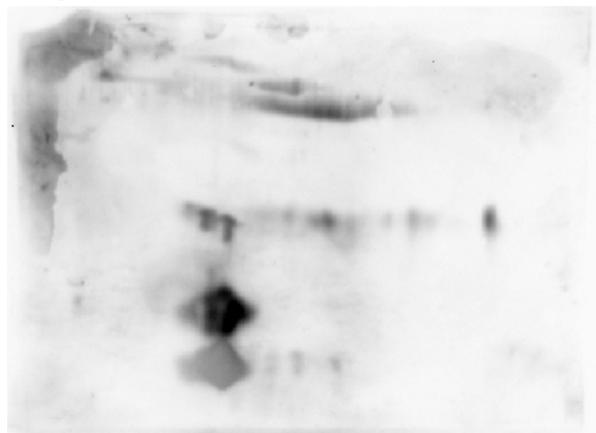
Gráfica 2. Aumento de la respuesta de las IgG en cada paciente con respecto a cada una de las fracciones de leche. Las respuestas mayores a 1 indican aumento en el reconocimiento de la fracción de PLB.

ANEXO 6.

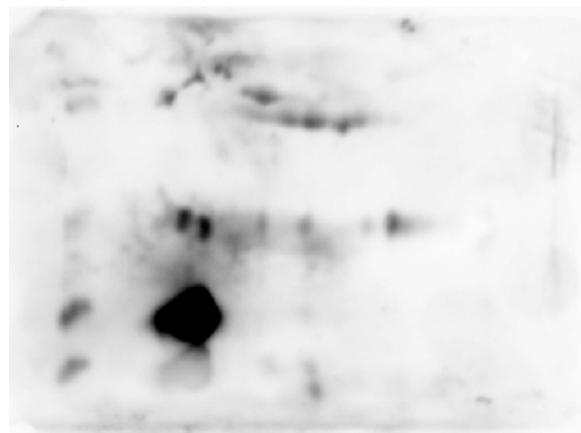
Western-blots de cada uno de los pacientes con la fracción de PLB donde aumentaron su respuesta de las IgGs en suero.

FRACCIÓN 3

PACIENTE 7



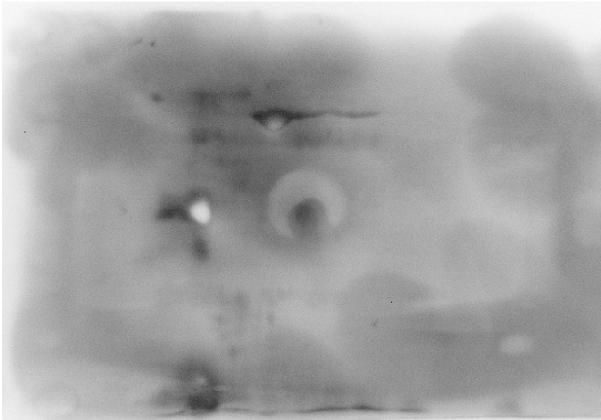
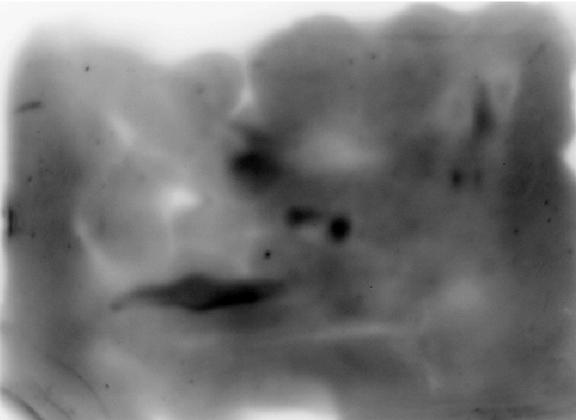
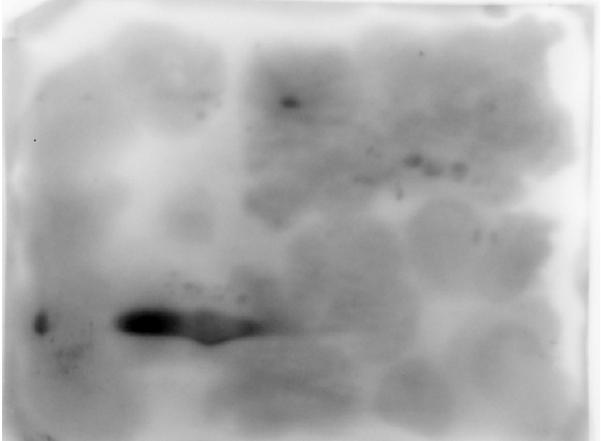
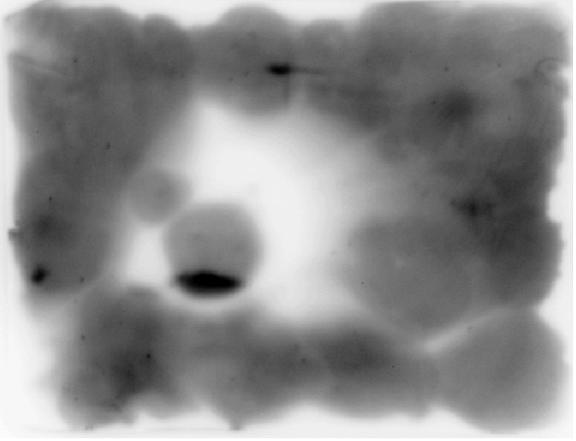
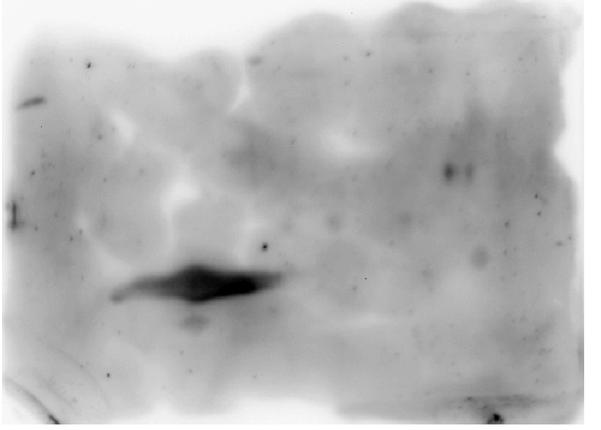
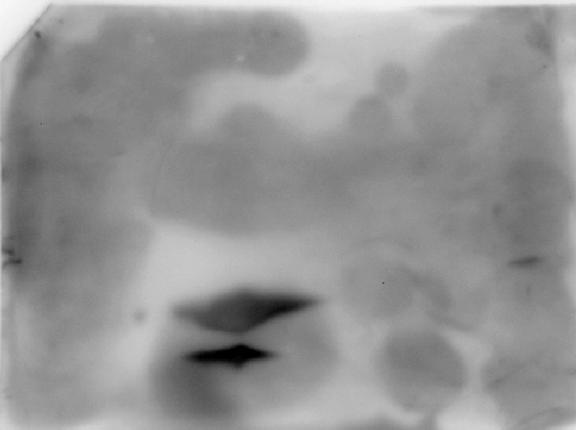
PACIENTE 16



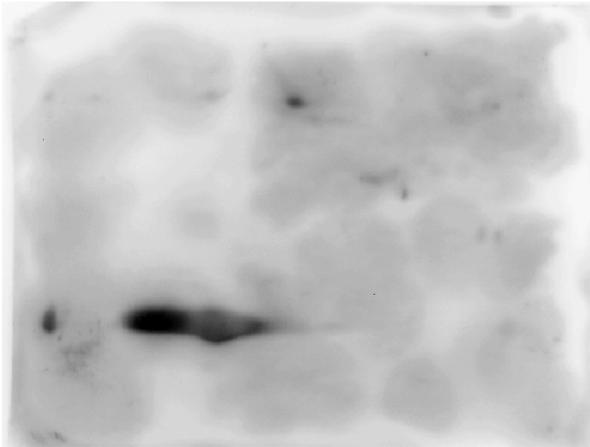
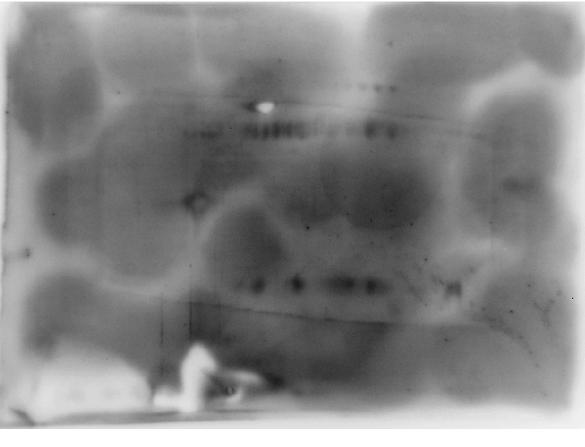
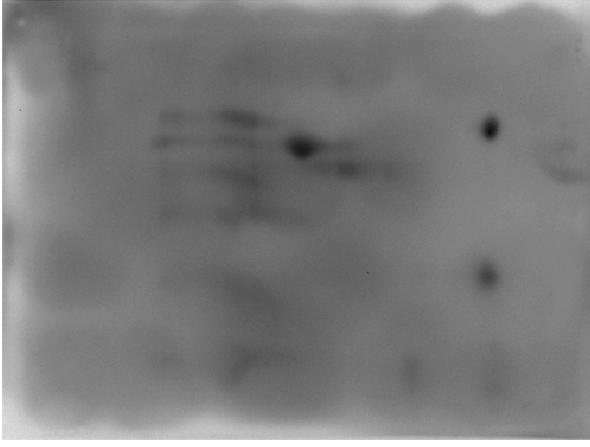
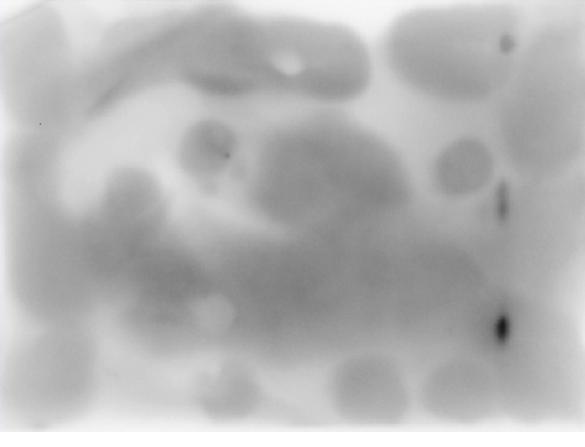
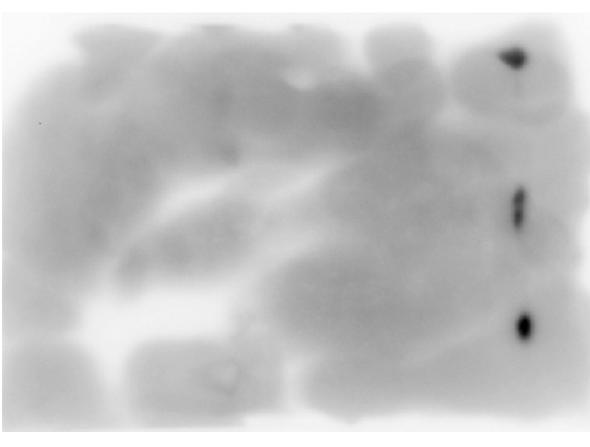
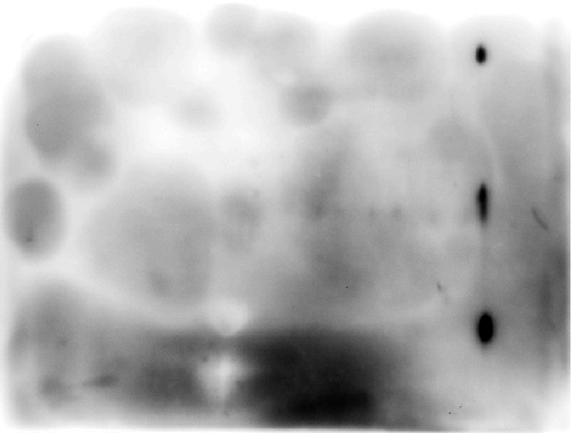
PACIENTE 11

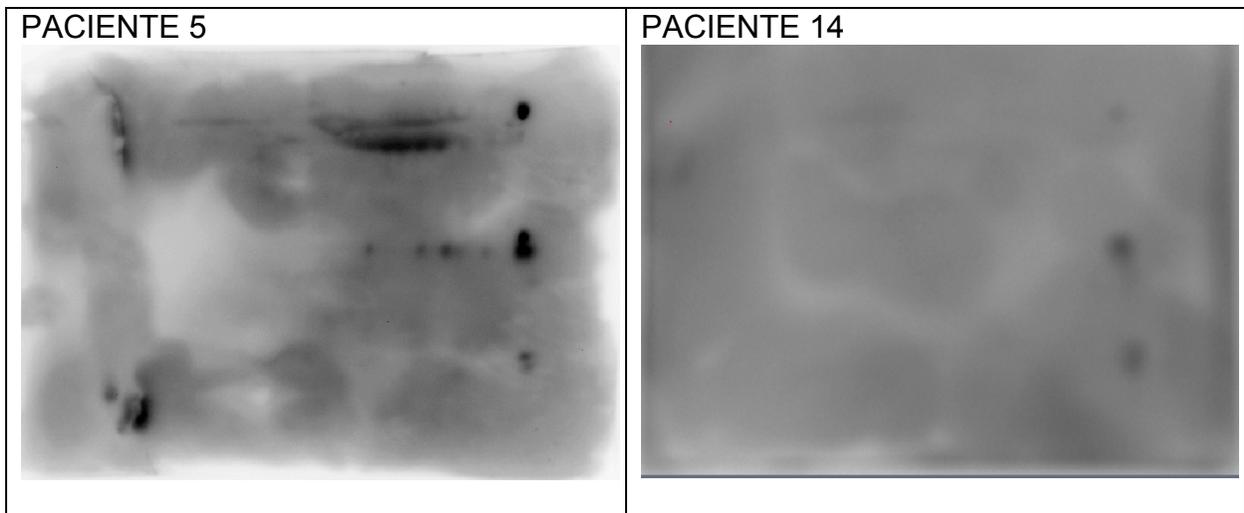


FRACCIÓN 4.

<p>PACIENTE 8</p> 	<p>PACIENTE 15</p> 
<p>PACIENTE 12</p> 	<p>PACIENTE 17</p> 
<p>PACIENTE 13</p> 	<p>PACIENTE 18</p> 

FRACCIÓN 5

<p>PACIENTE 1</p> 	<p>PACIENTE 6</p> 
<p>PACIENTE 2</p> 	<p>PACIENTE 9</p> 
<p>PACIENTE 3</p> 	<p>PACIENTE 10</p> 



ANEXO 7.

CUADRO 3. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS QUE INTERVIENEN EN LA ALERGIA ALIMENTARIA [12,21,22, 24-27,29,30]

Alergia mediada por IgE	
Tipo I o Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE	(Th2) La degranulación de mastocitos provoca la liberación de sustancias proinflamatorias como consecuencia de las interacciones IgE- FcεRI.
Alergia no mediada por IgG	
Tipo II o Reacción Citotóxica.	Los antígenos se depositan en los tejidos, el reconocimiento por IgG y/o IgM provoca: Activación de la cascada del complemento, lisis celular por activación de las células <i>natural killers</i> (NK) y liberación de factores tóxicos al medio extracelular debido a la fagocitosis frustrada.
Tipo III o Complejos Inmunes	La deposición de los complejos antígeno-anticuerpo (IgG y/o IgM) en vasos de pequeño calibre provocan inflamación local (vasculitis y microtrombos).
Tipo IV o Reacción mediada por células	(Th1) La liberación de citocinas por células Th1 provocan la proliferación y activación de macrófagos y mas células T.

XIII. GLOSARIO.

Alérgeno: Sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles, que han estado en contacto previamente con el alérgeno.

Anamnesis: Reunión de datos subjetivos, relativos a un paciente, que comprenden antecedentes familiares y personales, signos y síntomas que experimenta en su enfermedad, experiencias y, en particular, recuerdos que se usan para analizar su situación clínica. Es un historial médico que puede proporcionarnos información relevante para diagnosticar posibles enfermedades.

Anergia: Estado de los linfocitos en el cual, pese a estar presentes, no son activos. Esta situación suele deberse a falta de alguno de los factores de activación esenciales y parece ser un mecanismo de regulación básico en la biología del sistema inmune, por ejemplo, en cuanto a la tolerancia frente a los antígenos propios.

Anticuerpo (inmunoglobulina): Son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño.

Antígeno: La definición moderna abarca todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas), de virus y otros microorganismos.

Atopia: Estado genéticamente determinado de hipersensibilidad a los alérgenos ambientales.

Broncoespasmo: Estrechamiento de la luz bronquial como consecuencia de la contracción de la musculatura de los bronquios, lo que causa dificultades al respirar; el espasmo de los bronquios impide el paso de aire hacia los pulmones.

Citocinas: son proteínas que regulan la función de las células que las producen otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden producirse por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación.

Constipación: Eliminación de heces mediante deposiciones escasas, difíciles de expulsar o demasiado infrecuentes.

Desnutrición: Estado patológico ocasionado por la falta de ingestión o absorción de nutrientes.

Dermatitis atópica: Trastorno cutáneo prolongado (crónico) que consiste en erupciones pruriginosas y descamativas.

Disquecia: Defecación difícil o dolorosa.

Duodenitis: Proceso inflamatorio de diversa etiología que ocurre a nivel del duodeno y primera porción del intestino delgado. Puede ser de tipo aguda o crónica según el tipo de evolución.

Endoscopia: Técnica diagnóstica que consiste en la introducción de una cámara o lente dentro de un tubo o endoscopio a través de un orificio natural, una incisión quirúrgica o una lesión para visualización de un órgano hueco o cavidad corporal; en muchas ocasiones la endoscopia se aprovecha para la toma de biopsias de órganos y/o tejidos.

Esofagitis: Término general para designar cualquier inflamación, irritación e hinchazón del esófago.

Especificidad: Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la capacidad de test para detectar sanos.

Gastropatía: Nombre que se le aplica a todas las enfermedades del estómago.

Hematemesis: Expulsión de vómito con sangre procedente del tubo digestivo alto (desde la boca hasta el ángulo duodeno-yeyuno).

Hematoquezia: Sangrado rectal de color rojo oscuro mezclado con las heces, lo que sugiere que la causa del sangrado se localiza en el intestino grueso o en el recto.

Hiperplasia nodular linfoide: Se refiere a una condición con numerosos nódulos linfoides que protruyen de la mucosa del intestino delgado, el colon o raramente el estómago. Histológicamente, los nódulos están compuestos por grupos linfoides agrandados con centros germinales prominentes en la lámina propia y la submucosa superficial.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

Lactante eutrófico: Aquel que posee estado nutricional normal.

Sensibilidad: Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

Sucedáneos: Sustancia o elemento que puede reemplazar a otro por tener propiedades similares.

Trombocitopenia: Cualquier situación con un recuento plaquetario inferior a $100.000/\text{mm}^3$, es decir, la disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales. En términos generales, los valores normales se ubican entre $150.000/\text{mm}^3$ y $450.000/\text{mm}^3$ (Plaquetas por cada milímetro cúbico).

Prevalencia: Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período determinado.

Proctitis: Proceso inflamatorio propio del recto, que afecta fundamentalmente a la mucosa y que puede producirse por distintas causas, algunas no muy conocidas. Se manifiesta por presentar dolor con frecuencia al defecar asociado o no a emisión de heces muco-purulentas o incluso hemorrágicas (proctorragias).

Reflujo gastroesofágico: Enfermedad que se caracteriza por la presencia de síntomas crónicos y/o daño en la mucosa del esófago a causa de un reflujo anormal del contenido del estómago hacia el esófago.

Rinitis alérgica: Reacción de las membranas de la mucosa de la nariz después de una exposición a partículas de tipo alérgico como polvo, polen u otras sustancias

que perjudican a personas con alergia. Se ven afectados los ojos y la nariz principalmente.

Sangrado de tubo digestivo: Se refiere a cualquier sangrado que se origine de cualquier sitio del tubo digestivo, a menudo se divide en:

- **Hemorragia digestiva alta:** El tubo digestivo alto incluye el esófago (conducto que va desde la boca hasta el estómago), el estómago y la primera parte del intestino delgado.
- **Hemorragia digestiva baja:** El tubo digestivo bajo incluye la mayor parte del intestino delgado, el intestino grueso, el recto y el ano.S