

Regulación de la síntesis de IgE

M.^a L. Sanz Larruga

Departamento de Alergología e Inmunología Clínica, Clínica Universitaria, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona

La estructura completa de la IgE fue definida en 1974¹. A partir de ese momento se han realizado en las dos últimas décadas numerosos estudios tanto en experimentación animal como en humanos, dirigidos tanto a la descripción de las propiedades físico-químicas y el control genético de la producción de IgE^{2,3}, como sobre la clonación genética de esta inmunoglobulina^{4,5}.

Los estudios sobre la regulación de la síntesis de IgE comenzaron en los años 70, con el fin de identificar las alteraciones inmunes responsables de las enfermedades alérgicas mediadas por esta inmunoglobulina⁶. Inicialmente los estudios *in vivo* fueron realizados en animales de experimentación y posteriormente se desarrollaron protocolos o modelos de estudios *in vitro*.

ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

Una de las primeras aportaciones en este campo la realizó Romagnani en 1980, en una publicación⁷ en la que demostraba que las células mononucleares de pacientes afectados de atopia severa eran capaces de producir de forma espontánea IgE *in vitro*. En 1986 estos mismos autores⁸ observaron cómo clonas de células T obtenidas de sangre periférica humana, de amígdalas o de bazo tras estimulación con PHA, expresaba una actividad facilitadora sobre la síntesis de IgE. Este fue un hallazgo importante que permitió producir cantidades significativas de IgE *in vitro* mediante esta técnica. Cuando testaron la actividad funcional de estas clonas T y midieron en el sobrenadante de estas células las citoquinas que eran capaces de

producir observaron que aquellas clonas de células T CD4⁺ (TH2) inductoras de síntesis de IgE producían IL4. Al contrario aquellas clonas T CD4⁺ (TH1) que producían IFN γ , pero no IL4 eran incapaces de inducir a la producción de IgE⁹.

Hoy día es un hecho comprobado que la IL4 y el IFN γ producidos por las células T CD4⁺ tipo TH2 y TH1 poseen papeles inmunorreguladores contrarios sobre la síntesis de IgE.

Sin embargo, no existe un solo mecanismo inmunológico que controle la síntesis de IgE.

CONTACTO CÉLULA T-CÉLULA B

Se ha podido comprobar que la IL4 sola no es suficiente para inducir la síntesis de IgE por las células B humanas. Hoy se sabe que es necesario el contacto directo célula T-B como una segunda señal de activación para que la célula B produzca IgE.

Se llama interacción cognitiva a la que se produce en ese contacto T-B, en la cual hay dos señales: la del receptor de la célula T (TCR) que reconoce los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad de la clase II sobre la célula B en asociación con péptidos propios o extraños y la que produce la IL4 liberada. Como resultado de esta interacción y de la señal aportada por la IL4 se induce a la síntesis de IgE.

No sólo se produce esta interacción cognitiva, sino que también interviene una interacción no-cognitiva en la que una nueva señal es capaz de convertir a la célula B en sensible a la acción de la IL4.

Este tipo de interacción podría explicar alguna de las condiciones patológicas en las cuales exis-

te una fuerte activación T, producción de IL4 y producción de IgE policlonal. Es el caso de la IgE policlonal producida en las infestaciones parasitarias, ya que la mayoría de esta inmunoglobulina es inespecífica para el parásito y en su lugar se dirige frente a antígenos desconocidos. Esta situación se debe probablemente a la activación policlonal de las células B por contacto con células T activadas que producen IL4.

ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B

Tal y como hemos comentado, las células B productoras de IgE son estimuladas por el contacto físico con las células T, lo cual les vuelve respondedoras a las señales de diferenciación mediadas por las citoquinas¹⁰.

La señal de diferenciación o cambio de la célula B hacia la producción de IgE le viene dada fundamentalmente por la acción de la IL4. En este sentido las células B pueden recibir este estímulo 2-4 días más tarde tras la activación inicial T. La IL4 actúa sobre las células precursoras B IgM/IgD positivas para inducir la síntesis de IgE. La IL4 permite que las células B activadas produzcan IgE en un ambiente diferente del inicial tras la activación por la célula T.

Utilizando un sistema experimental en ratón se ha demostrado que otros tipos celulares tales como los mastocitos y basófilos pueden inducir a la célula B a producir IgE cuando se activan a través del receptor de la IgE tras su acoplamiento. Esta producción de IgE es dependiente de IL4. Así los mastocitos y basófilos pueden prolongar una respuesta local de IgE, mientras el alérgeno esté en contacto.

En humanos la activación B puede también ser inducida por monocitos en lugar de linfocitos T, en presencia de hidrocortisona y de IL4. Ocurre bajo concentraciones fisiológicas de hidrocortisona y es independiente de células T.

MECANISMOS MOLECULARES PARA EL CAMBIO DE ISOTIPOS

Durante la respuesta inmune los linfocitos expresan diferentes inmunoglobulinas con la misma región variable. Este fenómeno llamado cambio de isotipo (isotype switching) permite que

una sola clona de células B produzca anticuerpos con la misma especificidad fina, pero diferentes funciones efectoras. Para cambiar la producción de isotipo la célula B necesita dos señales.

Las dos señales requeridas para producir IgE son emitidas a la célula B por las células T, a través de una compleja serie de interacciones¹¹. La señal 1 es dependiente de citoquinas y resulta en la activación de la transcripción en una región específica del locus Ig, lo que determina la especificidad de isotipo. La señal 2 activa la maquinaria de recombinación del DNA¹².

Las moléculas de inmunoglobulina unidas a la superficie de la célula B unen el Ag provocando la internalización del complejo Ag-receptor. Posteriormente el Ag es procesado en los endosomas y de nuevo es presentado a una célula T Ag-específica en forma de péptidos fragmentados asociados a las moléculas de la clase II del SMH. El reconocimiento del complejo en la superficie de la célula B por el TCR de la célula T da lugar a dos acontecimientos cruciales: 1) la secreción de linfoquinas (IL4 y/o IL13) que proveen la señal para la inducción de IgE, y la expresión del ligando CD40 (CD40L) por las células T, que está ausente en las células T en reposo. La expresión de esta molécula convierte a las células T en competentes para inducir el cambio de isotipo.

La unión de la IL4 a su receptor sobre la célula B envía la primera señal para el cambio de isotipo e induce la transcripción del locus genético de la cadena pesada C ϵ .

El CD40L une CD40 (glicoproteína integral de membrana, miembro de la familia del receptor del TNF) que se expresa en las células B, macrófagos, células dendríticas y células endoteliales. El CD40L induce la oligomerización del CD40 de las células B y se envía la segunda señal que activa la recombinación hacia la síntesis IgE.

Existe un circuito de amplificación que involucra moléculas coestimuladoras, como el par CD28/27, que induce secreción de linfoquinas y síntesis de IgE.

REGULACIÓN DEPENDIENTE DE CITOQUINAS

El descubrimiento de que el cambio de isotipos estaba dirigido por citoquinas¹³ y de que la IL4 era

específicamente responsable de inducir el switching a IgE¹⁴ supuso un gran avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subrayan los efectos de esta citoquina. El interferón gamma IFN- γ es un antagonista del cambio de isotipo inducido por la IL4, siendo las células T activadas su máxima fuente de producción.

La relativa proporción de IL4/IFN- γ producida por las células TH2 o TH1 determina si las células B van a producir IgE o no.

En cuanto a los efectos de la IL4 sobre las células B humanas se sabe que esta citoquina induce no sólo la síntesis de IgE sino también la síntesis de IgG⁴¹⁵

Las clonas de células B estimuladas con IL4 y activadas por células T CD4⁺ expresan la producción simultánea de IgM, IgG4 e IgE. Esta observación llevó a sugerir que durante la expansión clonal el cambio de isotipo puede ocurrir en pasos sucesivos de IgM a IgG4 e IgE¹⁶.

Además de la IL4, otras citoquinas tales como la IL13 están implicadas en la síntesis de IgE. La IL13 es capaz de inducir la expresión de la línea germinal ϵ en las células B, pero es de dos a cinco veces menos potente que la IL4 en inducir síntesis de IgE¹⁷. La IL1, IL2 y IL6 ayudan de alguna forma a la síntesis de IgE, participando en la activación de las células T (IL1, IL2, IL6), la IL6 e IL2 potencian la secreción de IgE por el linfocito B. La IL12 al igual que el IFN γ es capaz de activar las células TH1.

El IFN γ , IFN α y TGF β ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de IgE. Parece que la actividad inhibitoria del TGF β sobre la síntesis de IgE se debe a la inhibición de la IL4 por las células T.

Es de gran importancia no sólo conocer los mecanismos inmunorreguladores de la síntesis de IgE, sino que alteraciones en los mismos están involucrados en el desarrollo de las enfermedades alérgicas. Por este motivo se han estudiado infiltrados de tejidos inflamados en diferentes enfermedades alérgicas. Así al estudiar infiltrados conjuntivales en pacientes con conjuntivitis alérgica se han podido observar acúmulo de diferentes tipos celulares tales como mastocitos, eosinófilos y linfocitos. Al estudiar las células T de estos infiltrados se pudo comprobar que eran células T CD4⁺, con capacidad para producir IL4 pero no IFN γ e inducir síntesis de IgE en las células B¹⁸.

En la conjuntivitis vernal se observa un acúmulo de células TH2 capaces de producir IL4 e IL5 pero no IFN γ , de tal forma que se induce a la síntesis de IgE y a la diferenciación de eosinófilos.

Cuando se estudia la capacidad funcional de las clonas T de alérgicos y se preparan clonas específicas que respondan a alérgenos particulares tales como ácaros o pólenes, se encuentra que la mayoría de ellas producen sólo IL4 y no IFN γ ¹⁹.

El problema que se plantea es conocer por qué estas células T poseen este patrón particular de producción de citoquinas. Pueden influir los siguientes factores: 1) el tipo de alérgeno (algunos alérgenos tienen propiedades químicas especiales que inducen a la activación TH2), 2) el tipo de inmunización (la crónica o repetida exposición a cantidades mínimas de alérgeno), 3) influencias microambientales que favorezcan la activación del fenotipo TH2.

Otro importante hallazgo es que las células T «naive» no producen IL4. En este sentido hay que considerar que no sólo las células T producen IL4, sino que otras células como los mastocitos tras la activación del receptor Fc ϵ pueden producirla, estas células son dependientes de IL3 y portan receptores de alta afinidad para la IgE.

La IL4 producida por activación de los mastocitos juega un papel importante en el paso de células T «naive» que no producen IL4, IL13 o IL5 a células T productoras de estas citoquinas, con lo que se establece un círculo vicioso de inflamación alérgica.

En resumen, la síntesis de IgE está controlada por numerosas citoquinas, de las cuales la IL4 y IL13 son las únicas que han demostrado participación directa en el cambio de isotipo de las células B. Sin embargo, varias otras tales como la IL2, IL5, IL6, IL12; IFN γ , IFN α , TGF β modulan la síntesis de IgE dependiente de IL4 y IL13. Algunas de estas citoquinas tales como la IL10 puede tener un potencial papel en el tratamiento de las enfermedades alérgicas¹⁹.

PAPEL DE LA INTERACCIÓN CD40-LIGANDO DE CD40 EN EL CAMBIO DE ISOTIPO

La clave en la interacción T-B es el antígeno expresado sobre todas las células B, conocido

como CD40 y su contrarreceptor, el ligando de CD40 expresado en las células T (sólo tras su activación). Posteriormente las linfoquinas producidas por la célula T actuarán sobre la célula B induciéndola a diferenciarse²⁰. La demostración de que la interacción entre CD40 y su ligando juega un papel crítico en el cambio de isotipo a IgE viene de dos observaciones: La primera es que si bloqueamos esta interacción utilizando una forma soluble del CD40, se bloquea la producción de IgE por células T y B de sangre periférica que teóricamente están interaccionando en presencia de IL4. La otra evidencia sobre la importancia de la interacción CD40-Ligando CD40 viene de la observación de que pacientes que sufren un síndrome de Hiper-IgM ligado a cromosoma X, y cuyas células B son incapaces de sufrir cambio de isotipo de IgM a otro tipo de Ig, presentan mutaciones en el ligando de CD40, resultando en un fallo en la expresión de dicho ligando y en el fallo de la interacción CD40-Ligando de CD40.

El mecanismo por el cual la unión del CD40 en la superficie de las células B provoca el cambio de isotipo involucra una delección de DNA entre el gen para IgM y el gen para IgE, cuando se explora la estimulación con IL4.

Parece ser que la unión del CD40 activa un número de acontecimientos intracelulares, de los cuales ninguno es específico para CD40²¹.

Un punto importante es el papel del CD40 en el desarrollo de las células B. Para estudiarlo, estos mismos autores han creado ratones en los cuales el gen CD40 ha sido inactivado. Estos ratones desarrollan un número normal de células B, sin embargo, estas células expresan sólo IgM en su superficie y son incapaces de sufrir cambio de isotipo por acción del CD40 y la IL4. Son incapaces de producir IgE ni siquiera *in vivo*. No presentan una buena respuesta de Ac frente a Ag T-dependientes y no tienen centros germinales. Así demuestran que la interacción CD40-Ligando de CD40 no es sólo importante en el cambio de isotipo sino que también lo es en las respuestas de Ac T-dependientes. En contraste, los ratones con déficit CD40 producen respuestas de Ac normales para Ag-T-independientes que activan directamente las células B. Ej: haptenos conjugados a LPS o a Ficoll.

REORDENACIÓN DE LOS GENES EN LA CÉLULA B QUE PROVOCAN LA EXPRESIÓN DE IGE

La molécula de IgE está compuesta por cadenas ligeras y pesadas codificadas por distintos clusters de genes. El cluster de genes para la cadena ligera llamada (λ) está en el cromosoma 22 y el locus de la cadena pesada en el cromosoma 14²². Estos loci están configurados de tal manera que se requiere una serie de reordenamientos para generar el repertorio extenso de las especificidades de la inmunoglobulina.

Las regiones variables κ y λ se generan a través de la recombinación somática de los segmentos variables ($V\kappa$ y $V\lambda$) y de los segmentos de la juntura «joining» ($J\kappa$ y $J\lambda$), mientras que la región variable de la cadena pesada resulta de la recombinación de segmentos variables, de la juntura y de diversidad. En el caso de las cadenas pesadas la unión o «joining» del segmento D a J_H precede la unión de V_H al segmento $(D)J_H$ previamente recolocado.

El proceso de la recombinación de $(D)J_H$ y $V_H(D)J_H$ involucra la yuxtaposición de las repeticiones de heptámero y nonámero localizados corriente arriba de los genes V, y lo mismo a lo largo de los genes J y a ambos lados de los genes D. Cuando estas secuencias de señales de recombinación son llevadas en conjunto el DNA que interviene forma un bucle y ocurre la recombinación por la unión de secuencias $(D)J_H$ o $V_H(D)J_H$ y escisión del DNA.

Estos acontecimientos de recombinación son efectuados por los productos de recombinación de genes activadores RAG-1 y RAG-2 que provocan la rotura y unión del DNA por su actividad topoisomerasa.

Durante el desarrollo de una respuesta inmune el linfocito B puede expresar diferentes isotipos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas que comparten la misma región de unión al antígeno. El fenómeno del cambio de isotipo permite que una sola clona de células B produzca anticuerpos con la misma especificidad pero con diferentes funciones efectoras determinado por el cambio de isotipo de cadena.

La transcripción del DNA del segmento $V_H(D)J_H$ al segmento $C\epsilon$ es seguido del splicing de las regiones intrónicas y resulta en mRNA maduro para la cadena pesada ϵ .

Con el fin de producir una molécula funcional de Ig, las células B deberán sufrir dos acontecimientos de recolocación. El primero involucra la recombinación $V_H(D)J_H$ y da lugar a una célula B IgM^+IgD^+ . El segundo involucra cambios de isotipo y da lugar a células que expresan IgG, IgA o IgE.

RECEPTOR DE BAJA AFINIDAD (FcεRII)

El receptor de baja afinidad para IgE (FcεRII) fue descrito inicialmente en linfocitos, estando su expresión en los linfocitos B restringida a las células maduras²³. También ha sido localizado en la superficie celular de linfocitos T, macrófagos, eosinófilos, plaquetas y células NK, lo que se ha relacionado con la citotoxicidad frente a parásitos IgE-dependiente y con la liberación de mediadores de la inflamación.

Se trata de una sialoglicoproteína de 45 kD, cuya secuencia proteica, deducida de la secuencia de nucleótidos de su DNA que ya ha sido clonado, está constituida por 321 aminoácidos. Su orientación en la membrana celular es inusual, presentando el extremo amino-terminal intracitoplasmático y su extremo carboxi-terminal en el exterior.

Han sido descritas dos especies diferentes de receptor, FcεRIIa y FcεRIIb²⁴, que se diferencian por seis aminoácidos localizados en la región N-terminal citoplasmática, lo que podría estar en relación con su diferente función biológica. El FcεRIIa se expresa en las células B normales, mientras que el FcεRIIb se detecta en linfocitos T, eosinófilos y monocitos, por lo que se ha sugerido que esta segunda especie de FcεRII sería la implicada en la fase efectora de la alergia y la infestación por parásitos.

El interés en el estudio de este receptor FcεRII se incrementó al comprobar que era idéntico al CD23, un marcador de la superficie celular de las células B que se expresa sobre células B activadas antes de su transformación en células plasmáticas²⁵. Es posible que este receptor sea el foco de señales que promocionen el crecimiento celular enviadas a las células B activas por factores estimuladores de las células B. No obstante, hay autores que ponen en duda este hecho, preguntándose si se trata en realidad de la misma molécula con dos nombres distintos o, por el contrario, de dos entidades diferentes²⁶.

Además, el FcεRII linfocitario está relacionado topográficamente con el complejo de histocompatibilidad clase II, por lo que se ha sugerido que tenga algún papel en la presentación de antígenos. De hecho, tras la estimulación con sustancias que mimetizan el efecto del antígeno, ambas moléculas convergen en un polo de la superficie del linfocito B, focalizándose en puntos de interacción celular entre linfocitos B que están formando agregados. Algunos anticuerpos seleccionados por su habilidad para inhibir la unión de la IgE al FcεRII reaccionan con el HLA-DR. Los complejos IgE-antígeno estimulan la expresión tanto de FcεRII como de Ia en la superficie de los linfocitos B murinos²⁷.

En conclusión, puesto que el CD23 está presente en los fluidos corporales normales y en particular en el centro germinal, se especula que esté implicado en la regulación de los procesos de diferenciación y maduración de varios tipos celulares (linfocitos T y B, monocitos...). Las evidencias también indican que pueda jugar un importante papel en la iniciación de la respuesta inmune, actuando como una molécula de adhesión entre linfocitos B²⁸. En ciertas situaciones patológicas (infestaciones parasitarias, enfermedades autoinmunes, leucemia linfocítica crónica, trasplante de médula ósea,...), parece que puede actuar como un marcador útil, quedando por determinar si las alteraciones en su molécula contribuyen directamente en el desencadenamiento de las mismas. En el caso de las enfermedades alérgicas se encuentra implicado en la iniciación y desarrollo de los procesos inmunológicos e inflamatorios asociados con éstas, encontrándose en todas ellas un incremento tanto de la expresión de CD23 en las superficies celulares de linfocitos y monocitos como de los niveles séricos de CD 23 soluble²⁹.

La unión o cross-linking del FcεRII intacto sobre la célula B resulta en una señal que frena la producción de IgE³⁰.

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE IGE POR ANTICUERPOS ANTI-IGE

Los anticuerpos anti-IgE humanos han sido implicados en la regulación de la síntesis de IgE. Pertenecen a la clase IgG y en su mayor parte existen en forma de complejos inmunes asociados a la

IgE sérica. Su función biológica es heterogénea, pueden ser anafilactogénicos o no, bloquear o activar la IgE citofílica y regular la síntesis de IgE³¹.

Conociendo la importancia funcional del receptor FcεRII, así como la existencia de autoanticuerpos anti-IgE, Stadler³² desarrolló un modelo para investigar los efectos de estos anticuerpos sobre el receptor de baja afinidad y pudo comprobar cómo los anticuerpos anti-IgE dirigidos frente al dominio CεH3 eran capaces de competir con la IgE radiomarcada, inhibiendo la unión y disociando la IgE previamente unida. En contraste, los anticuerpos anti-IgE con especificidad para el dominio CεH2 no disociaban la IgE previamente pegada al receptor FcεRII y facilitaban la unión provocando la unión de complejos inmunes a la superficie celular. Parece ser que la función biológica de los anticuerpos anti-IgE depende del epítopo que estos anticuerpos reconozcan en la IgE.

FACTORES NEUROENDOCRINOS

Algunos factores neuroendocrinos regulan no sólo la fase efectora de la respuesta alérgica, sino que también influyen sobre los mecanismos que controlan la producción de IgE. Concentraciones fisiológicas de péptidos neuroendocrinos tales como corticotrofina incrementan la síntesis de IgE *in vitro*, mientras que dosis farmacológicas elevadas la inhiben³³. Este hallazgo abre nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades alérgicas y puede ofrecer respuesta a la participación del aspecto psicosomático de las enfermedades alérgicas.

En los últimos años, se han clarificado bastante los mecanismos responsables de la activación y mantenimiento de las enfermedades alérgicas. No se puede ya dudar que la hiperproducción de IgE en los pacientes alérgicos resulta de la activación por las células TH2 capaces de producir IL4³⁴. Se investiga actualmente sobre la posibilidad de modular esta respuesta con el fin de controlar las enfermedades dependientes de la hiperproducción de IgE, en este sentido la caracterización de los acontecimientos requeridos para la activación selectiva de células TH1 o TH2 puede ofrecer la posibilidad de manipulación farmacológica, permitiendo el desarrollo de drogas capaces de activar o inhibir de manera selectiva la producción de IgE *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bennich H, Von Bahr-Lindestrom H. Structure of Immunoglobulin E. En: Progress in Immunology II vol I. Amsterdam, North Holland: Publishing Co 1974.
2. Bazin H, Beckers A, Querinjean P. Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG2A, IgG2B, IgG2C. Eur J Immunol 1974; 4: 44-48.
3. Lehrer SB. Isolation and immunochemical properties of mouse IgE. Immunochemistry 1976; 13: 837-843.
4. Coleman JW, Helm BA, Stanworth DR, Gould HJ. Inhibition of mast cell sensitization *in vitro* by a human immunoglobulin-chain fragment synthesized in *Escherichia coli*. Eur J Immunol 1985; 15: 966-969.
5. Gould, HJ, Helm BA, Marhs PJ, Geha RS. Recombinant human IgE. Int Archs Allergy Appl Immunol 1987; 82: 392-393.
6. Romagnani S. T cells, cytokines, and IgE regulation in allergic disease. En: Progress in Allergy and Clinical Immunology 3. SGO Johansson. H. Hogrefe and Huber Publishers. Stockholm 1995, 5-12.
7. Del-Prete GF.; Maggi E.; Troncone R.; Giudizi GM. Almerigogna, F., Ricci, M.: *In vitro* production of IgE by human peripheral blood mononuclear cells. II. Cells involved in the spontaneous IgE production in atopic patients. Romagnani-S Clin-Exp-Immunol 1980; 43(3): 579-88.
8. Ricci M, Del-Prete GF, Maggi E, Lanzavecchia A, Romagnani S. Advances in understanding of mechanisms of IgE dysregulation in atopy by the application of *in vitro* methods. J Allergy Clin Immunol 1986; 78(5 Pt 2): 988-94.
9. Romagnani S. Human TH1 and TH2: doubt no more. Immunol Today 1995; 16: 374-379.
10. Heuser CH, Brinkmann V, Delespesse G, Kilchherr E, Blaser K, Le Gros G. Current concepts of IgE regulation. ACI News 1991; 3: 47-57.
11. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. Nature 1994; 367: 425-428.
12. Vercelli D. Molecular Mechanisms of isotype switching to IgE. En: Allergy and allergic diseases: The new mechanisms and therapeutics. Ed by J. A. Denburg. Humana Press Inc. Totowa NJ 1988: 3-11.
13. Stavnernezer J. Immunoglobulin class switching. Curr Opin Immunol 1996; 8: 199-205.
14. Del Prete GF, Maggi E, Parronchi P, Chretien Y, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Bancherau J, De Vries JE, Romagnani S. IL-4 is an essential factor for the

- IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988; 140: 4193-4198.
15. Lundgren, M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CIE, Hammarstöm L, Severinson E. Interleukin-4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1311-1315.
 16. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by Interleukin 4 and signal provided by activated CD4⁺ T cell clones. *J Exp Med* 1991; 173: 747-750.
 17. Punnonen J, Aversa G, Gocks BG, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefity R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3730.
 18. Maggi E, Biswas P, Del Prete GF, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emi L, De Carli M, Tiri A, Ricci M, Romagnani S. Accumulation of TH2-like helper T-cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 146: 1169-1174.
 19. Virtanen T, Maggi E, Manetti R, Piccini MP, Sampognaro S, Parrochi P, De Carli M, Zuccati G, Romagnani S. No relationship between skin-infiltrating Th2-like cells and allergen-specific IgE response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 411-420.
 20. Punnonen J, De Vries E. Cytokines and IgE regulation. En: *Allergy and Allergic Diseases: The New Mechanisms and Therapeutics*. Ed J. A. Denburg. Humana Press Inc Totowa NJ 1988: 13-40.
 21. Geha R. Regulation of IgE. 20 CIA Symposium Nantucket, Massachusetts, USA Sep 25-29, 1994.
 22. Bacharier L B, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of Immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 257-269.
 23. Kikutani H, Suemura M, Owaki H, Nakamura H, Sato R, Yamashaki K, Barsumian EL, Hardy RR, Kishimoto T. Fcε receptor, as specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J Exp Med* 1986; 164: 1455-1469.
 24. Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M, Kishimoto T. Two species of human Fcε receptor II (FcεRII/CD23): Tissue-specific and IL-4 specific regulation of gene expression. *Cell* 1988; 55: 611-618.
 25. Flores-Romo L, Johnson GD, Veronesi A, Ghaderi A, Stanworth DR, Gordon J. Functional implication for the topographical association between MHC class II and the low affinity IgE receptor. Occupancy of CD23 blocks the ability of B cells to present alloantigen to T cells. *Eur Immunol* 1990; 20: 2465-2469.
 26. Mac Dermot J, Joseph S, Dollery CT. The identity of IgE receptors (FcεRII) that mediate cellular activation of human macrophages: evidence against a role for CD 23. *Mol Immunol* 1992; 29: 71-76.
 27. Richards ML, Marcelletti JF, Katz DH. IgE-antigen complexes enhance FcεR and Ia expression by murine B lymphocytes. *J Exp Med*.
 28. Spiegelberg HL. FcεR2/CD23: Its discovery and possible functions. En: Gurdin J. ed. CD23. A novel multifactorial regulator of the immune system that binds IgE. Basilea: Karger 1991; 1-8 (Monograph in Allergy vol 29).
 29. Dugas B, Paul-Eugene N, Mencia-Huerta JM, Branquet P. Role of CD23 in the regulation of the immune response: possible relevance to clinical disorders. En: Godard Ph, Bousquet J and Michel Fb eds. *Advances in Allergology and Clinical Immunology. Proceedings for the Plenary Sessions and Afternoon Symposia of the XVth European Congress of Allergology and Clinical Immunology*. Paris. France. 10-15 may 1992. New Jersey: The Parthenon Publishing Group 1992; 39-47.
 30. Scherr E, Macy E, Kimat H, Gilly M, Saxon A. Binding of low affinity FcεR on B cells suppress ongoing human IgE synthesis. *J Immunol* 1989; 142: 481-489.
 31. McKenzie JN. The production of «rose asthma» by an artificial rose. *Am J Med Sci* 1986; 91: 45.
 32. Miescher S, Vogel M, Stämpfli MR, Stadler BM. Not all Anti-IgE are the same. The effects of Anti-IgE antibodies on IgE binding to FcεRII. Correlate with their epsilon domain specificity. *ACI News* 1993; 6: 163-164.
 33. Aebischer Y, Stämpfli MR, Zürcher A. Miescher, S.; White, R. R.; Stadler, B. M.: Immunoglobulin E synthesis and the brain. *ACI News* 1993; 6: 169-170.
 34. Romagnani S, Parrochi P, Maggi E. The «Th2 Hypothesis» in Allergy. En: *Progress in Allergy and Clinical Immunology*. Oehling AK, Huerta López J.G. Ed. Hogrefe and Huber Publishers. USA 1997: 12-16.

Panalergenos

C. Y. Pascual, J. Fernández Crespo, M. Martín Esteban

Servicio de Alergia Pediátrica. Hospital Universitario La Paz. Madrid

ALERGENOS Y PANALERGENOS

En los últimos siete años se ha realizado un gran avance en el estudio de los alergenios, debido mayoritariamente a la posibilidad de aplicación de las técnicas de biología molecular. Una vez identificados los alergenios mayores de un extracto madre alérgico se aíslan y purifican los alergenios. La purificación es un proceso complejo realizado mediante diferentes pasos independientes, que aprovechan varias propiedades de carácter físico-químico de la proteína (solubilidad, carga iónica, peso molecular, propiedades de afinidad con otras moléculas) para separarlas progresivamente. Una vez que el alérgico ha sido purificado, y confirmadas sus características alérgicas puede ser de gran utilidad para el diagnóstico y fundamentalmente para la investigación. Puede ser utilizado para la obtención de anticuerpos monoclonales y resulta de gran importancia para el análisis de la estructura primaria (composición y secuencia de aminoácidos), estudio de mecanismos inmunológicos e identificación de epítopos¹.

La utilización de técnicas moleculares como la secuenciación de ADN, clonaje, uso de péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales en el estudio de proteínas alérgicas ha dado lugar a una gran cantidad de información sobre una amplia variedad de alergenios. Antes de la utilización de la tecnología recombinante, los avances en la caracterización bioquímica de los alergenios fueron lentos, debido al gran número de moléculas alérgicas, la cantidad de alergenios presentes en la materia prima alérgica y a la disponibilidad de métodos adecuados para la identificación de alergenios. Mediante la utilización de las técnicas de biología molecular es posible disponer de material alérgico en grandes cantidades, estable y reproducible. Los alergenios recombinantes pueden producirse con una elevada pureza, mejorando significativamente el diagnóstico con algunos alergenios que son lábiles y se degradan rápida-

mente. Además, el clonaje de alergenios permite determinar de una forma relativamente sencilla la estructura primaria, la homología con otros alergenios y proteínas no alérgicas (reactividad cruzada) y el análisis de epítopos para células B y T. El clonaje de ADN correspondiente a la proteína alérgica es un proceso que incluye varias etapas: selección del material de origen del ADN a clonar, preparación de los fragmentos de ADN para su inserción en el vector y posterior propagación, identificación del clon que produce la proteína recombinante de interés y la expresión del alérgico clonado en grandes cantidades. Estos procedimientos han incrementado significativamente el conocimiento de las características inmunológicas de más de treinta alergenios, especialmente aquellos implicados en enfermedades alérgicas respiratorias.

Para profundizar en el concepto y significado de «Panalérgico», necesitamos previamente referirnos a la reactividad cruzada entre alergenios, base para entender la idea de red de alergenios, que implica la existencia de panalergenios. Muchas veces en pacientes, se encuentran respuestas IgE a una variedad de alergenios con los que aparentemente no ha tenido relación. La significación clínica de estos anticuerpos no es siempre la misma, puede variar desde producir síntomas al primer contacto hasta ser simples testigos inocentes. Su historia en la alergología no es reciente, en las primeras décadas del siglo ya preocupaba la aparición de «falsos positivos», cuando en alergia a alimentos aparecían test cutáneos positivos frente a productos bien tolerados por los enfermos. El prurito oral al comer manzana, en pacientes con sensibilización a abedul, se conoce desde hace más de 50 años.

Proteínas, glicoproteínas o carbohidratos alérgicos, con un alto nivel de homología estructural o funcional, que se encuentran en diferentes alergenios, son considerados «panalergenios». Estos elementos pueden limitarse al reino animal

o vegetal, pero algunos tienen una distribución que puede abarcar ambos como es el caso de las profilinas.

Panalergenos de origen vegetal

Los pacientes sensibilizados clínicamente a un único polen son relativamente raros. Es frecuente encontrar sensibilizaciones «in vivo» e «in vitro» a varios pólenes aparentemente de familias diferentes y sin relación, con los cuales el paciente puede no haber tenido nunca contacto. La presencia de anticuerpos IgE específicos frente a un polen no indica que el contacto con este mismo polen sea necesariamente el origen de este anticuerpo. Han sido los avances de la biología molecular como instrumento para el estudio de los alergenicos los que han permitido el reconocimiento de homologías entre los diversos alergenicos y la existencia de proteínas comunes en varios de ellos, como es el caso de las profilinas. Estas proteínas que son consideradas proteínas de estructura altamente conservada están presentes en todas las células eucariotas. Un ejemplo es el alergenico Bet v 2 del abedul, alergenico menor del abedul y se ha sugerido que pueden ser la causa de sensibilización múltiple a diversos pólenes e incluso pólenes y frutas en algunos pacientes, aunque no está aún claro el papel que juegan en la clínica. Otras proteínas de las plantas como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP) presentes al menos en todas las plantas angiospermas, a las que pertenece el Bet v 1, alergenico mayor del abedul, pueden ser la base del llamado síndrome abedul-manzana-apio y del reconocimiento de alergenicos de otras Fagales como el avellano (*Corilus avellana*) Cor a 1, aliso (*Alnus incana*) Aln i 1 y carpe (*Carpinus betulus*) Car b 1.

Otras proteínas como algunas albúminas vegetales, que suelen ser proteínas de depósito, como los alergenicos mayores de la mostaza amarilla y la mostaza oriental (Sin a 1 y Bra j 1) también han sido considerados panalergenicos. Algunas proteínas con capacidad enzimática como inhibidores de la tripsina de la soja y cacahuete, cisteínas como papaína, quimopapaína, bromelina y ananás, también pueden ser consideradas como panalergenicos.

El látex, en el que actualmente se han caracte-

rizado ya siete alergenicos, es un ejemplo de alergenico complejo en el que juegan papel varios panalergenicos vegetales como la proheveína (Peso molecular 20 kD, Hev b 6) que es una proteína perteneciente a los ligandos de la quitina es el alergenico más abundante en el látex. Se han descrito homologías estructurales entre proheveína, alergenicos de ambrosía y algunas lectinas de cereales (aglutininas cereales). El látex también contiene lisozima (Peso molecular 30 kD) y se han descrito homologías con algunos alergenicos de frutas (plátano y aguacate). También tiene profilina entre sus componentes además de una proteína de 46 kD de la familia de las patatinas (Hev b 7), común en las solanáceas, proteína de depósito homóloga a las encontradas en patata y tomate. Tanto las patatinas como las lisozimas son consideradas proteínas de defensa de las plantas frente a la agresión del medio.

Panalergenos de origen animal

Pertenecientes al grupo de proteínas del grupo «Transportadoras de cationes», tenemos a las parvalbúminas de peces y anfibios. Son proteínas sarcoplásmicas capaces de unirse al calcio y una de ellas ha sido descrita como antígeno mayor del bacalao Gad c 1. Estas proteínas son las responsables en mayor o menor medida de la reactividad cruzada entre diversas especies de peces y pueden ser considerada como un panalergenico.

El 35 % de los pacientes clínicamente sensibilizados a epitelio de perro están también sensibilizados a la seroalbúmina del animal y reconocen las albúminas séricas de gato, pollo, ratón y rata. Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de estas albúminas se evidencia una alta homología en las secuencias, desde un 82 % con la humana a un 75 % con la de ratón. La albúmina sérica se ha confirmado como el alergenico común en el llamado síndrome «gato-carne de cerdo». La seroalbúmina de pollo es también el alergenico responsable del síndrome «plumas-huevo». La fracción de las livetinas de la yema de huevo responsable de la clínica es homóloga con la albúmina sérica.

Una tropomiosina, proteína unión de la actina, que interviene en la motilidad animal, ha sido descrita como alergenico mayor en varias especies de

crustáceos decápodos y en la cucaracha. Se ha demostrado reactividad cruzada entre caracol, ácaros del polvo doméstico, quironómidos y otros mosquitos, que puede ser atribuida en parte a la tropomiosina. Se ha descrito reactividad cruzada *in vitro* entre la larva de *Anisakis simplex*, la blattella y la gamba en poblaciones infantiles sin parasitación por el nematodo, que podría ser debida a la tropomiosina.

También en el reino animal hay que considerar algunas proteínas con actividad enzimática semejante y una cierta homología secuencial que pueden ser catalogadas como panalergenos. Las Hidrolasas (EC3) como fosfolipasas, lisozimas, amilasas, hialuronidasas, cisteín-proteasas y serín-proteasas han sido descritas como alergenios mayores en himenópteros, ácaros y huevo. Algunas de estas moléculas tienen capacidad para alterar la cohesión de la barrera epitelial o inactivar moléculas de protección natural. Incluso la cisteín-proteasa que es el alergenio mayor del *D. pteronyssinus*, Der p 1, tiene capacidad para estimular la síntesis de IgE en virtud de su habilidad para romper la unión del receptor de baja afinidad para IgE, CD23, en la superficie del B linfocito, lo que significaría una alteración en el mecanismo de feed-back de regulación de la síntesis de la inmunoglobulina, elevando la cantidad de fragmentos de CD23 soluble, que daría lugar a un aumento de la producción de IgE.

La red de panalergenos es aún muy poco conocida. La existencia de un perfil característico de sensibilización a ciertos panalergenos en cada paciente, con la posibilidad de predecir de algún modo su mapa de sensibilizaciones futuras, puede ser una hipótesis con visos de realidad, conforme avancen nuestros conocimientos en esta desafiante «Red» de sensibilizaciones conectadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Galant SP. Common food allergens. In: Bierman CW, Pearlman DS. eds. Allergic diseases of infancy, childhood, and adolescence. Philadelphia: WB Saunders 1980; 211-18.
- Aalberse RC. Clinically significant cross-reactivities among allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 261-264.
- Monpatra SS. Structural motif as a basis of cross-reactivity among pollen allergens. In Kraft D, Sehon A. eds. *Molecular Biology and Immunology of Allergens*. Boca Raton. Ann Arbor, London; Tokio: CRC Press 1993: 69-81.
- Huang SK, Marsh DG. Immunogenetics of allergic disease. In Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW (Eds.). *Allergy: Principles and practice*. St. Louis: Mosby, 1993; 60-63.
- Liebers V, Sander I, Van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Baur X. Overview on denominated allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 494-516.
- Bernhisel-Broadbent J. Allergenic cross-reactivity of foods and characterizations of food allergens and extracts. *Ann Allergy* 1995; 75: 295-303.
- Valenta R, Duchene M, Ebner C, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant panallergens. *J Exp Med* 1992; 175: 377-85.
- Aalberse RC, van Ree R. Cross-reactive Carbohydrate Determinants. *Highlights in food allergy. Monogr Allergy Basel Karger* 1996; 32: 78-83.
- Juhlin-Dannfelt C. About the occurrence of different types of pollens and its implications for diagnosis and therapy. *Nordick Med* 1943; 20: 23-28.
- Wüthrich B, Stager J, Johansson SGO. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990; 45: 566-71.
- Calkhoven PG, Alberse M, Koshte VL, et al. Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross reactive structure. *Allergy* 1987; 42: 382-380.
- Valenta R, Kraft D. Type I allergic reaction to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 893-895.
- Moller C. Effect of pollen immunotherapy on food hypersensitivity in children with birch pollenosis. *Ann Allergy* 1989; 62: 343-45.
- Pham NH, Baldo BA. Allergenic relationship between taxonomically diverse pollens. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 599-606.
- Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, et al. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome. An *in vivo* and *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 699-707.
- Slater JE, Chabra SK. Latex allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 673-678.
- Konz KR, Chia JK, Kurup VP, Resnic A, Kelly KJ, Fink, JN. Comparison of latex hypersensitivity among patients with neurologic defects. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 950-954.
- Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, et al. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*).

- sis) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 690-97.
19. Akasawa A, Hsieh LS, Lin Y. Serum reactivities to latex protein (*Hevea brasiliensis*). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1196-1205.
 20. M'Raihi L, Charpin D, Pons A, Bongrand P, Vervloet D. Cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 129-30.
 21. Blanco C, Carrillo T, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Latex allergy: Clinical features and cross reactivity with fruits. *Ann Allergy* 1994; 73: 309-14.
 22. Beezhold DH, Sussman GL, Liss GM, Chang NS. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 416-22.
 23. Alenius H, Kurup V, Kelly K, Palosuo T, Turjanmaa K, Fink J. Characteristic IgE profile to natural rubber latex in patients with spina bifida and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 300.
 24. Yagami T, Sato M, Nakamura A, Shono M. One of the rubber latex allergens is a lysozyme. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 677-86.
 25. Baldo BA. Allergenic crossreactivity of fungi with emphasis on yeast: Strategies for further study. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 488-92.
 26. Savolainen J, Broberg A. Crossreacting IgE antibodies to *Pythium ovale* and *Candida albicans* in atopic children. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 469-74.
 27. Batanero E, Villalba M, Monsalve R, Rodríguez R. Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1264-1271.
 28. Werfel S, Cooke S, Sampson HA. Clinical reactivity to beef in cow milk allergy children. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 228.
 29. Spitzauer S, Schweiger C, Sperr WR, Pandjaitan B, Valent P, Muhl S, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, Rumpold H, Valenta R. Molecular characterization of dog albumin as cross-reactive allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 614-27.
 30. Drouet M, Sabbah A. The Pork/Cat Syndrome or Crossed Reactivity between cat Epitelia and Pork Meat. Wüthrich B, Ortolani C. (Eds.): *Highlights in Food Allergy*. Monogr Allergy. Basel, Karger 1996; 32: 164-173.
 31. Mandallaz MM, de Weck AL, Dahinde CA. Bird-egg syndrome. Cross reactivity between bird antigens and egg-yolk livetins in IgE mediated hypersensitivity. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1998; 87: 143-150.
 32. Añibarro B, García-Ara C, Ojeda JA. Bird-Egg Syndrome in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 628-30.
 33. Anet J, Back JF, Baker RS. Allergens in the white and yolk of hen's egg. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 364-371.
 34. De Besque A. On asthma bronchiale in man provoked by cat, dog, and different other animals. *Acta Med Scand* 1937; 42: 237-55.
 35. Aas K. Fish allergy and the codfish allergy model. In Brostoff J, Challacombe SJ (Eds.). *Food allergy and intolerance*. London: Ballière-Tindall, 1987: 356-66.
 36. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 1975; 4: 203-208.
 37. Pascual C, Martin Esteban M, Crespo JF. Fish allergy: Evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr* 1992; 121: 29-34.
 38. De Martino, Novembre E, Galli L, et al. Allergy to different fish species in codallergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 909-14.
 39. Bernhisel-Broadben J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 730-7.
 40. Pascual CY, Larramendi CH, Martin Esteban M, Fiandor A, Ojeda JA. Fish allergy and fish allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 264.
 41. Pascual C Y, Fiandor A, Martin Esteban M, Larramendi CH, Ojeda JA. Cross-allergenicity of cod Gad c I with other fish species. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 151.
 42. Sachs MI, Yunginger JW. Food-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 1991; 11: 743-745.
 43. Leug PSC, Chu KH, Chow WK, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 882-90.
 44. Shanti KN, Martin BM, Nagpal JS, et al. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *J Immunol* 1993; 152: 5354-63.
 45. Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. Identification of a common major Crustacea allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 194.
 46. Lehrer SB, McCants ML. Reactivity of IgE antibodies with Crustacea and oyster allergens: evidence for common antigenic structures. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 113-139.
 47. Ardito S, Falagiani P, Giannoccaro F, et al. Reazione all'ingestione di lumache del genere *Helix* pomatia e possibile rapporto con la sensibilizzazione ai dermatofagoidi. *Studio clinico-immunologico*. *Folia Allergol Immunol Clin* 1990; 37: 199-204.
 48. Crespo JF, Pascual C, Helm R, Sánchez-Pastor S,

- Ojeda I, Romualdo L, Martín Esteban MM, Ojeda JA. Cross-reactivity of IgE-binding components between boiled Atlantic shrimp and German cockroach. *Allergy* 1995; 50: 918-924.
49. Witterman AM, Akkerdaas JH, Leeuwen J, Zee JS, Aalberse RC. Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 56-61.
 50. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996; 51: 108-113.
 51. Pascual C, Crespo JF. Anisakis, anisakiasis y alergia alimentaria. *Rev. Esp Alergol Immunol Clin* 1995; 10: 299-302.
 52. Del Pozo MD, Moneo I, Fernández de Corres, et al. Laboratory determinations in Anisakis simplex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 977-984.
 53. Pascual C, Crespo JF, Ortega N, Ornia N, San-Martín MS, Martín Esteban M. High prevalence of sensitization to Anisakis simplex in patients with increased levels of total IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 233.
 54. Pascual C, Crespo JF, San Martín MS, Ornia N, Ortega N, Caballero TM, Muñoz-Pereira, Martín Esteban M. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from Anisakis, German cockroach and chironomids. *Allergy* 1997; 52: 514-520.
 55. Pascual C, Crespo JF, Fernández Rodríguez C, Fiandor Roman A, Martín Esteban M. Alergenos y alergenicidad. En: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (Ed.). *Inmunopatología General. Tomo II. Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid, 1995: 223-96.
 56. Donovan R, Baldo BA. Recombinant DNA approaches to the study of allergens and allergenic determinants. En: Baldo BA. (DE). *Approaches to the Study of Allergens. Monographs in Allergy*, Basel, Karger 1990: 52.
 57. Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Martín Esteban M. Biología molecular aplicada al estudio de alergenos. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1994; 9: 1-3.
 58. Powrie WD, Nakai S. Characteristics of edible fluids of animal origin: eggs. En: Fennema OR. (Ed.). *Food chemistry*. New York, Marcel Dekker 1985: 829-55.
 59. Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RX, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 1047-59.
 60. Stein JP, Catterall JF, Woo SLC, et al. Molecular cloning of ovomucoid gene sequences from partially purified ovomucoid mRNA. *Biochemistry* 1978; 17: 5763-6.
 61. Li-Chan E, Nakai S. Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit Rev in Poultry Sci* 1989; 2: 21.
 62. Eigenmann PA, Huang SK, Ho DG, et al. Characterization of T cell clones and cell lines specific to ovomucoid. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 366-71.
 63. Bleumink E, Young E. Studies on the atopic allergen in hen's egg. II Further characterization of the skin-reactive fraction in egg white: immune electrophoretic studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1971; 40: 72-88.
 64. Johnsen G, Elsayed S. Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin. III. MHC Ia-binding peptide (OA 323-229) interacts with human and rabbit specific antibodies. *Mol Immunol* 1990; 27: 821-27.
 65. Elsayed S. Four linear and two conformational epitopes on the major allergenic molecule of egg (Gal d I), ovalbumin. En: Kraft, D, Schon, A. (Eds.). *Molecular Biology and Immunology of Allergens*. Ann Arbor, CRC Press 1993: 287.
 66. Kahlert H, Petersen A, Becker WM, et al. Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE. *Mol Immunol* 1992; 29: 1191-6.
 67. Jeltsch JM, Chambon P. The complete sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. *Eur J Biochem* 1982; 122: 291-7.
 68. Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, et al. Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature* 1965; 206: 757-8.
 69. Jung A, Sippel AE, Grez M, et al. Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5759-61.
 70. Szepefalusi Z, Ebner C, Pandjaitan R, et al. Egg yolk alpha-livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 932-42.
 71. Goldman AS, Anderson DW, Sellars WA, et al. Milk allergy Y. Oral challenges with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics* 1963; 32: 425-43.
 72. Mercier JC, Grosclaude F, Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de la caseine A_{s1} bovine. *Eur J Biochem* 1971; 23: 41-3.
 73. Brignon G, Ribadeau-Dumas B, Mercier JC, et al. Complete amino acid sequence of bovine A_{s2} casein. *FEBS Lett* 1977; 76: 274-7.
 74. Ribadeau-Dumas B, Brignon G, Grosclaude F, et al. Structure primaire de la casein B bovine. *Eur J Biochem* 1972; 25: 505-6.
 75. Bernard H, Wal JM, Creminon C, et al. Allergenic

- epitopes on bovine B-casein. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 210-6.
76. Mercier JC, Brignon G, Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de la caseine KB bovine. Sequence complete. *Eur J Biochem* 1973; 35: 222.
 77. Baldo BA. Milk allergies. *Aust J Dairy Technol* 1984; 39: 120-8.
 78. Hurley WL, Sculer LA. Molecular cloning and nucleotide sequence of bovine lactalbumin cDNA. *Gene* 1987; 61: 119-22.
 79. Hirayama K, Akashi S, Furuya M, et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 639-43.
 80. Elsayed SM, Aas K. Characterization of a major allergen (cod.): Chemical composition and immunological properties. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1970; 38: 536-40.
 81. Elsayed S, Apold J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M: locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy* 1983; 38: 449-59.
 82. Elsayed S, Aas K, Slett K, et al. Tryptic cleavage of a homogenous codfish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochemistry* 1972; 9: 647-51.
 83. Elsayed S, Apold J, Aas K, et al. The allergenic structure of allergen M from cod: Tryptic peptides of fragment TM1. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 52: 59-63.
 84. Elsayed S, Sornes S, Apold J, et al. The immunological reactivity of the three homologous repetitive tetrapeptides in the region 41-64 of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 1982; 16: 77.
 85. Elsayed S, Ragnarsson U, Netteland B. Solid-phase synthesis of the non-calcium-binding loop of cod allergen M: Direct evidence for the reactivity of the aminoterminal segment. *Scand J Immunol* 1983; 17: 291-5.
 86. Elsayed R, Ragnarsson U, Apold J, et al. Allergenic synthetic peptide corresponding to the second calcium-binding loop of allergen M. *Scand J Immunol* 1981; 14: 207-11.
 87. Daul CB, Slattery M, Reese G, et al. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen (Pen a I) as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994; 105: 49-55.
 88. Nagpal S, Metcalfe DD, Rao PV. Identification of a shrimp-derived allergen as tRNA. *J Immunol* 1987; 138: 4169-74.
 89. Burks AW, Williams LW, Helm R, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 172-9.
 90. Burk AW, Cockrell G, Stanley JS, et al. Recombinant peanut allergen Ara h 1, expression and IgE-binding in patients with peanut hypersensitivity. *J Clin Invest* 1995; 96: 1715-17.
 91. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm R. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara hII, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 962-9.
 92. Burks AW, Cockrell G, Connaughton C, et al. Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara h II. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 607.
 93. Ogawa T, Tsuji H, Bando N, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34-dKa oil-body-associated protein. *Biotechnology and Biochemistry* 1993; 57: 1020-6.
 94. Ogawa T, Bando H, Tsuji N, et al. A-Subunit of b-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1995; 59: 831.
 95. Moroz LA, Yang WH. Kunitz soybean trypsin inhibitor, a specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med* 1980; 302: 1126-8.
 96. González R, Polo F, Zaperto L, Caravaca F, Carreira J. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:748-55.
 97. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber L, Laimer M, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple *Malus domestica* and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 538-51.
 98. Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, et al. Identification of a Brazil nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med* 1996; 334: 688-92.
 99. Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, et al. Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kD tree pollen allergens. *Eur J Biochem* 1995; 233: 484-89.
 100. Monsave RI, González de la Peña MA, Menéndez Arias L, López Otín C, Villalba M, Rodríguez R. Characterization of a new oriental mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochem J* 1993; 293: 625-32.
 101. Sánchez Monge R, Gómez L, Barber D, López Otín C, Armentia A, Salcedo G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Fucosylated subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem J* 1992; 281: 401-5.

102. Izumi H, Adachi T, Fujii N, et al. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds. Homology of the deduced amino acid sequence with members of α -amylase/trypsin inhibitor family. FEBS Letters 1992; 302: 213-6.
103. Pascual CY, Crespo JF, Martín Esteban M. The relevance of cross reactivity in pediatric allergy. Clin Rev Allergy Immunol 1997; 15: 449-460.
104. Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. Int Arch Allergy Immunol 1998; 116: 83-92.
105. Musu T, Grégoire C, David B, Dandeu JP. The relationships between the biochemical properties of allergens and their immunogenicity. Clin Rev Allergy Immunol 1997; 15: 485-498.
106. Rodríguez R, Villalba M. Reacciones cruzadas entre alergenos: implicación de los carbohidratos. Rev Esp Alergol Immunol 1997; 12: 269-281.