

Utilidad de los péptidos 33 y 38 de *Lolium perenne* en la inmunoterapia de la rinitis polínica

Dres Krikor Mouchián, Julio F Albónico, Mariana Potenza, María L Bignone, Santiago R Rodríguez, Silvia G Irañeta

División Alergia, Hospital de Clínicas, UBA.

Resumen

Se aislaron y caracterizaron péptidos del polen de la gramínea *Lolium perenne* por métodos fisicoquímicos, se estudiaron sus propiedades bioquímicas e inmunológicas, tanto en el conejo como en humanos atópicos que sufrían de rinoconjuntivitis estacional producida por dicho polen, y se presentan los hallazgos inmunoserológicos luego de 3 años de inmunoterapia específica con los péptidos 33 y 38 obtenidos, que resultaron ser los más significativos en la composición fisicoquímica del polen.

Palabras claves. Polinosis, gramínea *Lolium perenne*, péptidos 33 y 38, inmunoterapia, anticuerpos específicos IgG.

Summary

Peptides isolated from the *Lolium perenne* pollen were submitted to several chemical and immunological procedures to establish their antigenicity. Immunotherapy with peptides 33 and 38 showed high potency to develop specific IgG blocking antibodies which correlated with statistical clinical improvement.

Key words. Pollinic rhinoconjunctivitis, *Lolium perenne*, peptides 33 and 38, immunotherapy, specific IgG blocking antibodies.

Introducción

Entre las enfermedades atópicas provocadas por alérgenos inhalatorios, la polinosis aparece histórica y clínicamente como un paradigma.^{29,83,89,96,104} Desde Dioscórides y Plinio (siglo I AC) se sostuvo que los plátanos ejercían algún daño sobre sus congéneres. En *Historiarum mundi* y *Discorsi nelli sei libri de Dioscóride*, (1562 y 1568) se leen descripciones de

ambos naturalistas. Durante 15 siglos se aceptó la existencia de la “fiebre de la rosa”. En 1565 Leonardo Botallo (Botallus, c 1519-1587) cirujano de Pavía, documentó los males originados por el aroma de la rosa, consistentes en cefalea, estornudos, comezón y rinohidrorrea (*Commentarioli duo alter de medici, alter de aegroti munere*. Lyon, p. 25, 1565). En 1607, el flamenco van Helmont citó el caso de un asma estacional de verano, destacando misma enfermedad en otros familiares del paciente (*Opera Omnii*. Nov. Francofurti, p. 346, 1607). Para entonces, 11 casos de “fiebre de la rosa” se habían descrito. Konrad V Schneider señaló que el catarro nasal era una exudación de la mucosa, y no una secreción del cerebro (*De catarrhorum et de speciebus catarrhorum*. Libri V, Wittebergae, 1662). En el siglo XVII, se documentaron catarros estacionales por el perfume de las rosas, según Joannes Nicolaus Benningerus (*Observationes et Curationum Medicuarium*. Centuriae V, Montisbeliard, 1673), Valeriano (1678), Samuel Ledelius (*Odor rosarum visui nocivus miscellanea curiosa*. Decurinae II, Norimbergae, 1684 y 1691) y Hunerwolff (1686). Jacob Constant de Rebecque (1645-1732), médico suizo que lo sufría, observó, en 1691, que el aroma de las rosas no era su verdadera causa, y afirmó: “creo más bien que las rosas emiten algo que irrita mi nariz sensible y, por la acción incesante, pero no advertida, de agujones, provoca una secreción del color del agua” (*Observationes rarissimae et curationes insignes*. Atrium medicinae Helvetiorum, Obs. 92, p. 150, de Tournes, Genf 1691). Viet Riedlin (1656-1724), médico alemán, hizo 2 aportes relacionados con el tema (*Linearum Medicarum anni Augustae Vindelicorum*. 1695 y *Ites medicum*. Augsburg, p. 25, 1702). Durante el siglo XVIII dominaron las descripciones casuísticas de esta “curiosa enfermedad”. El primer trabajo de Bostock en 1819 (*Case of a periodical affection of the eyes and chest*. *Medico-Chirurgical Transactions*, London, 10, p. 161, 1819), inició la etapa científica de la polinosis. John Bostock (1773-1846), médico

Correspondencia. Dr Krikor Mouchián
E-mail: alehclin@fmed.uba.ar

londinense, catedrático de las universidades de Liverpool y de Londres, fue un polínico de más de 30 años y llegó a describir con sutileza su padecer diferenciando los síntomas de una nueva enfermedad a la que llamó “catarro nasal periódico” o “*catarrhus aestivus*” (catarro estival de Bostock). Nueve años más tarde, refirió 28 casos de esta nueva enfermedad (*Of the catarrhus aestivus or summer catarrh*. Med. Chir. Transact., 14, p. 437, 1828), y le dio el nombre definitivo de “*hay fever*” o “fiebre del heno” y sugirió que la enfermedad se dividía en 4 variedades, según fuera la nariz, los ojos, las fauces o los pulmones; el órgano más afectado. Culpó al efluvio del heno, al calor y a la acción de los rayos solares; aunque en realidad no eran esas las causas. En 1828, John Mac Culloch sostuvo que la fiebre del heno era producida por los invernaderos y los campos de heno (*Essay on the Remittent and Intermittent Diseases*. London, 1, p. 394, 1828). W Gordon, en 1829, opinó que el asma no era por el heno, sino por la floración de la gramínea *Anthoxanthum odoratum* (grama de olor). Propuso la denominación “*grass asthma*” (asma de hierbas o de gramíneas) como más apropiada (*Observations on the Nature, Cause and Treatment of Hay Asthma*. London Med. Gaz., 4, p. 266, 1829). En 1831, John Elliotson (1791-1868), insinuó el papel del polen (*Hay Fever*. Lancet, II, p. 370, 1831. *Catarrhus aestivus or hay fever*. Lond. Med. Gaz., 12, p. 164, 1833). En EE.UU., GB Word describió la bronquitis de cada año en agosto (*Practice of Medicine*. Philadelphia, p. 753, 1849). Pero Swell fue el primero, según Koessler, que describió 2 tipos de fiebre del heno: la estival y la otoñal (*Diseases of the Chest*. New York, 1852). Luego, Phillipp Phoebus (1804-1880), en Alemania, (*Der typische Fühsummerkatarrh oder das sogenannte Heufieber, Heuasthma*. Rieker-Giessen, 1862) culpó a factores meteorológicos y al ozono. El neurólogo George Miller Beard (1839-1883), en EE.UU., publicó sus resultados (*Hay Fever or Summer Catarrh: Its Nature and Treatment*. Harper, New York, 1876) y formuló la “teoría neurótica”. La escuela de París consideró a la “diátesis artrítica” y otros a un origen microbiano como Hermann von Helmholtz (1821-1894), que apoyó Karl Binz (1832-1912), (*Virchow's Arch*, 46, 101, 1869). Fue el escocés Charles Harrison Blackley (1820-1900), quien sufrió esta enfermedad y recusó todas las teorías enunciadas y determinó que el polen era la verdadera causa (*Experimental Baillere, Tindall & Cox*, London, 1873). En 1872, Morrill Wyman, profesor de Harvard, demostró que los pólenes de la Ambrosia y de la Artemisa eran la causa de la variedad otoñal de la fiebre del heno, que documentó en su libro *Autumnal Catarrh (Hay Fever)* (New York, Ed. Hurd & Houghton, 1872). Esta “teoría del polen” fue objeto, durante los 30 años siguientes, de una controversia encarnizada. Finalmente, fue William

Philipps Dunbar (1863-1922), con su monografía en 1903 (*Zur Ursache und Spezifischen Heilung des Heufiebers*. Oldenbourg, Munich, 1903), junto con Carl Prausnitz, ambos polínicos, quienes con numerosas experiencias ratificaron los hallazgos de Blackley. En 1911, L Noon y J Freeman, por un lado, y Karl Koesler, por el otro, iniciaron tratamientos con extractos acuosos de polen mediante inyecciones subcutáneas.⁷³ Fue Warren T Vaughan quien acuñó el término “polinosis” para indicar aquellas afecciones alérgicas en las que el polen es el agente sensibilizante y desencadenante de la crisis.¹⁰³ En el siglo XX, autores como P Johnson, DG Marsh, R Patterson, AA Ansari, P Shenbagamurthi, LR Freidhoff, GA Stewart, KJ Turner, GP Cottam, AK Ekramodoullah, entre otros, han estudiado con énfasis este tema.^{3-5,11,28,29,31,33,37,38,47,53,54,68,93,96,102,103} Autores argentinos, como MR Castex, G Ruiz Moreno, LG Bouzat, A Barbará, RH Molfino, MA Solari, JA Bózzola, LR Parodi, JV Monticelli, L Bentolila, L Giscafí, JF Dumm y EJ Romero, se dedicaron a la descripción, clasificación y estudio de la distribución geográfica de la flora alergógena polínica del país desde 1933.^{20,26,43,64,65,70-72,82-86,89}

Materiales y métodos

1. Antígeno: El polen de *Lolium perenne* (Lp) es granuloso, esférico, psilado (superficie lisa), monoporado y con un opérculo prominente (Figura 1). Tiene entre 28 y 33 μ y poliniza, con picos durante octubre y noviembre. Una hectárea de Lp produce 100 kg de polen por día.

Figura 1. Fotomicrografía por inmersión de polen Lp, x 1.000. Se observa su opérculo prominente.



El extracto de Lp se preparó en nuestro laboratorio con materia prima provista por Hollister-Stier (Spokane, EE.UU.), lote N° 801.554, empleando los métodos de Frugoni-Hansen-Cruciani. Se extrajo en *buffer* salino fosfato (PBS) por agitación a 4° C, dializó en PBS y se esterilizó con filtros *Millipore* de 0,22 μ .³⁹ Su concentración fue de 12 mg/ml.

2. Animales de experimentación: Se utilizaron conejos albinos adultos que fueron inmunizados con el extracto de Lp mediante la inyección semanal de habones intradérmicos de 0,20 ml, en el dorso rasurado, de una emulsión compuesta por 0,5 ml de Lp más 0,5 ml de adyuvante de Freund completo durante 2 meses y medio. Diez días después de la última inyección fueron sangrados "a blanco" por punción cardíaca y los sueros obtenidos se conservaron a -20° C.
3. Pacientes: Se estudiaron 30 pacientes ambulatorios, 13 varones y 17 mujeres, con edades comprendidas entre los 18 y 73 años, residentes en la CABA y el Gran Buenos Aires, que reunieron los siguientes *criterios de inclusión*: 1) tener más de 18 años de edad y pertenecer a cualquier sexo o raza; 2) tener por lo menos 2 años de antecedentes de síntomas de alergia durante la primavera; 3) tener una prueba cutánea positiva con Lp y una IgE sérica total (> 120 KU/L); 4) tener antecedentes heredo-familiares de atopía, vírgenes de estudio y de inmunoterapia (IT) específica; y 5) otorgar el consentimiento informado por escrito para los requerimientos del estudio. Fueron *criterios de exclusión* aquellos pacientes que estaban recibiendo antihistamínicos, corticosteroides, inmunodepresores e IT específica con alérgenos. Se incorporaron 25 pacientes en calidad de *grupo control* mediante una selección entre los internados del Departamento de Medicina Interna que no tenían antecedentes familiares ni personales de enfermedad alérgica; no estaban bajo tratamiento con antihistamínicos, corticoides ni inmunodepresores; poseían una IgE sérica total < 50 KU/L y no presentaban reactividad cutánea al Lp.
3. Cromatografía con Sephadex G-50: El extracto de Lp fue pasado por una columna de 480 mm por 10 mm. Se procesaron 1,5 ml de Lp y se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml en los eluidos. Sus proteínas se determinaron a 280 nm de DO en un espectrofotómetro Metrolab. Las hexosas se determinaron por el método del Indol y se leyeron a 470 nm de DO.^{22,30}
4. Cromatografía con DEAE-celulosa: Dos mililitros del extracto de Lp fueron pasados por una columna de 380 mm por 25 mm a lo largo de 400 tubos. La elución se hizo con cambios de la molaridad (de 0,01 M a 0,5 M) y del pH (de 8 a 6) del *buffer*-fosfato. Las proteínas y hexosas fueron determinadas, con igual procedimiento.^{30,69}
5. Determinación cuantitativa de proteínas y de hexosas: Los métodos de Bradford y del Indol se aplicaron a las fracciones solubles de Lp.^{21,63}
6. Pesos moleculares: El extracto de Lp, en una concentración de 12 mg/ml, fue sometido a una columna de Sephadex G-50 y las alícuotas obtenidas se compararon con marcadores proteicos estandarizados (*Sigma Chemical Co.*).⁶¹
7. Técnicas inmunológicas: El extracto de Lp y sus fracciones fueron testificados contra el suero anti-Lp de conejo por los métodos de Ouchterlony, de Boyden y de la inmunolectroforesis (IEF) convencional para valorar su antigenicidad en los animales y las propiedades de los anticuerpos obtenidos. Idénticos procedimientos se aplicaron a los sueros humanos de ambos grupos de pacientes.^{19,66,74}
8. SDS-PAGE y Electroforesis Bi-dimensional: Para estas técnicas se preparó un extracto seco siguiendo el método de Raftery, con 400 mg de polen seco en 4 ml de solución salina (0,85% p/v NaOH, pH 7,5).^{50,78}
 - 8.1 Electroforesis en una dimensión: El extracto preparado se sometió a una electroforesis en gel de 15% de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Se sembraron 10 mcl que luego de la corrida se visualizó con el colorante azul de Coomassie R-250.
 - 8.2 Electroforesis en 2 dimensiones: El extracto de Lp fue concentrado y desalado y disuelto en un volumen igual de *buffer* de siembra. Se realizó en un Mini-Protean 2-D Cell y Mini-Protean II *Tube Module* (*Bio-Rad Laboratories*, EE.UU.). Para realizar la corrida de la segunda dimensión, los geles se colocaron perpendicularmente en el extremo superior de un gel 15% de acrilamida SDS-PAGE convencional y sometidos a electroforesis.^{59,60,67}
9. Inmunotransferencia: Las proteínas obtenidas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, según lo descrito por Towbin. Luego se incubaron con una dilución 1/100 del suero de conejo anti-Lp, por un lado, y con una dilución 1/10 del *pool* de sueros de pacientes hipersensibles a Lp por el otro, dejándose toda la noche a 4° C.^{62,95} Las primeras se incubaron con una IgG de cabra anti-conejo (1/2000) absorbida con fosfatasa alcalina durante 90 minutos a temperatura ambiente, mientras que las segundas se incubaron con una anti-IgE humana hecha en cabra (1/1000) durante el mismo tiempo y condiciones, pero absorbida a la peroxidasa. Se usaron como controles negativos sueros de pacientes no atópicos y de conejos normales. El revelado del color se realizó con 4-cloro-1-naphtol y peróxido de hidrógeno en una solución PBS/metanol.

10. Métodos radioinmunológicos: A cada paciente se le extrajeron 20 ml de sangre venosa, antes y 3 años después de IT con Lp, para determinar los valores de la IgE sérica total por el método del PRIST y de las IgE e IgG séricas mono-específicas por el método del RAST. La IgE total y la IgG anti-Lp fueron expresadas en KU/L, mientras que la IgE anti-Lp y anti-fracciones lo fue en *Phadebas-RAST-Units* (PRU/ml) de acuerdo a su fabricante (*Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Suecia*). El RAST anti-Lp y anti-fracciones de Lp fue preparado mediante la unión covalente -a pH 11- de discos de celulosa (Whatman N° 1) con bromuro de cianógeno y los respectivos antígenos.^{1,6,24,29,44,51,55,81}
11. Pruebas cutáneas: El Lp (1/100) y sus 14 fracciones fueron esterilizados a través de filtros Millipore de 0,22 μ . Cada paciente recibió, en la cara externa del brazo previamente higienizado, un total de 19 inyecciones intradérmicas de 0,02 ml cada una, con los controles de solución fisiológica estéril, histamina (1/1000 = 10 γ /ml) y *buffer* fosfato (pH 7). Se leyó a los 20 minutos cuando el control positivo de histamina alcanzó su máximo tamaño de eritema-pápula, y se

realizaron por el mismo profesional en horas de la mañana.^{27,79,80} Todo el material utilizado fue descartable.

Resultados

1. Cromatografía de Lp por Sephadex G-50: Se obtuvieron 3 picos proteicos en los tubos N° 13, 28 y 33; y 3 picos de hexosas en los tubos N° 2, 8 y 16.
 2. Cromatografía de Lp por DEAE-celulosa: Se lograron 4 picos proteicos en los tubos N° 25, 38, 55 y 359; y 7 picos de hexosas en los tubos N° 30, 56, 93, 192, 215, 281 y 360. (Figuras 2 y 3).
- 3.1 Determinación cuantitativa de proteínas: Mientras Lp poseía 12.000 mcg/ml, las fracciones 33 y 38, exhibían 2.500 y 4.500 mcg/ml, respectivamente, siendo pequeñas las cantidades de las otras fracciones.
- 3.2 Determinación cuantitativa de hexosas: Las fracciones 16 de Sephadex y 192 de DEAE celulosa revelaron los más altos contenidos (120 mg% y 150 mg% respectivamente) mientras que las demás fracciones exhibieron menor cantidad de hexosas.

Figura 2. Cromatografía de Lp por una columna de DEAE-celulosa. Se observan 4 picos proteicos, en los tubos 25, 38, 55 y 359, por absorbancia a 280 nm de DO. Se indican los cambios de la molaridad y del pH del *buffer* de fosfato.

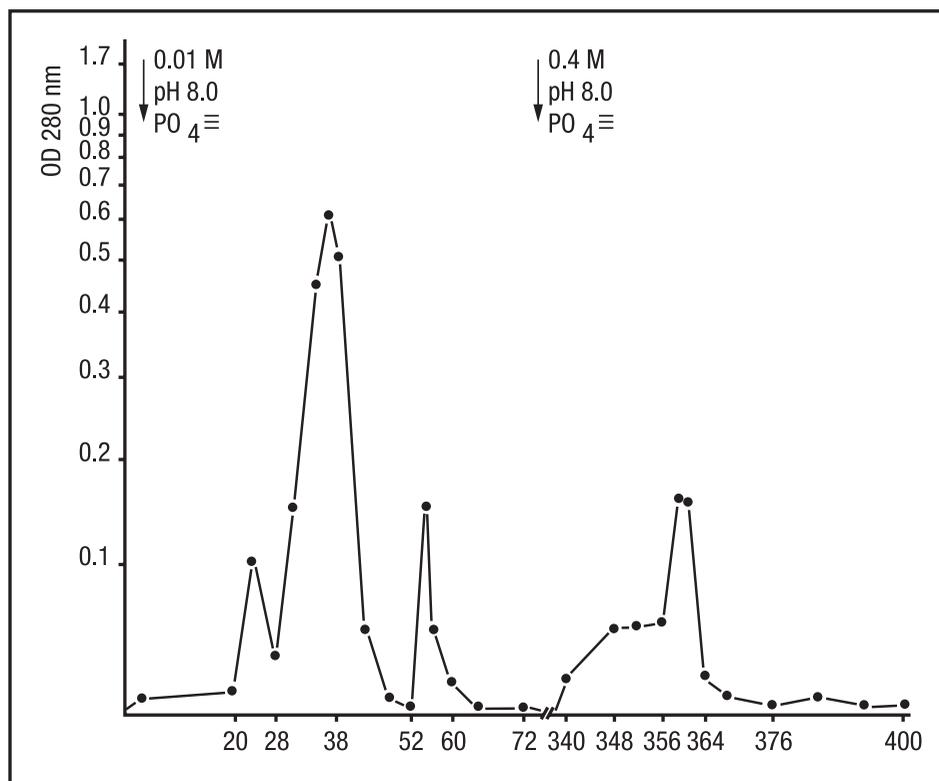
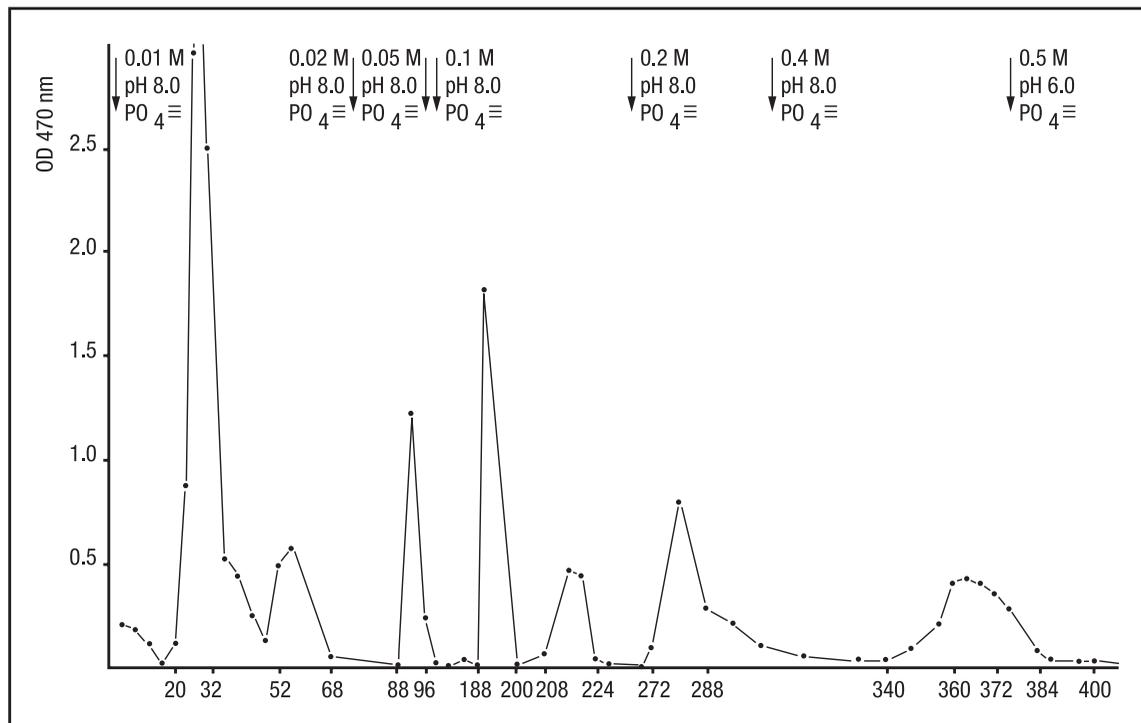
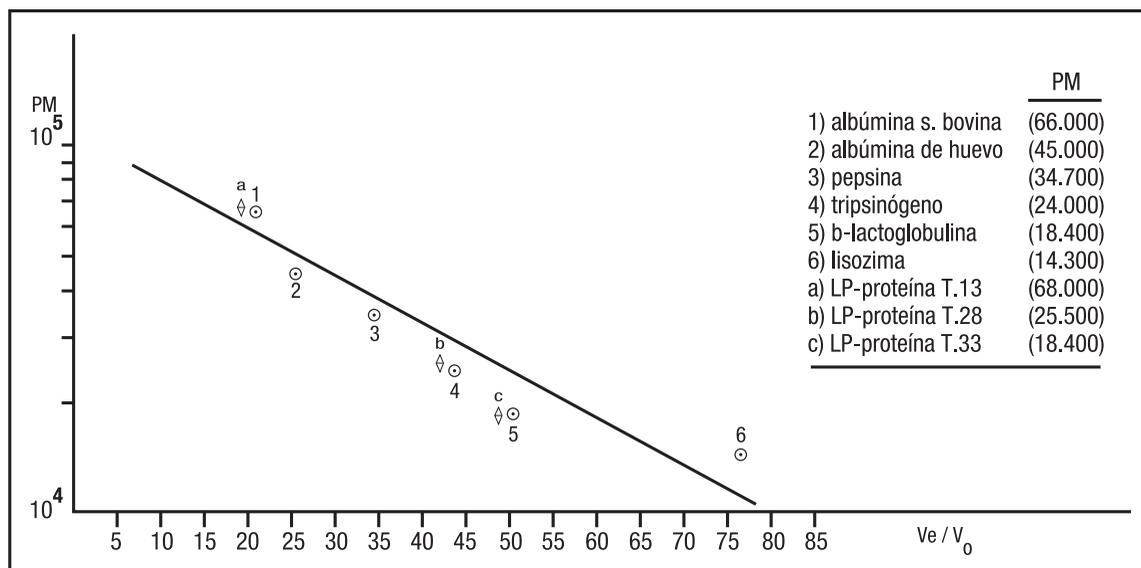


Figura 3. Cromatografía de Lp por una columna de DEAE-celulosa. Se observan 7 picos de hexosas en los tubos 30, 56, 93, 192, 215, 281 y 360; por absorbancia a 470 nm de DO. Se indican los cambios de la molaridad y del pH del buffer de fosfato.



4. Pesos moleculares: Se registraron los 6 picos de los marcadores proteicos. Luego de las inmunodifusiones entre el sistema Albúmina Sérica Bovina/anti-Albúmina Sérica Bovina, y el sistema anti-*Lolium perenne* de conejo/fracciones 13, 28 y 33; los valores extrapolados fueron de 68 kDa (tubo 13), 25,5 kDa (tubo 28) y 18 kDa (tubo 33) (Figura 4).

Figura 4. Representación semilogarítmica de los pesos moleculares de los marcadores proteicos y de las proteínas obtenidas por Sephadex con Lp. En ordenadas y en abscisas se observan los pesos moleculares y los volúmenes de elución sobre el volumen muerto.



5. Técnicas inmunológicas: El Ouchterlony reveló varias bandas de precipitación entre el anti-Lp de conejo con el Lp, la fracción 38 y las fracciones 33 y 55. Resultados negativos se obtuvieron con los sueros humanos. El Boyden fue positivo con el anti-Lp de conejo (1/256) y el Lp, siendo negativo con los sueros humanos. La inmunoelectroforesis produjo varias bandas de precipitación para el Lp contra el suero de conejo, no así los sueros humanos. La electroforesis uni-dimensional de SDS-PAGE al 15% mostró bandas proteicas entre los 19 y 97 kDa. La electroforesis bi-dimensional mostró 5 manchas o spots con diferentes pesos moleculares (48,6 kDa, 31,5 kDa y 21,8 kDa). Podrían existir isoformas de la misma proteína con un pI entre 9 y 10. La inmunotransferencia del suero de conejo anti-Lp revelado con una anti-IgG de cabra detectó la presencia de bandas inmunorreactivas entre los 28 y 97 kDa; las más importantes se situaron entre los 37 y 40 kDa y entre los 45 y 60 kDa; otras, de menor significación, lo hicieron entre los 90 y 95 kDa. Con los sueros humanos revelados con una anti-IgE de cabra se vieron bandas inmunorreactivas entre los 29 y 97 kDa; las más significativas entre los 37 y 40 kDa y entre los 45 y 60 kDa; otras, de menor significación, se situaron entre los 90 y 95 kDa (Figuras 5, 6 y 7).

Figura 5. Electroforesis uni-dimensional (SDS-PAGE). Se observan bandas entre los 19 y 97 kDa; (MPM) son marcadores de pesos moleculares.

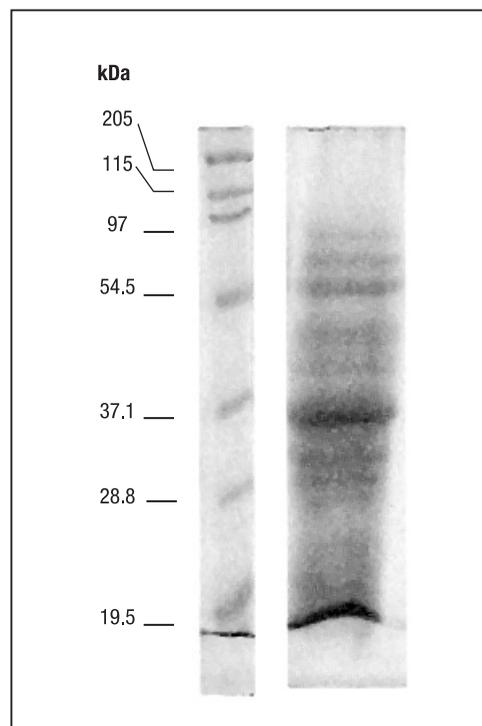


Figura 6. Electroforesis bi-dimensional. Se observan 5 manchas o spots (flechas) con puntos isoeléctricos (pI) entre 3 y 9 ó 10; sus pesos moleculares se ubicaron entre los 48,6 y 21,8 kDa.

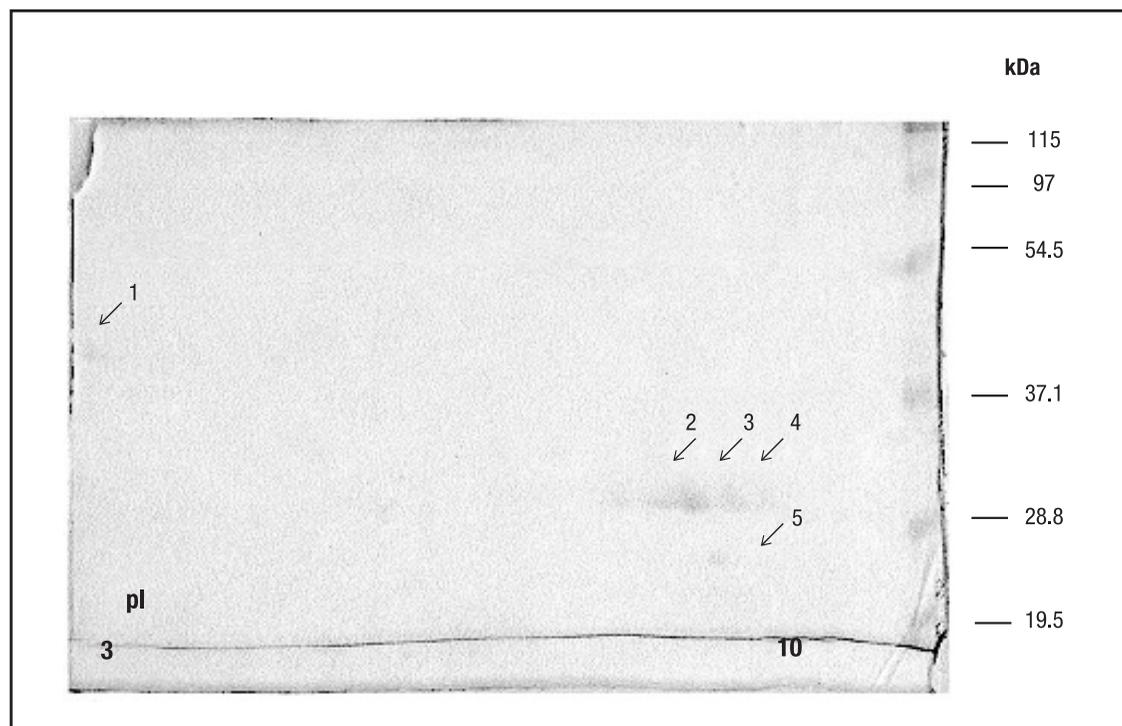
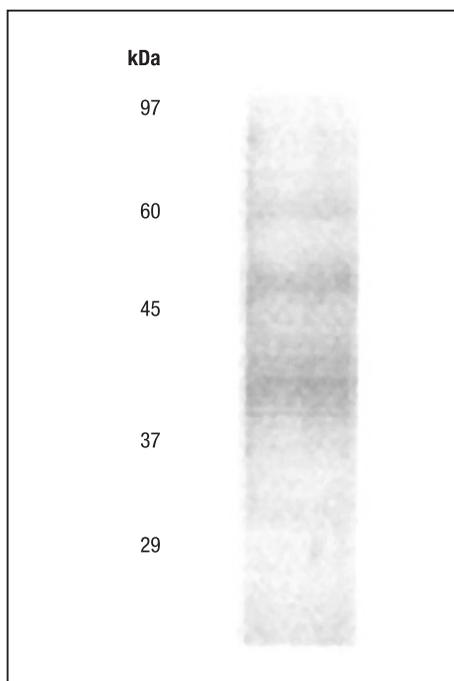


Figura 7. Inmunotransferencia de suero humano anti-Lp. Se observan bandas ubicadas entre los 37 y 40 kDa y los 45 y 60 kDa de peso molecular.



6. Métodos radioinmunológicos: Los pacientes del grupo control tenían una IgE sérica total entre 13 y 68 KU/L, mientras que los atópicos poseían entre 90 y 1.250 KU/L, con un promedio de 472 KU/L. La IgE anti-Lp arrojó valores de clase 0 para todos los controles, siendo para los atópicos de clase 0 en 11 pacientes, de clase 1 en 11 pacientes y de clase 2 en 8 pacientes. Ésta reveló valores que fueron significativos para las fracciones S-P 33, D-P 38, D-H 56 y D-H 192. La IgG anti-Lp en los pacientes atópicos mostró un valor promedio de 391,4 KU/L. Los del grupo control no superaron las 50 KU/L.
7. Pruebas cutáneas: Mientras que los controles resultaron negativos para todos los péptidos empleados, los polínicos presentaron reacciones de eritema-pápula mayor de 5 mm con Lp 1/100, la SP-33 y la DE-38 y las hexosas 56, 192 y 360.
8. Inmunoterapia específica (IT): Los pacientes atópicos fueron divididos en 3 grupos de 10 sujetos cada uno: el **grupo A**, que recibió el extracto de Lp; el **grupo B**, que fue inyectado sólo con el péptido SP-33; y el **grupo C**, que se inoculó con el péptido DE-38, en iguales concentraciones de proteínas y, semanalmente, por un lapso de 3 años.

Al cabo de ellos, las valoraciones estadísticas mostraron que en el **grupo A** el descenso sérico de la IgE anti-Lp tuvo una $P \leq 0,05$ mientras que el ascenso de la IgG-anti-Lp sólo llegó a una $P = 0,10$.

En el **grupo B**, el descenso de las IgE-anti-Lp y anti-SP-33 tuvo una $P \leq 0,01$ mientras que tan sólo el ascenso de la IgG-anti-SP-33 mostró una $P \leq 0,05$.

Por fin, en el **grupo C**, el descenso de la IgE-anti-DE-38, así como, el ascenso de la IgG-anti-DE-38 exhibieron una $P \leq 0,05$, mientras que, si bien los valores de la IgE e IgG contra el Lp y sus péptidos 33 y 38 mostraron cambios en descenso y ascenso, los valores matemáticos no llegaron a conformar una significación estadística (todos ellos con una $P = 0,10$).

Discusión

La polinosis es una entidad clínica indiscutible y su IT específica es una de las más gratificantes para el especializado. Siempre resultó un acicate para los investigadores el estudio de la composición química de los pólenes para conocer su capacidad de sensibilización, al igual que la de inducir anticuerpos protectores y tolerancia inmunológica. Entre los argentinos contemporáneos se destaca el Prof Titular Dr EA Romero, de la UNLP, quien realizó estudios sobre palinología estableciendo un mapa fitogeográfico, resaltando la frecuencia de las familias de los pólenes en nuestro país, y en particular de las gramíneas, por ser éstas muy abundantes y agresivas clínicamente.^{64,65,82} Armentia (2002), demostró que los contenidos proteicos y la alergenicidad de Lp eran mayores en las áreas urbanas que en las rurales, posiblemente por las fumigaciones con pesticidas que las dañarían. El SDS-PAGE mostró la ausencia de bandas inmunoreactivas en las muestras rurales, especialmente del Lp V.⁷ Grote (2001), con microscopía de transmisión electrónica y de escaneo, vio que los granos de polen expulsaban el citoplasma al contactar con una superficie húmeda o en el agua, lo cual sería la causa de la difusión de los alérgenos en la mucosa nasal, e iniciar la sensibilización, y respuesta inflamatoria específica por IgE y LI-CD4-Th2 con el receptor específico, para la glucoproteína anti-génica.^{45,51,53,54}

En nuestro aporte, la cromatografía por Sephadex G-50 detectó 3 proteínas (tubos 13, 28 y 33) y 3 hexosas (tubos 2, 8 y 16), mientras que el pasaje por DEAE-celulosa obtuvo 4 picos proteicos (tubos 25, 38, 55 y 359) y de 7 picos de hexosas (tubos 30, 56, 93, 192, 215, 281 y 360). Los PM fueron de 68, 25,5 y 18,4 kDa, para los péptidos obtenidos por Sephadex. En el siglo XX, se caracterizaron antígenos lla-

mados Lp I, Lp II, Lp III, Lp IV, Lp V (o Lp IX), Lp X (o citocromo c), y luego, la profilina, con homología con antígenos de frutas y verduras.^{90,92,99} El Lp XI (van Ree, 1995), se relaciona con los pólenes del maíz y del olivo, y tiene un residuo hidrocarbonado que se une específicamente a la IgE a diferencia de los otros antígenos de Lp. Lp XI es una glicoproteína con un sitio N-glicosilado que se revela mediante el estudio de los monosacáridos. Estos hallazgos son compatibles con nuestras hexosas –ratificando la composición glicoproteica del antígeno crudo- y de la reactividad de algunas de ellas en las pruebas cutáneas y en los tests radioinmunológicos (IgE-RAST-específica).¹⁰⁰ Petersen (2001) analizó la variabilidad estructural de los alérgenos de las gramíneas que él llamó “grupo 13”, que es universal a la familia, y que a pH neutro poseen 50 a 60 kDa, y un pI de 6 a 7,5. Sería una poligalacturonidasa responsable del asma bronquial humana. Si este compuesto se somete, como lo hicimos nosotros, a la filtración cromatográfica, muchos de los componentes del grupo 13 se degradan y su detección se torna dificultosa.⁷⁷ Van Ree (1998), demostró que con Lp I y Lp V se podía diagnosticar la IgE del 90% de los sueros atópicos estudiados. Empleó, en dicho estudio, 17 especies de gramíneas diferentes, y, con cualquiera de ellas, obtuvo resultados positivos. Al emplear antígenos recombinantes obtenidos en *Escherichia coli* no logró iguales resultados resaltando, como lo preconizamos nosotros, la importancia del alérgeno natural y su mayor capacidad para unirse a la IgE específica.^{12,34,52,76,101} Otros autores, en *Cynodon dactylon*, detectaron que ésta no poseía el epítipo carboxilo-terminal de Lp I, en su conformación espacial diferente de dicho alérgeno con respecto a Lp I y que disminuía la reactividad con la IgE específica.⁸⁸ En el RCT de los LTCD4-Th2 de los atópicos se han identificado 2 determinantes antigénicos como lo son el Lp IX (o V) en la secuencia 105-116 y en 193-204 de sus aminoácidos con tirosina en la posición 3, y treonina y serina en la posición 8 que se relacionan con el CMH de clase II activando el LTCD4-Th2.¹³ Würtzen (1998), encontró más reactividad del Lp V en la respuesta T que con la IgE específica y la reactividad cutánea.^{94,107} La superposición de los picos obtenidos por nosotros, tanto por Sephadex como por DEAE-celulosa, refuerzan el hecho de que las gramíneas posean múltiples reacciones cruzadas entre los integrantes de la familia. Gagnon (1993), demostró que el Lp I inducía la producción de IL-4 y de IFN- γ por monocitos de la sangre periférica, tanto en atópicos como en no atópicos, durante y fuera de la época de polinización. Estos hallazgos sugieren que la exposición natural a las gramíneas influyen el balance entre los LTCD4-Th2 y Th1 con exacerbación de los primeros durante la polinización,

con incremento de la síntesis de IL-4 y de la IgE específica.^{40,90} Boutin y Hebert (1995), demostraron que los anticuerpos antiidiotípicos ejercerían una supresión sobre la síntesis de la IgE específica. Con componentes químicos simples de bajo peso molecular (haptenos), más que con proteínas complejas como las alergénicas, se logró un anticuerpo antiidiotipo (290A167) que suprimía la respuesta específica al Lp I.^{17,18,97} El Lp I es capaz de generar anticuerpos específicos IgG e IgE en un modelo murino de ratones con inmunodeficiencia (SCID mice), con lo cual los autores señalan que este modelo podría ser útil para estudiar la síntesis de esos anticuerpos en los humanos ante los alérgenos polínicos.⁴¹ La reactividad cruzada entre las gramíneas se estudió con anticuerpos monoclonales contra epítipes significativos y repetitivos. La presencia de 2 residuos de hidroxiprolina y de carbohidratos N- terminales podría ser una estructura común a todas las gramíneas.^{50,87} La producción de anticuerpos IgG en los conejos, con bandas de precipitación en agar y con hemaglutinación pasiva positivas contra el mismo y contra los péptidos N° 33, 38 y 55 se constituyó en un estímulo para estudiar el comportamiento inmunológico de dichas fracciones en los humanos. Marsh (1977), estableció una asociación entre el HLA y el Lp a nivel del HLA-B8 en correlación inversa con los niveles séricos de la IgE sérica total, y Freidhoff (1988), lo hizo entre HLA-DR3 y la respuesta inmune a Lp I y Lp III en humanos.^{37,38,57} García (1992), señaló que mientras que los polínicos no tratados con IT poseían altos niveles de IgG4 sérica, al recibir IT por 2 años cambiaba el isotipo a IgG1, siempre específicas.^{36,42,48} Jean Bousquet (1991), publicó el aumento de la IgG específica con IT y la mejoría de los riniticos (OMS - Informe Técnico del 29 de enero de 1997).¹⁵

Los péptidos de 32-34 kDa (Marsh) inducen IgG, mientras que los de bajo peso (Lahoz) sintetizan IgD anti-Lp con actividad “bloqueadora” y no una IgG.^{23,53,54} En nuestros pacientes, tanto Lp como SP-33 y DE-38 indujeron al cabo de 3 años, un descenso de las IgE específicas y el ascenso de las IgG específicas.^{35,44} Larsen (1995), señaló el valor de los isoalérgenos obtenidos por la electroforesis bidimensional donde 2 isoalérgenos, al diferir en un solo aminoácido, pueden provocar cambios topográficos e inducir otra afinidad por los anticuerpos específicos.⁶⁰ Nuestras pruebas cutáneas fueron muy positivas con las fracciones proteicas N° 33 (Sephadex) y N° 38 (DEAE-celulosa) y con las hexosas N° 56, 192 y 360 (DEAE-celulosa), debido a una IgE o una IgG-ST (*short-term*) o IgG₄ cutáneas (tipo I de Gell y Coombs).⁷⁹ Los LT-reg (CD25-foxP3+) y los LT supresores, por la IT, producirían un descenso de la IgE anti-Lp. El Lp V, similar a nuestras fracciones glicoproteicas posee un epítipo (aminoácidos

105-116) que se une al R_cT-CMH-clase II.^{25,106,14,56} La IL-17 E (IL-25) es una citoquina inductora de la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 que a su vez intensifican la actividad de los LTCD4-Th2. Las células dendríticas (CD) podrían destacarse en el fenómeno atópico. Las CD1 elaboran IL-12 → Th1, y las CD2 → Th2. La existencia de CD-reg → IL-10 → LT-reg abre toda una nueva línea de investigación, tanto en las enfermedades atópicas como en las autoinmunes.⁵⁸ Las profilinas de 12-15 kDa actúan a través de otros 2 ligandos: los polifosfoinositoles y la G-actina o actina globular y es un pan-alérgeno con interesantes vías de investigación sobre la biología de los pólenes y su interacción con los seres humanos.^{8-10,98,105}

Bibliografía

- Alonso A, Scavini LM, Pionetti CH, Mouchian K y Rodríguez S. "Immunochemical properties of soluble fractions of *Candida Albicans*". *Medicina – Buenos Aires* 1981;41:579.
- American Thoracic Society. "Definition and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema". *Am. Rev. Resp. Dis.* 1962;85:762.
- Ansari AA, Freidhoff LR, Meyers DA, Bias WB y Marsh DG. "Human immune responsiveness to *Lolium perenne* pollen allergen Lol p III (rye III) is associated with HLA-DR3 and DR5". *Human Immunol.* 1989;25:59.
- Ansari AA, Killoran EA y Marsh DG. "An investigation of human immune response to perennial rye-grass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p X)". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987;80:229.
- Ansari AA, Shenbagamurthi P y Marsh DG. "Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II". *J. Biol. Chem.* 1989;264:11181.
- Arbesman CE, Wypych JJ y Reisman RE. "Evaluation of RAST inhibition as a method for standardization of ragweed pollen extracts". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1977;53:310.
- Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Barber D, Martín Gil FJ, Martín Santos JM, Vega JM y Arranz ML. "Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen?". *Allergol. et Immunopathol.* 2002;30:218.
- Asturias JA, Arilla MC, Gómez Bayón N, Aguirre M, Martínez A, Palacios R y Martínez J. "Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen". *Mol. Immunol.* 1998;35:469.
- Asturias JA, Arilla MC, Gómez Bayón N, Martínez J, Martínez A y Palacios R. "Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* pollen profilin in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen". *Clin. Exp. Allergy* 1997;27:1307.
- Asturias JA, Arilla MC, Gómez Bayón N, Martínez J, Martínez A y Palacios R. "Recombinant DNA technology in allergology: cloning and expression of plant profilins". *Allergol. et Immunopathol.* 1997;25:127.
- Aznárez EP. "Históricos senderos de la Alergia". *La Semana Méd.* 1974;18:533.
- Baldo B. "Structural features of allergens large and small with emphasis on recombinant allergens". *Curr. Opin. Immunol.* 1991;3:841.
- Blaher B, Suphioglu C, Knox B, Singh B, McCluskey J y Rolland J. "Identification of T-cell epitopes of Lol p 9, a major allergen of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;98:124.
- Bluestone JA y Abbas AK. "Natural versus adaptive regulatory T cells". *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:253.
- Bousquet J, Becker W y Hejjaoui A. "Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991;88:43.
- Bousquet J, Guerin B, Hewitt B y Michel FB. "Analysis of commercial pollen extracts by enzyme determination. I.- Comparison of RAST-inhibition assay and enzyme titration for orchard grass, rye grass and short ragweed pollen extracts". *Ann. Allergy* 1980;44:310.
- Boutin Y y Hebert J. "Suppression of immune response to Lol p I by administration of idio-type". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;95:751.
- Boutin Y, Jobin M y Hebert J. "Pretreatment with idio-type suppressed immune response against Lol p I in mice". *J. Allergy Clin. Immunol. (Abstract)* 1992;89:321.
- Boyden SV. "The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera". *J. Exp. Med.* 1951;93:107.
- Bózzola JA. "Alergia polínica". Tesis de Doctorado. Biblioteca de la Facultad de Medicina, Buenos Aires, 1940.
- Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 1976;72:248.
- Brieva A y Rubio N. "Rapid purification of the main allergen of *Lolium perenne* by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* 1986;37:165.
- Bringel H, Vela C, Ureña V, Gurbindo D, García R y Lahoz C. "IgD antibodies: In vitro blocking activity of IgE mediated reactions". *Clin. Allergy* 1982;12:37.
- Brostoff J. "Complexed IgE in atopy". *The Lancet* 1977;2:74.
- Burton MD, Blaher B y Suphioglu C. "T-cell receptor contact and MHC binding residues of a major rye grass pollen allergen T-cell epitope". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999;103:255.
- Castilla C. "Enfermedades alérgicas (asma, rinitis, polinosis)". *Rev. Méd. Latinoam.* 1935;XX:1204.
- Cavallo A, Sanz ML, Subirá ML y Oehling A. "Correlation between the intracutaneous test and other immunological techniques in pollinosis". *Allergol. et Immunopathol.* 1983;11:79.

28. Cottam GP, Moran MD y Standring R. "Physicochemical and immunochemical characterization of allergenic proteins from rye grass (*Lolium perenne*) pollen prepared by a rapid and efficient purification method". *Biochem. J.* 1986;234:305.
29. Cruciani JA. "Asma y Síndromes Alérgicos". Ed. El Ateneo, 1941.
30. Dische Z. "In Methods of Biochemical Analysis". Ed. Glick D, 1958;2:200.
31. Ekramoddullah AK, Kisil FT y Sehon AH. "Partial characterization of an antigenic site of high molecular weight basic antigen, a ryegrass pollen allergen, using a monoclonal antibody". *Mol. Immunol.* 1986;23:111.
32. Enders G y Kunkel G. "Risk-factors for the development of pollinosis and extrinsic asthma". In: *New trends in allergy*. Ed. Ring J. y Burg G. New York, Springer-Verlag, 1981.
33. Feinberg SN. "La Alergia en la Práctica General". Ed. Espasa Calpe, 1941.
34. Fisher S, Groe M y Fahlbusch B. "Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;98:189.
35. Fortner BR, Dantzer BS, Tipton WR y Nelson HS. "The effect of weekly versus monthly ragweed allergen injections on immunological parameters". *Ann. Allergy* 1981;3:147.
36. Foucard T y Johansson SGO. "Allergen-specific IgE and IgG antibodies in pollen-allergic children given immunotherapy for 2-6 years". *Clin. Allergy* 1978;8:249.
37. Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Meyers DA y Marsh DG. "A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (Rye I and Rye II). II.- Longitudinal variation of antibody levels in relation of symptomatology and pollen exposure and correction of seasonally elevated antibody levels to basal values". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987;80:646.
38. Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Meyers DA, Ansari AA, Bias WB y Marsh DG. "Association of HLA-DR3 with human immune response to Lol p I and Lol p II allergens in allergic subjects". *Tissue Antigens* 1988;31:211.
39. Frugoni C. "Alergia Clínica" de Hansen K y Werner M. Ed. Salvat 1970:586.
40. Gagnon R, Akoum A y Hebert J. "Lol p I induced IL-4 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells of atopic and nonatopic subjects during and out of the pollen season". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993;91:950.
41. Gagnon R, Boutin Y y Hebert J. "Lol p I-specific IgE and IgG synthesis by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects in SCID mice". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;95:1268.
42. García BE, Sanz ML, Diéguez I, de la Marinas MD y Oehling A. "Specific IgG subclasses in pollinosis". *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1992;2:300.
43. Giscafré L y Schiel E. "Importancia de los hongos en la etiología de las enfermedades alérgicas en la ciudad de Santa Fe". *Prensa Méd. Argent.* 1943;25:1143.
44. Gleich GJ, Jacob GL, Yunginger JW y Henderson LL. "Measurement of the absolute levels of IgE antibodies in patients with ragweed hay fever". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1977;3:188.
45. Grote M y Vrtala S. "Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy". *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;108:109.
46. Hansen K y Werner M. "Alergia Clínica". Ed. Salvat - 1970.
47. Herraiz Ballester L. "Polen y polvo atmosférico en la Capital Federal". *Semana Méd.* 1944;51:272.
48. Hendrix SG, Patterson R, Zeiss CR y Suszko IM. "The immune response in humans and rabbits to monomeric and polymeric grass allergens". *J. Clin. Immunol.* 1982;2:10.
49. Hill DJ, Smart IJ y Hosking CS. "Specific cellular and humoral immunity in children with grass pollen asthma". *Clin. Allergy* 1982;12:83.
50. Hiller KM, Esch RE y Klapper DG. "Mapping of an allergenically important determinant of grass group I allergens". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;100:335.
51. Ishizaka K, Ishizaka T y Hornbrook MM. "Physicochemical properties of human reaginic antibodies. IV.- Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity". *J. Immunol.* 1966;97:75.
52. Jäger L, Fahlbusch B, Müller WD, Diener C, Schlenvoigt G y Wahl R. "Group IV and V allergens in grass pollen". *J. Allergy Clin. Immunol. (Abstract)* 1992;89:152.
53. Johnson P y Marsh DG. "Allergens from common rye grass pollen (*Lolium perenne*). I.- Chemical composition and structure". *Immunochemistry*, Pergamon Press, 1966;3:91.
54. Johnson P y Marsh DG. "Allergens from common rye grass pollen (*Lolium perenne*). II.- The allergenic determinants and carbohydrate moiety". *Immunochemistry*, Pergamon Press 1966;3:101.
55. Jones JF y Lindberg R. "Specific serum factors mediate responses to pollen". In: *New York Trends in Allergy*. New York, Springer-Verlag, 1981.
56. Kocur E, Zeman K y Tchorzewski H. "The effect of granulocyte factor and grass pollen allergen on T-lymphocytes from atopic patients in vitro". *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1993;3:321.
57. Ku Huang S y Marsh DG. "Genetics of allergy". *Ann. Allergy* 1993;70:347.
58. Kumar M y Behera A. "IFN- γ and IL-12 plasmid DNAs as vaccine adjuvant in a murine model of grass allergy". *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;108:402.
59. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 1970;227:680.
60. Larsen JN. "Isoallergens-significance in allergen exposure and response". *ACI News* 1995;7:141.
61. Leach AA y O'Shea PC. The determination of protein molecular weights of up to 225.000 by gel filtration on a simple column of Sephadex G-200 at 25° and 4°C". *J. Chromatogr.* 1965;17:245.
62. Lidd D y Connell JT. "Specific binding of an Il31-labeled ragweed pollen fraction by sera of untreated ragweed-sensitive humans". *J. Allergy* 1964;35:289.

63. Lowry GH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 1951;193:265.
64. Majas FD y Romero EJ. "Aeropalynological research in the Northeast of Buenos Aires Province, Argentine". *Grana* 1992;31:143.
65. Majas FD, Noetinger M y Romero EJ. "Airborne pollen and spores monitoring in Buenos Aires City". *Aerobiología* 1992;8:285.
66. Mancini G, Carbonara A y Heremans J. "Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion". *Immunochemistry* 1965;2:235.
67. Margni RA. "Inmunología e Inmunoquímica". Ed. Panamericana, 1996;5a. ed.
68. Marsh DG y Bias WB. "Basal serum IgE levels and HLA antigen frequencies in allergic subjects". *Immunogenetics* 1977;5:235.
69. Marsh DG, Haddad ZH y Campbell DH. "A new method for determining the distribution of allergenic fractions in biological materials: its application to grass pollen extracts". *J. Allergy* 1970;46:107.
70. Negroni P y Daglio CAN. "Flora micológica del aire en la ciudad de La Plata". *Ann. Inst. Invest. Físicas Apl. Patol. Humana* 1950;1:3.
71. Negroni P y Fisher I. *Rev. Invest. Bact.* 1942;11:228.
72. Negroni P y Ruiz Moreno G. *Ann. Inst. Invest. Físicas Apl. Patol. Humana* 1944;6:1.
73. Noon L. "Principles of immunotherapy". *The Lancet* 1911;1:1572.
74. Ouchterlony O. "Diffusion in gel methods for immunological analysis". *Progr. Allergy* 1958;5:1.
75. Peltre G y Brodard V. "The grass pollen allergen repertoire". *ACI News* 1992;4:140.
76. Petersen A, Becker WM y Schlaak M. "Characterization of grass group I allergens in timothy grass pollen". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993;92:789.
77. Petersen A, Suck R y Hagen S. "Group 13 grass allergens: structural variability between different grass species and analysis of proteolytic stability". *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;107:856.
78. Raftery M, Saldanha M, Geczy C y Kumar R. "Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates". *Respir. Res.* 2003;4:10.
79. Rappaport I. "On the correlation between RAST and allergy intradermal test". *Ann. Allergy* 1979;43:1.
80. Reinberg A. "Circadian reactivity rhythm of human skin to house dust, penicillin and histamine". *J. Allergy* 1969;44:292.
81. Reisman RE, Arbesman CE y Yagi Y. "Radioimmuno-electrophoretic studies of ragweed-binding antibodies in allergic sera". *J. Allergy* 1965;36:315.
82. Romero EJ, Majas FD y Noetinger M. "Polen aéreo en la ciudad de Buenos Aires". *Arch. Argent. Alerg. Immunol. Clin.* 1992;23:4.
83. Ruiz Moreno G. "Alergia en la Historia de las Ciencias Médicas". Primer Congreso Argentino de Historia de la Ciencia. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias, Córdoba*, 1969:p. 383.
84. Ruiz Moreno G. "Sensibilización a *Penicillium* en la ciudad de Buenos Aires". *Rev. A.M.A.* 1944;58:39.
85. Ruiz Moreno G y Bachmann AE. *Ann. Inst. Invest. Físicas Apl. Patol. Humana* 1941;3:189.
86. Ruiz Moreno G. "Breve historia de la alergia en la República Argentina". *Prensa Méd. Argent.* 1943;30:626.
87. Schenk S, Breiteneder H y Susani M. "T-cell epitopes of Phl p 1, major pollen allergen of timothy grass (*Phleum pratense*): evidence for crossreacting and non-crossreacting T-cell epitopes within grass group I allergens". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;96:986.
88. Smith PM, Suphioglu C y Griffith IJ. "Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of *Cyn d 1*, the major allergen of Bermuda grass pollen". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;98:331.
89. Solari MA. "Anemopolinología aplicada". Tesis de Doctorado. Biblioteca de la Facultad de Medicina, Buenos Aires, 1942.
90. Somville MA, Machiels J, Gilles JG y Saint-Remy JM. "Seasonal variation in specific IgE antibodies of grass-pollen hypersensitive patients depends on the steady state IgE concentration and is not related to clinical symptoms". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989;83:486.
91. Standring R, Lavender EA, Wheeler A, Spackman VM y Moran DM. "Induction of T-helper cell activity by fragments of rye grass pollen extract produced by digestion with chymotrypsin". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988;87:337.
92. Standring R, Spackman V y Porter SJ. "Distribution of a major allergen of rye grass (*Lolium perenne*) pollen between other grass species". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1987;83:96.
93. Stewart GA, Turner KJ, Baldo BA, Cripps A, Ford A y Seagroatt V. "Standardization of rye grass pollen (*Lolium perenne*) extract. An immunochemical and physicochemical assessment of six candidate international reference preparations". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988;86:9.
94. Till SJ. "Grass pollen induce IL-5 production by peripheral blood mononuclear cells is increased in allergic rhinitis and inhibited by immunotherapy". *J. Allergy Clin. Immunol. (Abstract)* 1996;97:245.
95. Towbin H, Staehlin T y Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979;76:4350.
96. Urbach E y Gottlieb PM. "Alergia". Ed. Salvat, 1950.
97. Valacer D, O'Reilly ME e Ilowite N. "Identification anti-idiotypic antibodies in the sera of ryegrass allergic and nonallergic individuals". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991;88:349.
98. Valenta R, Ball T, Vrtala S, Duchene M, Kraft D y Scheiner O. "cDNA cloning and expression of *Phleum pratense* pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;199:106.
99. Van Ree R, Clemens JGJ, Aalberse M, Stapel SO y Aalberse RC. "Characterization with monoclonal and polyclonal antibodies of a new major allergen from grass pollen in the group I molecular weight range". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989;83:144.

100. Van Ree R, Hoffman DR y Van Dijk W. "Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;95:970.
101. Van Ree R, Van Leeuwen A y Aalberse RC. "How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998;102:184.
102. Varela Fuentes B; Recarte PP y Graña A. "Alergia en la Práctica Clínica". Ed. Espasa Calpe, 1946.
103. Vaughan WT. "Una Enfermedad Singular: La Historia de la Alergia". Ed. Sudamericana, 1942.
104. Vaughan WT. "Practice of Allergy". Saint Louis, 1939.
105. Von Witsch M, Baluska F, Staiger CJ y Volkmann D. "Profilin is associated with the plasma membrane in microspores and pollen". *Eur. J. Cell. Biol.* 1998;77:303.
106. Wheeler AW, Spackman VM, Cottam GP y Moran DM. "Retained T-cell reactivity of rye grass pollen extract following cleavage with cyanogen bromide and nitrothiocyanobenzoic acid". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988;86:1.
107. Würtzen PA, van Nerven JJ, Arnved J, Ipsen H y Sparholt SH. "Dissection of the grass allergen-specific immune response in patients with allergies and control subjects: T-cell proliferation in patients does not correlate with specific serum IgE and skin reactivity". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988;101:241.