

Original

Asma por sensibilización a alfa amilasa. ¿Es este enzima un alérgeno de interés por vía digestiva?

J. Blanco Carmona, L. Alonso Gil, B. Bartolomé Zavala*. D. A. Vallverdú*, R. Palacios*, S. Juste Picón, M.^a M. Garcés Sotillos, F. García González, R. Pérez Giménez

Sección de Alergología. Hospital General Yagüe. Burgos. *Departamento I+D. Laboratorio Ifidesa Aristegui

El enzima alfa amilasa (Asp o 2) constituye en la actualidad uno de los agentes etiológicos más importantes del asma del panadero, alcanzando en algunas series hasta el 32% de las sensibilizaciones. Sin embargo, los casos de panaderos que presenten clínica tras la ingesta de productos para cuya fabricación se utilice este enzima son escasos. Hemos realizado un estudio con siete panaderos sensibilizados a alfa amilasa, diagnosticados en base a historia clínica, test cutáneos, IgE específica y prueba de provocación bronquial positivas con alfa amilasa. Preparamos extractos con alfa amilasa cruda, horneada a 100°C y a 200°C. Se realizaron test cutáneos con dichos extractos, así como SDS-PAGE y SDS-PAGE-Immunoblotting con los sueros de los siete pacientes. Se observó que los test cutáneos resultaban positivos con el extracto crudo y con el horneado a 100°C, mientras que en todos ellos, dicha prueba resultaba negativa al utilizar α -amilasa horneada a 200°C. Asimismo, se demostró en los extractos crudos y horneados a 100°C una banda de 48-50 kDa. En el extracto de enzima horneado a 200°C no se observó banda alguna. Concluimos que el horneado a que se somete dicho enzima en el proceso de elaboración del pan y alimentos relacionados (temperaturas superiores a 200°C durante 20-30 minutos) altera de tal forma su estructura proteica y por ende su alergenicidad, que hace que dicho enzima no constituya un alérgeno de interés por vía digestiva en los pacientes afectos de asma del panadero.

PALABRAS CLAVE: Alfa amilasa / Asma del panadero / Enzimas

Bronchial asthma due to alpha-amylase sensitization. Is this enzyme an allergen of interest after oral intake?

The enzyme alpha-amylase is currently one of the most significant etiologic agents in baker's asthma, and in some series it represents up to 32% of the sensitizations. However, the number of cases of bakers experiencing clinical manifestations after the oral intake of products in the preparation of which this enzyme is used is small. We have carried out a study on seven bakers with alpha-amylase sensitization diagnosed through clinical history, skin prick test (SPTs), specific IgE and bronchial challenge tests which were all positive for the enzyme. Extracts were prepared of alpha-amylase, in the raw state and baked at 100°C and 200°C. These extracts were used for SPTs as well as for SDS-PAGE and SDS-PAGE-Immunoblotting with the sera of all seven patients. The SPTs were positive with the extracts prepared with the raw enzyme baked at 200°C. Also, a 48-50 kDa band was demonstrated in the raw and 100°C preparation, while in the 200°C one no band was present. We conclude that the baking process to which this enzyme is submitted in the manufacture of bread and related foodstuffs (at temperatures exceeding 200°C for 23-30 minutes) changes its protein structure, and hence its allergenicity, to such an extent that the enzyme thus treated does not constitute an allergen of interest after oral intake in patients with baker's asthma.

KEY WORDS: Alpha-amylase / Baker's asthma / Enzymes.

INTRODUCCION

El enzima α -amilasa (Asp o 2) ha pasado a ser en los últimos años uno de los agentes etiológicos más importante del asma del panadero¹, demostrándose en estos casos la existencia de un mecanismo de hipersensibilidad mediado por IgE.

Sin embargo, revisada la bibliografía, sólo hemos encontrado dos casos^{2, 3} de pacientes afectos de asma del panadero que presentaran síntomas secundarios a la ingesta de pan en cuya fabricación se había utilizado esta sustancia. Hemos tenido la oportunidad de estudiar 7 panaderos sensibilizados a α -amilasa, y ninguno de ellos refería síntomas

secundarios a la ingesta de pan u otros productos de panadería en cuya elaboración se utilizaban harinas y emulgentes que llevaban α -amilasa. Hemos querido valorar cómo las temperaturas a las que se someten estos alimentos durante el horneado modifican la alergenicidad de dicho enzima, y si ello puede hacer tolerable su ingesta a los pacientes sensibilizados. No hemos considerado en este estudio cómo puede afectarse este enzima por el pH gástrico, digestión u otros factores.

MATERIAL Y METODO

Pacientes

Recogemos 7 panaderos, 5 varones y 2 mujeres de edades comprendidas entre 27 y 53 años (media 35 años), sensibilizados a α -amilasa fúngica (procedente del *Aspergillus oryzae*), diagnosticados en base a historia clínica, prueba cutánea (prick) con extracto de α -amilasa positiva, IgE específica (Pharmacia Cap-System) positiva y prueba de provocación bronquial positiva con extracto de dicho enzima. Todos los pacientes toleraban, sin referir sintomatología alguna, la ingesta diaria de pan y productos de panadería en cuya fabricación utilizaban este enzima.

Extractos alergénicos

Utilizamos α -amilasa procedente del *Aspergillus oryzae* (suministrada por Arkady ADM Ibérica. Barcelona) que se horneó a temperaturas de 100 y 200°C durante 20 minutos.

Se prepararon tres muestras: α -amilasa cruda (A), α -amilasa horneada a 100°C (B) y α -amilasa

horneada a 200°C (C). Se incubaron 5 g de cada una de ellas en 25 ml de PBS durante 18 horas. Se pasó por filtro de papel y posteriormente por filtro Millipore (0.22 micras). La concentración final de los extractos fue de 2 mg/ml. Se congelaron los extractos en alícuotas hasta el momento de realizar los estudios.

Pruebas cutáneas

Se realizaron en la superficie anterior del antebrazo según metodología de prick y por triplicado. Se utilizaron lancetas Dome-Hollister. La medida de la pápula obtenida se calculó hallando la media de la suma aritmética del diámetro mayor y el perpendicular al mismo expresándolo en mm. Los resultados se expresaron respecto a los controles de histamina (10 mg/ml) y PBS.

SDS-PAGE

La electroforesis en presencia de SDS se realizó por el método discontinuo de Laemmli⁴, en gel de acrilamida/bis-acrilamida al 12,5 %, y se aplicó en paralelo un patrón de proteínas con masas moleculares conocidas. El método de tinción utilizado fue tinción con Azul de Coomassie R-250 o tinción de plata según necesidad. Se añadieron 10 μ g/calle de patrón y muestra, conteniendo 20 μ g de proteína (Bradford) cada una, cuando se utilizó la tinción con Azul de Coomassie y 1 μ g en el caso de la tinción de plata.

La tinción de plata se realizó con el kit Silver Stain Plus (BIO-RAD), siguiendo las especificaciones del fabricante. La evaluación de las bandas obtenidas (cálculo de las masas moleculares y porcentaje de las bandas en el extracto) se realizó por

Tabla I

Paciente	Prick A	Prick B	Prick C	CAP (KU/ml)	Prov. bronq.
1. JSL	7mm (5mm)	7mm	0	> 100	Inmediata
2. YLG	11mm (6 mm)	7mm	0	> 100	Inmediata
3. ABR	8mm (5mm)	8mm	0	6.00	Inmediata
4. TGR	12mm (7mm)	8mm	0	9.66	Inmediata
5. CBR	7mm (4mm)	6mm	0	7.20	Inmediata
6. AOG	10mm (5mm)	7mm	0	10.1	Inmediata
7. EZL	7mm (5mm)	7mm	0	7.4	Inmediata

Entre paréntesis valor del control de histamina. Prick A: amilasa cruda, prick B: amilasa 100°C, prick C: amilasa 200°C.

análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE (Millipore).

SDS-PAGE-Immunoblotting

Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron electransferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P), y posteriormente, incubadas con el suero del paciente. Las bandas fijadoras de IgE fueron reveladas con un sistema enzimático, utilizando un conjugado de Anti-IgE-peroxidasa (diluido 1:25). El patrón de pesos moleculares se reveló con Negro Amido.

RESULTADOS

Pruebas cutáneas

En los siete pacientes las pruebas cutáneas con el extracto crudo (A) resultaron positivas. Esta positividad persistió en todos ellos al ensayar el extracto B (α -amilasa horneada a 100°C), si bien en cuatro sujetos se objetivó una disminución de la pápula obtenida con la α -amilasa horneada.

Por el contrario, en todos ellos las pruebas realizadas con el extracto C (horneado a 200°C) resultaron negativas.

En la Tabla I se recogen estos datos junto al resultado del CAP y de la prueba de provocación bronquial en cada paciente.

SDS-Page

La muestra de α -amilasa cruda (A) sometida a una electroforesis en presencia de SDS nos mostró una banda proteica principal de 48,3 kDa que representaba un 95 % en peso de la muestra. Asimismo se detectaron varias bandas proteicas con masas moleculares entre 22 y 38 kDa. Todas ellas con un porcentaje en peso inferior al 1 %.

La muestra de α -amilasa horneada a 100°C (B) tras electroforesis en presencia de SDS, mostró una sola banda proteica de 50 kDa que representaba un 100 % en peso de la muestra. El estudio de la muestra C, obtenida a partir de α -amilasa horneada a 200°C, no mostró banda proteica alguna (Figuras 1 y 2).

SDS-PAGE-Immunoblotting

Se realizó un ensayo de SDS-PAGE Immunoblotting con las 3 muestras de α -amilasa, incubándolas con el suero de los pacientes. Las IgEs presentes en el suero de los pacientes se fijaron a la

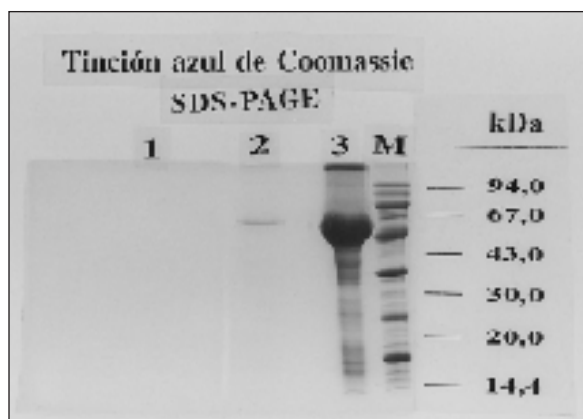


Fig 1. SDS-PAGE tras tinción con Azul de Coomassie. Calle 1: α -amilasa calentada a 200°C. Calle 2: α -amilasa calentada a 100°C. Calle 3: α -amilasa. M: patrón de masas moleculares.

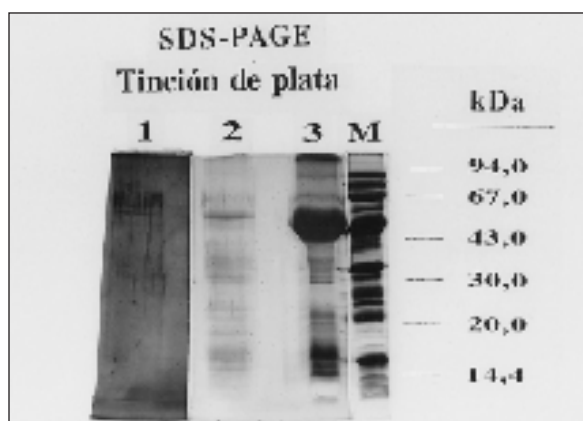


Fig 2. SDS-PAGE tras tinción de Plata. Calle 1: α -amilasa calentada a 200°C. Calle 2: α -amilasa calentada a 100°C. Calle 3: α -amilasa. M: patrón de masas moleculares.

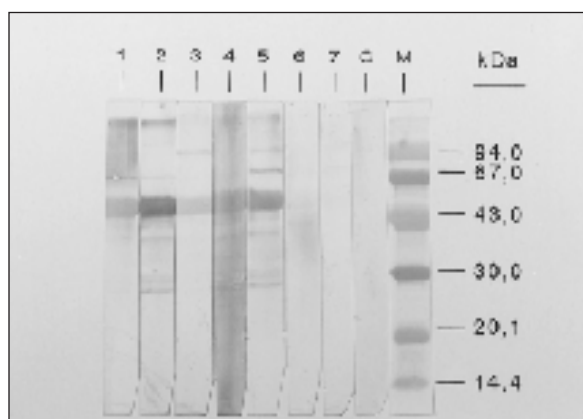


Fig. 3. SDS-PAGE Immunoblotting de la muestra de α -amilasa.

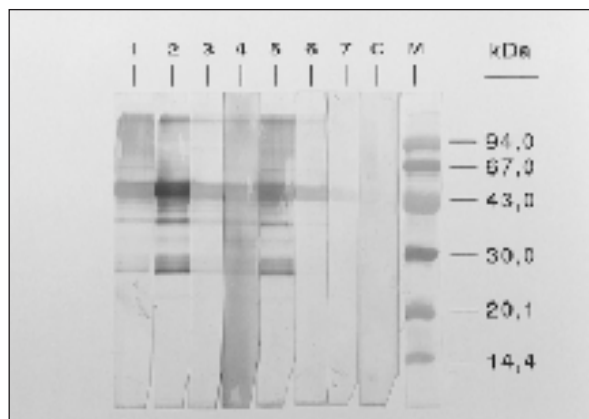


Fig. 4. SDS-PAGE Immunoblotting de la muestra de α -amilasa calentada a 100°C.

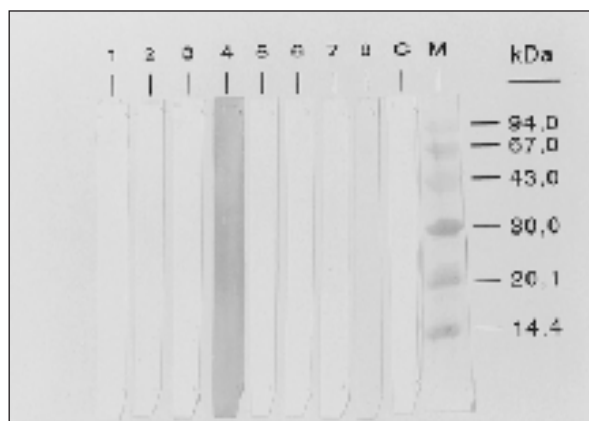


Fig. 5. SDS-PAGE Immunoblotting de la muestra de α -amilasa calentada a 200°C.

proteína de 48,3 kDa y 50 kDa en las muestras A y B, respectivamente, mientras que en el ensayo realizado con la muestra C no se observó fijación de IgE a la membrana (Figuras 3, 4 y 5).

DISCUSION

El enzima α -amilasa (procedente del *Aspergillus oryzae*) se utiliza como aditivo en la fabricación de pan y otros productos, siendo añadido tanto en la fábrica de harinas como posteriormente en la panadería, a través de los denominados mejorantes o emulgentes panarios. Su actividad enzimática se inactiva entre 70 y 75°C. Dada su baja termoestabi-

lidad y teniendo en cuenta que el pan es horneado a temperaturas superiores a 200°C durante 20-25 minutos, no existe peligro de sobredosificación. Por ello, y aunque por lo general se utiliza en una relación 0.01 % respecto a la cantidad de harina, es difícil en la práctica saber qué cantidad de α -amilasa puede existir en los productos de panadería.

A pesar del creciente número de casos descritos de sensibilizaciones a este enzima entre panaderos, las publicaciones que recogen síntomas tras la ingesta de pan son escasas.

Losada⁵ describe un caso de provocación oral positiva con 10 mg de α -amilasa cruda en un paciente que padecía asma del panadero y que, sin embargo, toleraba la ingesta de pan.

Kenny² describe el caso de una mujer afecta de asma del panadero que presentó una caída del PEFR del 21 % tras provocación oral a doble ciego con α -amilasa cocinada (100°C durante 30 minutos). En nuestra opinión, si bien la metodología del estudio es correcta, hay que hacer hincapié en que el pan es horneado a temperaturas muy superiores (220 a 250°C) a la utilizadas en dicho estudio. Asimismo, Baur³ publica un caso de asma del panadero que presentaba clínica exclusivamente nasal, y un aumento de las resistencias nasales por rinomanometría tras ingerir pan con α -amilasa. Llama la atención que, pese a ser una paciente asmática, no mostrara ningún cambio en la función pulmonar y que la provocación con pan sin α -amilasa produjera, asimismo, cambios en las resistencias nasales en el límite de ser significativos. Las múltiples sensibilizaciones que padecía esta paciente (*Dermatophagoides pteronyssinus*, epitelios, pólenes) podrían justificarnos una prueba falsamente positiva.

Baur⁶ se plantea si puede considerarse a la α -amilasa un antígeno por vía digestiva. De once panaderos estudiados, tan sólo en uno encuentra una débil respuesta a la α -amilasa calentada (200°C), por lo que deduce que el calor no inactiva de forma absoluta la capacidad de dicho enzima para fijar IgE. En dicho trabajo considera que son precisos más estudios para valorar la alergenicidad residual o aparición de nuevos determinantes tras el horneado.

No hemos realizado pruebas de provocación oral en nuestros pacientes, ya que todos ellos toleraban sin problema la ingesta de pan y productos de bollería, que ellos mismos fabricaban utilizando α -amilasa.

En nuestro estudio, y a pesar de tratarse de pocos casos, parece quedar demostrado que una vez sometido dicho enzima a las temperaturas habituales de horneado, la actividad alergénica desaparece tal y como queda reflejado en los test cutáneos. Aún más, tal y como se muestra en el SDS-PAGE, la proteína se degrada completamente reduciéndose probablemente a péptidos muy pequeños que no manifiestan carácter alergénico alguno. No hemos realizado en nuestro estudio inhibición del CAP a α -amilasa con la α -amilasa cruda y horneada, lo que constituiría un método de interés para estudiar la pérdida de alergenicidad de este enzima.

Las bandas de 48-50 kDa obtenidas en los extractos A y B (crudo y horneado a 100°C) coinciden con el alérgeno dominante descrito por Baur⁷ de un peso molecular de 53 kDa y denominado Asp o 2. Las bandas débiles con masas moleculares entre 22 y 38 kDa, todas ellas en un porcentaje en peso inferior al 1%, encontradas en el SDS-PAGE del extracto crudo, podrían corresponder a contaminantes del enzima comercial suministrado, que son desnaturalizados al someterse a calentamiento de 100°C y que ya son descritas en dicho trabajo.

En conclusión, no parece que el enzima α -amilasa, una vez expuesto a la temperatura de horneado, deba considerarse como un alérgeno de interés por

vía digestiva en los pacientes afectados de asma del panadero por sensibilización a dicho enzima.

BIBLIOGRAFIA

1. Baur X, Sauer W, Weiss W, Fruhmman G. Inhalent allergens in modern baking industry. *Immunol allergy Pract* 1989; 11: 13-15.
2. Kanny G, Moneret-Vautrin DA. Alpha-amylase contained in bread can induce food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 132-133.
3. Baur X, Czuppon AB. Allergic reaction after eating alpha-amylase (Asp o 2)-containing bread. *Allergy* 1995; 50: 85-87.
4. Laemmli UK. Clearance of structural proteins during free assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
5. Losada E, Hinojosa M, Quirce S, Sánchez-Cano M, Moneo I. Occupational asthma caused by α -amylase inhalation. Clinical and immunologic findings and bronchial response patterns. *J. Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 118-125.
6. Baur X, Sander I, Jansen A, Czuppon AB. Sind Amylasen (Backmittelenzyme) relevante Nahrungsmittelallergene? *Schweiz Med Wochenschr* 1994; 124: 846-851.
7. Baur X, Chen Z, Sander I. Isolation and denomination of an important allergen in baking additives: alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* (Asp o II). *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 465-470.

Dr. Juan Blanco Carmona
Sección Alergología
Hospital General Yagüe
Avda. del Cid s/n
09005 Burgos