



AL ·LÈRGIA AL LÍQUID
SEMINAL, REACTIVITAT
ENCREUADA AMB CASPA
DE GOS I
CARACTERITZACIÓ DELS
AL ·LÈRGENS IMPLICATS

Maria Basagaña Torrentó

Tesi Doctoral
2012

**AL ·LÈRGIA AL LÍQUID SEMINAL,
REACTIVITAT ENCREUADA AMB CASPA DE
GOS I CHARACTERITZACIÓ DELS
AL ·LÈRGENS IMPLICATS**

Tesi doctoral

Maria Basagaña Torrentó

Director

Dr. Moisés Labrador-Horrillo

Tutor

Dr. Josep Àngel Bosch Gil

Programa de Doctorat

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona 2012

PRESENTACIÓ:

Aquesta tesi es presenta com a compendi de publicacions segons la normativa aprovada per la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

La introducció té com a objectiu revisar de manera objectiva el coneixement existent del fenomen d'hipersensibilitat al líquid seminal humà, atenent tots els seus aspectes, com les manifestacions clíniques, l'origen, la freqüència, el diagnòstic diferencial, l'avaluació clínica i el tractament; i el coneixement existent de l'al·lèrgia a epitelis. Altres objectius de la introducció són revisar els principis bàsics de la reacció al·lèrgica i avaluar les novetats en l'al·lèrgia respiratòria, l'anafilaxi i l'esterilitat per causa desconeguda.

En l'apartat de metodologia s'inclouen aquells aspectes que, tot i ja estar inclosos en les diverses publicacions d'aquesta tesi, s'han considerat rellevants per donar una visió de conjunt. Aquest apartat conté les característiques de la població estudiada, els procediments i, finalment, l'anàlisi estadística.

Es presenten tres publicacions: dues corresponen a l'àrea del fenomen d'hipersensibilitat al líquid seminal humà, i la tercera correspon més específicament a l'àrea de l'al·lèrgia a la caspa de gos.

En primer lloc, s'inclou la presentació d'un cas clínic d'una pacient afectada d'al·lèrgia al líquid seminal humà i l'estratègia terapèutica usada per resoldre el problema de concepció que el desordre comportava a la pacient i a la seva parella. La segona publicació, sens dubte la més rellevant de la tesi, identifica l'antigen prostàtic específic com l'al·lèrgen causal de l'al·lèrgia al líquid seminal humà que presenta la pacient del primer estudi. A més, presenta el fenomen de reactivitat encreuada entre l'antigen prostàtic específic present al líquid seminal humà i una proteïna en aquell moment encara no identificada de la caspa de gos com a possible origen del fenomen. En el tercer manuscrit es descriu l'al·lèrgen de la caspa de gos que presenta reactivitat encreuada amb l'antigen prostàtic específic.

També es presenten els resultats de tres treballs annexos a la línia d'investigació de la tesina. El primer és un estudi de la prevalença de reconeixement de la proteïna de la caspa de gos amb reactivitat encreuada amb l'antigen prostàtic específic identificada com a Can f 5 en una població d'al·lèrgics al gos de Catalunya. Aquest treball va ser presentat com a comunicació oral en el Congrés de l'Acadèmia Europea d'Al·lèrgia i Immunologia Clínica celebrat a Londres el juny de 2010, i va ser premiat pel jurat. Actualment se n'està preparant el manuscrit per publicar-lo. El segon és un estudi de la sensibilització al líquid seminal humà i la caspa de gos en una població de dones amb esterilitat per causa desconeguda. El tercer és un estudi per determinar l'al·lèrgenicitat

del PSA en sèmens de diversos donants. Aquests treballs van ser presentats com a comunicació oral a la Sessió de Professors Convidats del Servei d'Andrologia de l'Hospital de Sant Pau, Fundació Puigvert i a la Jornada de Cloenda de la Societat Catalana d'Al·lèrgologia respectivament. Es presenten en aquesta tesi en format carta a l'editor.

Finalment, s'inclou un apartat de discussió general i conclusions on es recapitula de manera sistemàtica sobre alguns aspectes discutits i presentats a les diverses publicacions.

AGRAÏMENTS:

Aquesta tesi va néixer gairebé de casualitat fa uns set anys enrere, quan una jove estudiant de Medicina que havia acabat la residència en al·lergologia va començar el gran repte d'enfrontar-se a l'apassionant món de l'assistència mèdica en el camp de la immunoal·lèrgia a l'Institut Universitari Dexeus.

Dia rere dia, malalt rere malalt, i van ser molts, descobreixes que malgrat que els individus cauen malalts i requereixen l'experiència dels metges, aquests no tenim totes les respostes, i això és especialment verídic en el camp de la immunoal·lèrgia. Vaig aprendre la cosa més important per a qualsevol metge jove que vol dedicar-se a la investigació (encara que jo en aquell moment ni m'ho plantejava): a escoltar cada malalt com si fos únic, a intentar comprendre el perquè de la seva malaltia amb els coneixements que havia adquirit en el camp de l'al·lergologia, i, quan el que jo sabia no em donava la resposta, a continuar endavant, formular hipòtesis i intentar demostrar-les. "Darrere cada malalt hi ha molt per aprendre."

La flama de l'interès per la investigació mèdica havia calat en mi i l'he portat encesa a tot arreu on he anat.

El recorregut culmina amb els tres articles científics que es presenten en aquest treball. No ha estat un recorregut en solitari, sinó que diverses persones han anat deixant les seves empremtes, d'alguna manera o altra, al llarg de les pàgines d'aquesta tesi.

Primer de tot, he d'agrair a en Moisès Labrador, director de la tesi, haver acceptat el repte de dirigir-me el treball i la confiança i l'autonomia atorgades des de l'inici del projecte. Gràcies a la seva visió pràctica, he entès que la lectura d'una tesi no és el final de res sinó l'inici d'allò que és vertaderament transformador, i que l'esforç fet es pot aplicar passant a l'acció.

Vull agrair també a l'Anna Cisteró haver-me ensenyat a mirar una mica més enllà, cap a allò que no es veu a primera vista, que m'ha encoratjat a estirar del fil i a fer créixer els projectes.

Als meus companys de la Unitat d'Al·lergologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron per fer-me sentir una més dins de la seva gran família; als del Servei d'Al·lergologia de l'Institut Universitari Dexeus per haver-me acompanyat en aquells primers dies; als del Servei d'Al·lergologia de l'Hospital Doctor Josep Trueta per haver compartit amb mi el seu entusiasme per la feina ben feta; als de la Unitat d'Al·lergologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol pel seu suport i ajuda per finalitzar aquest treball. Aquesta tesi no seria el mateix si darrere no hi hagués persones que sempre han fet mans i mànigues per solucionar els possibles i impossibles.

Als coautors dels articles per anar nodrint amb els seus suggeriments el cos d'aquest treball.

Als participants dels diversos estudis, per deixar que fiquéssim el nas en les seves històries i per col·laborar amb nosaltres amb tot el que necessitàvem.

Als amics que m'han acompanyat durant aquests anys, que saben que la vida, com la investigació, té moments apassionants i també moments de desesperació, de resultats que no entens i no hauries sospitat mai. Gràcies per ser-hi, tant en la foscor com en els dies clars.

A la família, perquè sense la gent que m'estima no hauria arribat fins aquí.

A en Bernat, per ser el motor que mou tota la meva vida i m'impulsa a millorar dia rere dia.

PUBLICACIONES INTERNACIONALS QUE COMPONEN LA TESI:

1. Human Seminal Plasma Allergy and Successful Pregnancy

Ferré-Ybarz L, Basagaña M, Coroleu B, Bartolomé B, Cisteró-Bahima A
J Investig Allergol Clin Immunol. 2006; 16 (5): 314-6
Factor d'impacte (2010): 1.489

2. Allergy to human seminal fluid: cross-reactivity with dog dander

Basagaña M, Bartolomé B, Pastor C, Torres F, Alonso R, Vivanco F, Cisteró-Bahima A
J Allergy Clin Immunol. 2008 Jan; 121(1): 233-9
Factor d'impacte (2010): 9.273

3. Involvement of Can f 5 in a case of Human Seminal Plasma Allergy

Basagaña M, Bartolomé B, Pastor Vargas C, Mattsson L, Lidholm J, Labrador-Horrillo M
En premsa
Factor d'impacte (2010): 2.235

ALTRES RESULTATS DEL TREBALL DE RECERCA:

1. Component resolved diagnosis of dog allergy

Basagaña M, Luengo O, Mattsson L, Lindholm J, Garriga T, Labrador-Horrillo M, Cardona V

29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology
Londres, Regne Unit, 2010

Treball presentat com a comunicació oral i premiat pel jurat.

2. Sensibilització al líquid seminal humà i caspa de gos en una població de dones amb esterilitat per causa desconeguda

Basagaña M, Labrador-Horrillo M

Sessió de Professors Convidats del Servei d'Andrologia de l'Hospital de Sant Pau.
Fundació Puigvert

Barcelona, gener de 2012

3. Tenen tots els sèmens el mateix potencial al lergogen?

Basagaña M

Jornada de Cloenda SCAIC, 2008

Treball presentat com a comunicació oral.

ACRÒNIMS

2ME	2- β -mercaptoethanol
AINE	Antiinflamatori no esteroïdal
Alergológica 2005	Estudi de factors epidemiològics, clínics i socioeconòmics de les malalties al·lèrgiques a Espanya, 2005
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
ASA	Anticossos antiesperma
CRD	Diagnòstic per components
CPA	Cèl·lules presentadores d'antigen
DPK	Cal·licreïna prostàtica de gos
EAACI	Acadèmia Europea d'Al·lèrgologia i Immunologia Clínica
Fc ϵ RI	Receptors específics d'alta afinitat de la IgE
FIV	Fertilització in vitro
HSP	Líquid seminal humà
HRP	Peroxidasa de rave
HSPA	Al·lèrgia al líquid seminal humà
ICSI	Injecció intracitoplasmàtica d'esperma
IUI	Inseminació intrauterina
NTC	Nitrocel·lulosa
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PGD2	Prostaglandina D2
PSA	Antigen prostàtic específic

PVDF	Polifluorur de vinilidè
RA	Rinitis al·lèrgica
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
Rc	Reactivitat encreuada
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SIT	Immunoteràpia subcutània
TAB	Test d'activació de basòfils
TBS	Tampó Tris
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

Figura 1: Fases de la reacció al·lèrgica:

a) Fase de dessensibilització;

b) Fase efectora pàg. 17

Taula I: Serina-proteases descrites com a al·lèrgens pàg. 19

Figura 2: Fisiopatologia de la RA. Fase precoç pàg. 22

Figura 3: Etiologia de la RA segons Alergológica 2005 pàg. 24

Taula II: Classificació de la gravetat de l'asma en adults segons el grup

Global Initiative for Asthma pàg. 25

Taula III: Causes d'anafilaxi pàg. 28

Taula IV: Criteris clínics per al diagnòstic d'anafilaxi pàg. 30

Taula V: Diagnòstic diferencial d'anafilaxi pàg. 31

Figura 4: Algoritme d'actuació general en l'anafilaxi pàg.33

Figura 5: Fecundabilitat de parelles infèrtils pàg. 38

Taula VI : Indicacions per realitzar tests de detecció d'anticossos

antiesperma pàg. 45

Taula VII: Gestació estimada i cost per cicle en tractaments per a

infertilitat per causa desconeguda pàg. 46

Figura 6: *Immunoblotting* amb el sèrum dels pacients al·lèrgics al gos que reconeixen la proteïna identificada com a PSA (núm. 4 i 36) i el sèrum de

la pacient amb HSPA i semen de 40 donants sans i el semen del marit de

la pacient afectada d'HSPA pàg. 92

Taula VIII : Valors d'IgE específica davant de caspa de gos, epiteli de

gos i líquid seminal humà en els pacients al·lèrgics al gos que reconeixen

el PSA en el líquid seminal pàg. 93

ÍNDEX DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ.....	13
Al·lèrgia	13
Definició	13
Al·lèrgen.....	16
Al·lèrgenicitat.....	16
Reactivitat encreuada	18
Cal·licreïnes o serina-proteases	18
Patologia al·lèrgica	21
Al·lèrgia respiratòria	21
Definició	21
Fisiopatologia	21
Rinoconjuntivitis al·lèrgica.....	22
Epidemiologia.....	22
Classificació	23
Etiologia	24
Asma al·lèrgic.....	24
Epidemiologia.....	25
Classificació	25
Etiologia	26
Rinitis i asma: una via aèria, una malaltia.....	27
Anafilaxi	27
Definició	27
Epidemiologia.....	28
Causes d'anafilaxi	28
Diagnòstic d'anafilaxi.....	29
Diagnòstic diferencial.....	30
Proves de laboratori.....	31
Tractament	32
Al·lèrgia al líquid seminal	34
Definició	34

Epidemiologia	34
Al·lèrgens.....	35
Diagnòstic i diagnòstic diferencial	36
Tractament	36
Infertilitat	38
Definició	38
Epidemiologia	38
Etiologia	39
Diagnòstic	40
Infertilitat per causa desconeguda	41
Immunoinfertilitat i anticossos antiesperma	41
Tractament:	45
Infertilitat i atòpia	47
Sensibilització a l'epiteli / caspa de gos	50
Epidemiologia	50
Al·lèrgens de gos	50
JUSTIFICACIÓ.....	53
OBJECTIUS	55
Propòsit general.....	55
Objectius específics	55
Objectiu 1	55
Objectiu 2	55
Objectiu 3	55
Objectiu 4	55
MÈTODES	56
Selecció de pacients dels estudis:	56
Mostres al·lèrgenes i extractes	58
Tests cutanis (<i>skin prick test</i>).....	59
Determinació d'IgE específica.....	60
ImmunoCAP® ISAC (Phadia, Upssala, Suècia)	61
SDS-PAGE immunoblotting i immunoblotting inhibició	62

EAST inhibició	63
Identificació proteica i caracterització mitjançant espectrometria de masses.....	64
Anàlisi estadística	65
RESULTATS	66
Primer article.....	66
Segon article.....	70
Tercer article.....	79
Primer apèndix	88
Segon apèndix	89
Tercer apèndix	91
DISCUSSIÓ	96
Estudi d'un cas d'al·lèrgia al líquid seminal humà des del punt de vista molecular i caracterització dels al·lèrgens implicats	96
Caracterització del PSA com a al·lèrgen responsable d'un cas d'HSPA	96
Descripció de la reactivitat encreuada entre el líquid seminal i la caspa de gos.....	98
Caracterització de l'al·lèrgen de la caspa de gos que té reactivitat encreuada amb el PSA: Can f 5	100
Estudi de la prevalença de reconeixement dels al·lèrgens identificats en una població d'al·lèrgics al gos i en una població de dones amb esterilitat per causa desconeguda. 102	102
Prevalença de reconeixement de Can f 5 en una població d'al·lèrgics al gos de l'àrea mediterrània	102
Sensibilització a la caspa de gos i al líquid seminal en una població de pacients amb esterilitat per causa desconeguda.....	104
Miscel·lània.....	106
Inseminació artificial com a mètode de fertilització en pacients afectades d'HSPA	106
Tots els sèmens són igualment al·lèrgics?.....	106
CONCLUSIONS	109
REFERÈNCIES.....	110

INTRODUCCIÓ

Al·lèrgia

Definició

Els termes *al·lèrgia*, *hipersensibilitat* i *atòpia* van estretament lligats, però els seus conceptes són clarament diferents.

El terme *al·lèrgia* va ser introduït en la literatura mèdica el 1906 per von Pirquet per referir-se a una resposta immunològica nociva.¹ La paraula deriva del terme grec *allos* 'canviat', i *ergos* 'reacció'. Posteriorment es va fer servir aquest terme amb moltes altres accepcions, amb la consegüent falta d'acord en el seu significat.

La reacció d'hipersensibilitat immediata va ser descoberta a principis del segle XX per Paul Portier i Charles Robert Richet¹ quan, durant els seus estudis sobre el paper protector de la immunització, varen observar que els gossos als quals s'injectava toxina de l'ortiga de mar morien després d'una segona exposició. En obtenir l'efecte contrari a la protecció, varen denominar la reacció *anaphylaxis*.²

El 1923 el terme *atòpia*, del grec *atopos* 'fora de lloc', va ser usat per Coca i Coke³ per descriure les reaccions cutànies en forma de pàpula i eritema que es presentaven de forma immediata, en resposta als al·lèrgens en pacients amb símptomes respiratoris d'asma i rinoconjuntivitis. Posteriorment, Pepys⁴ va definir *atòpia* com aquella forma de reactivitat immunològica en l'individu en què es produeixen anticossos de tipus reagínic en resposta a l'exposició a al·lèrgens comuns de l'ambient de l'individu. El 1963, Coombs i Gell⁵ varen editar un llibre en què usaven el terme *al·lèrgia* en el sentit original de von Pirquet: l'usaven com a base racional per a la classificació de les reaccions d'hipersensibilitat, hipersensibilitat tipus I o anafilàctica, tipus II o citotòxica, tipus III o reacció d'Arthus i tipus IV o d'hipersensibilitat retardada.⁶

L'Acadèmia Europea d'Al·lèrgologia i Immunologia Clínica (EAACI) va publicar el 2001 una revisió de la nomenclatura en al·lèrgologia⁷ amb la finalitat d'unificar i definir aquests conceptes; l'Organització Mundial d'Al·lèrgia va revisar el 2003 aquesta terminologia.⁸ En el document s'estableix que el terme *hipersensibilitat* s'ha d'usar per descriure símptomes o signes objectius i reproduïbles iniciats per l'exposició a estímuls definits a una dosi tolerada per persones normals. Es defineix com *al·lèrgia* aquella reacció d'hipersensibilitat iniciada per mecanismes immunològics específics, en què anticossos o cèl·lules poden fer de mitjancers. Quan un anticòs pertany a l'isotip

immunoglobulina E (IgE), es parla d'*al·lèrgia vehiculada per IgE*. En el context d'una reacció immunològica, el desencadenant es denomina *antigen*.

Segons l'EAACI, el terme *atòpia* s'hauria de reservar per descriure la predisposició genètica per produir anticossos IgE en resposta a l'exposició a substàncies que són tolerades per la majoria de la població exposada.

Malgrat que clàssicament s'ha considerat la reacció al·lèrgica com una reacció d'hipersensibilitat tipus I de la classificació de Gell i Coombs, en realitat hi participen diversos mecanismes immunològics.⁹ L'expressió clínica d'aquesta reacció pot donar lloc a l'aparició de quadres clínics com rinoconjuntivitis, asma, urticària, gastroenteritis, o anafilaxi en funció de l'òrgan diana afectat.

De forma esquemàtica, la seqüència d'esdeveniments que es produeixen en aquest tipus de reaccions és la que es mostra a la Figura 1.¹⁰ L'exposició a l'al·lèrgen en un individu susceptible condueix a la sensibilització, que suposa la producció d'anticossos específics IgE davant d'aquest antigen i la seva unió als seus receptors específics d'alta afinitat (FcεRI), presents principalment en la superfície de mastòcits i basòfils. En una reexposició a l'al·lèrgen, aquest pot reaccionar davant de la IgE específica i produir un entrecruament de dues molècules d'IgE adjacents i l'agregació dels FcεRI corresponents, i provocar l'activació dels mastòcits i basòfils i l'alliberament de mediadors inflamatoris preformats i de sintetitzats *de novo*. Aquests, mitjançant la seva acció farmacològica sobre els òrgans diana, indueixen l'aparició dels típics símptomes de la fase immediata de la reacció al·lèrgica: broncospasme, rinitis, urticària, diarrea, vòmits o anafilaxi.

Aquesta fase immediata de la reacció al·lèrgica va seguida, a les 4-6 hores, d'una reacció més tardana caracteritzada per un infiltrat inflamatori i un edema dels teixits. La desgranulació mastocitària condueix a un augment de la permeabilitat vascular, indueix l'expressió de molècules d'adhesió com la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) i la secreció de quimiocines com ara l'eotaxina i *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (RANTES), que provoca un reclutament selectiu d'eosinòfils, monòcits i limfòcits T i B que amplifiquen i perllonguen la resposta inflamatòria. Clínicament, es tradueix en símptomes més persistents com la hiperreactivitat bronquial, l'obstrucció nasal o l'eczema.

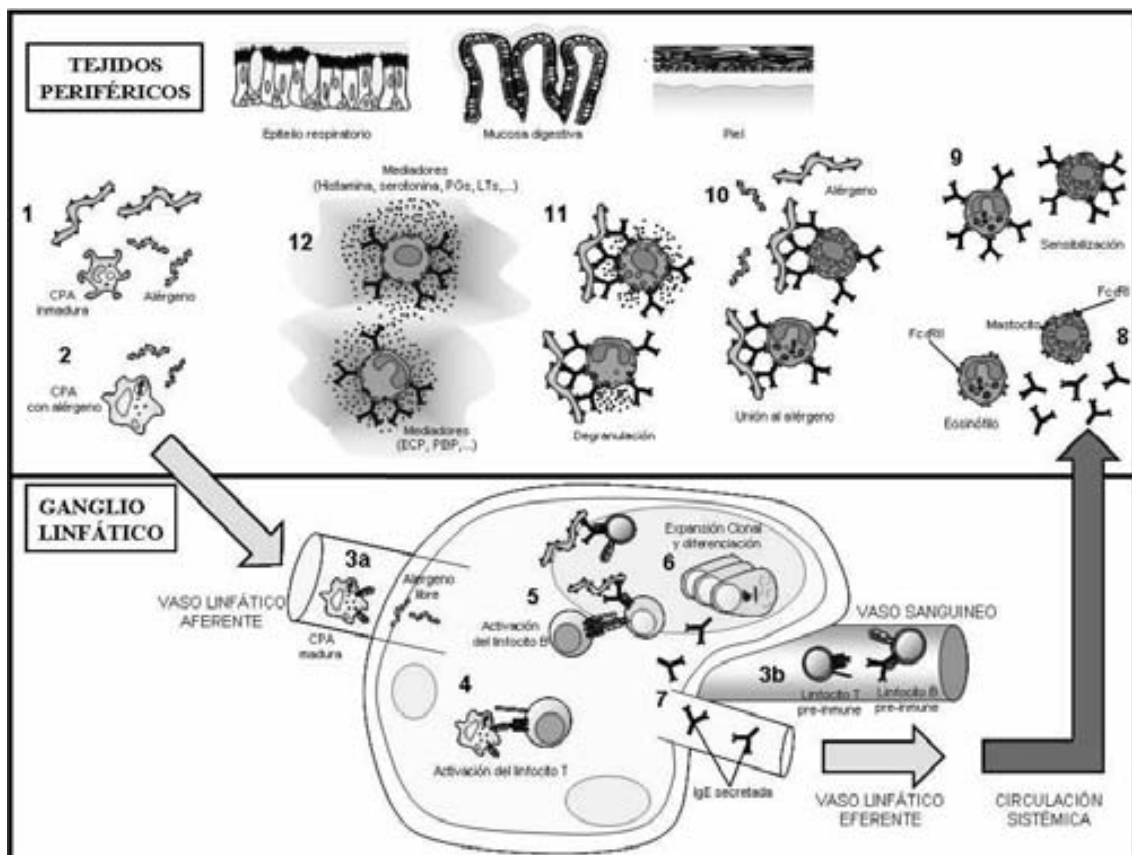


Figura 1 Fase de sensibilització.

- 1 - Entrada d'al·lèrgens en els teixits perifèrics i captació per les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) immadures.
- 2 - CPA madura amb l'antigen processat.
- 3a - Arribada de l'antigen, lliure i processat per CPA, al gangli limfàtic.
- 3b - Arribada de limfòcits B i T preimmunes al gangli limfàtic.
- 4 - Presentació de l'antigen processat al limfòcit T. Activació del limfòcit T.
- 5 - Presentació de l'antigen lliure al limfòcit B. Activació del limfòcit B pel limfòcit T activat.
- 6 - Expansió clonal dels limfòcits B i diferenciació a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgE específica.
- 7 - Transport d'IgE específica als teixits perifèrics.
- 8 - Unió de la IgE als receptors d'alta i baixa afinitat de les cèl·lules efectores.

- 9 - Sensibilització de les cèl·lules efectores, mastòcits i eosinòfils. FASE EFECTORA.
- 10 - Segon contacte amb l'al·lergen després de la fase de sensibilització.
- 11 - Polarització d'IgE positiva a l'al·lergen i inici de la degranulació dels mastòcits.
- 12 - Alliberament de mediadors inflamatoris. Fase d'expressió clínica. (Extret de la tesi doctoral de la Dra. Olga Luengo, reproduït amb permís del Dr. M. Labrador).

Al·lergen

Un al·lergen és un antigen capaç de desencadenar una resposta IgE en un individu atòpic. El terme *al·lergen* es fa servir per descriure dues propietats moleculars: la propietat de sensibilitzar, és a dir, la capacitat d'induir la producció d'anticossos IgE; i la propietat de desencadenar una reacció al·lèrgica¹¹.

Generalment són proteïnes o glicoproteïnes de pes molecular entre 5.000 i 70.000 daltons. Clàssicament, s'ha definit els al·lèrgens principals com aquells que indueixen una resposta IgE en més del 50% dels pacients exposats a la font al·lèrgica que els conté, i que tenen símptomes quan s'hi exposen.¹² Aquesta és, malgrat tot, una definició arbitrària¹³ i alguns autors no la consideren satisfactòria, ja que no reflecteix la vertadera contribució de l'al·lergen a la reactivitat global de l'extracte i la terminologia podria induir a error, ja que un al·lergen principal no és sinònim de major risc al·lèrgic.

Al·lergenicitat

S'ha establert que perquè una molècula sigui un al·lergen ha de complir quatre requisits:

1. Tenir una estructura tridimensional que l'anticòs reconegui.
2. Tenir una estructura primària que pugui ser presentada pels al·lèls HLA de classe II del complex major d'histocompatibilitat.
3. L'afinitat entre al·lergen i anticòs hauria de ser adequada per assegurar la unió a baixes concentracions.
4. Ha de contenir almenys dos epítops que actuïn de pont per l'entrecruament amb l'anticòs IgE específic.¹⁴

Els al·lèrgens solen ser proteïnes, però no totes les proteïnes són al·lèrgens. Malgrat el creixent coneixement sobre l'estructura i la funció dels al·lèrgens, les característiques diferencials que fan d'una proteïna un al·lergen segueixen essent objecte d'estudi i debat. Un corrent d'estudi reivindica que qualsevol proteïna immunògena presentada al sistema immunitari d'un individu atòpic (en un context adequat i en prou quantitat) pot

convertir-se en un al·lergen¹⁵, mentre que una altra visió atribueix l'al·lergenicitat a certes característiques estructurals de les proteïnes.¹⁶

El coneixement actual de la distribució limitada dels al·lèrgens a un grup reduït de famílies de proteïnes¹⁷ recolzaria més l'assumpció que no qualsevol proteïna és capaç de comportar-se com un al·lergen.

D'altra banda, l'ampli espectre de proteïnes al·lèrgenes, que inclouen gran varietat d'estructures i funcions, fa poc probable que les característiques estructurals de les proteïnes siguin les úniques responsables de la resposta IgE. Encara que quedi per dilucidar quines característiques moleculars governen l'al·lergenicitat d'una proteïna, se sap que aspectes com la mida, la solubilitat, la integritat de la proteïna i l'estabilitat contribueixen notablement a la seva potència al·lèrgica.¹¹

La mida i la solubilitat de la proteïna intacta són factors especialment rellevants per als al·lèrgens aerotransportats que accedeixen a l'organisme a través de les vies respiratòries.

També són importants per a l'al·lergenicitat la dosi i la ruta d'exposició de l'al·lergen, així com la predisposició genètica de l'individu. En condicions naturals, l'exposició repetida a dosis baixes d'al·lèrgens (1-10 µg/any) és suficient per produir la sensibilització en individus genèticament predisposats.¹⁸

Respecte a la dosi d'exposició, l'abundància relativa de certes proteïnes en la font al·lèrgica és un tret comú de molts antígens. No obstant això, algunes proteïnes presents en grans quantitats en múltiples plantes no han demostrat mai ser al·lèrgenes, mentre que altres poc abundants, com les proteïnes de transferència de lípids (LTPs), són al·lèrgens molt potents. Per tant, sembla que la quantitat de proteïna per ella mateixa no explica l'al·lergenicitat, i probablement la importància d'aquest factor és secundària respecte a l'estabilitat de la proteïna.¹⁹

S'han plantejat diverses hipòtesis sobre les propietats intrínseques dels al·lèrgens com a determinants de la seva al·lergenicitat, que inclouen la hipòtesi enzimàtica i la del mimetisme molecular.²⁰

La hipòtesi enzimàtica es va formular pel fet que les proteases (particularment les del grup I dels àcars de la pols domèstica), quan arriben per via inhalada, poden augmentar la permeabilitat local de la mucosa del tracte respiratori, contribuint així a l'al·lergenicitat. No obstant això, la majoria d'al·lèrgens no tenen cap activitat enzimàtica, i d'això se'n dedueix que no hi ha connexió obligatòria entre l'al·lergenicitat i activitat enzimàtica.²¹

La hipòtesi del mimetisme molecular postula que una vegada produïda una resposta al·lèrgica davant d'una proteïna estranya (al·lèrgens d'origen vegetal, insectes, fongs, etc.) és la similitud de seqüència total o parcial amb una altra proteïna, pròpia o no, la responsable de l'al·lèrgenicitat. Aquesta hipòtesi va ser formulada després d'observar-se que alguns al·lèrgens de mamífers (albúmines, etc.) són homòlegs a proteïnes endògenes.²²

No obstant això, la majoria d'al·lèrgens difereixen de les proteïnes homòlogues endògenes a nivell dels epítops IgE. Per exemple, la falta de reactivitat encreuada entre l'albúmina humana, que mostra una homologia del 82% amb l'albúmina de gos, indica que els epítops IgE de l'al·lèrgen no es troben en les zones d'homologia de les molècules endògenes.²⁰

Reactivitat encreuada

El fenomen de reactivitat encreuada (Rc), lligat al mimetisme molecular, ocorre quan anticossos IgE originalment produïts contra un al·lèrgen reconeixen una proteïna similar d'una altra font. Les proteïnes homòlogues presenten diferents graus d'identitat entre les seves seqüències d'aminoàcids, així com estructures tridimensionals similars que determinen la presència d'epítops comuns reconeguts per un mateix tipus d'anticòs. En general, es requereix que les proteïnes tinguin més d'un 70% d'identitat de seqüència per exhibir Rc. Quan la identitat és inferior al 50%, la Rc és molt poc freqüent.²³ No obstant això, les identitats de seqüència no sempre indiquen el grau de reactivitat encreuada, perquè la reactivitat encreuada també depèn de l'accessibilitat a la superfície molecular de l'anticòs. En les famílies de proteïnes en què la conservació de la seqüència i de la superfície molecular és alta, la reactivitat encreuada serà també alta.²⁴ La similitud entre elles ve regida, de forma freqüent, per la proximitat filogenètica de les espècies comparades. Així, si la reactivitat encreuada depèn de la similitud d'estructures, la probabilitat que aquestes proteïnes al·lèrgenes procedents de fonts biològiques diferents serà més alta quan més relacionades estiguin filogenèticament.²⁵ No obstant això, també es donen reaccions de Rc entre espècies molt distants filogenèticament, donada la presència de proteïnes ubiqües, altament conservades en l'evolució, que s'han denominat *panal·lèrgens*. El terme *panal·lèrgen* descriu la presència d'al·lèrgens amb potencial Rc en un ampli rang d'organismes taxonòmicament no relacionats.

Cal·licreïnes o serina-proteases

Hi ha diversos membres de la família de les cal·licreïnes que han adquirit una rellevància clínica important en els darrers anys, especialment com a biomarcadors de pronòstic en diversos càncers hormonodependents.²⁶ D'altra banda, a la base de dades

de l'Allergen Nomenclature Sub-committee of the International Union of Immunological Societies (<http://www.allergen.org>), també hi trobem 17 al·lèrgens descrits inclosos a la família de les cal·licreïnes pertanyents tant al regne animal com als fongs. Aquí s'hi inclouen al·lèrgens dels àcars de la pols, dels himenòpters, d'espècies de fongs i el PSA pertanyent al grup dels Homo sapiens (Taula I).²⁷

El grup de proteïnes de les serina-proteases pertanyen al MEROPS peptidasa família S1 (*Chymotrypsin family*, clan PA(S)) i a la peptidasa família S6 (Hap serina peptidases). Els al·lèrgens són secretats o bé directament o empaquetats en vesícules per secreció regulada.²⁸ Alguns membres de la família Hap (*Haemophilus adhesion and penetration*) juguen un paper important en la interacció amb cèl·lules epitelials humanes.

Alguns al·lèrgens de la família de la tripsina constitueixen tres grups d'al·lèrgens d'àcars i paneroles.²⁹ El grup 3 d'al·lèrgens d'àcars són tripsines i són els components majors de les femtes d'àcars. Les tripsines també es troben en les paneroles.³⁰ El grup 6 dels al·lèrgens d'àcars són quimotripsines i no presenten reactivitat encreuada amb al·lèrgens del grup 3. El grup 9 d'al·lèrgens té activitat col·lagenasa. Alguns al·lèrgens del grup de les proteïnes *tripsina-like* també es troben en verí d'insectes.³¹ L'al·lèrgen de gos Can f 5 és un al·lèrgen tipus arginina-esterasa que pertany a aquesta família de proteïnes. També hi pertany la trombina bovina que causa reaccions durant la cirurgia i l'hemodiàlisi.³²

Taula I Serina-proteases descrites com al·lèrgens

NOM	EXTRACTE	REGNE	RUTA D'EXPOSICIÓ
Api m 7	<i>Apis mellifera</i>	Animal	Pessigada
Blag Trypsin	<i>Blattella germanica</i>	Animal	Inhalació
Blo t 3	<i>Blomia tropicalis</i>	Animal	Inhalació
Blo t 6	<i>Blomia tropicalis</i>	Animal	Inhalació
Bom p 4	<i>Bombus pennsylvanicus</i>	Animal	Pessigada
Bosd Trhombin	<i>Bos domesticus</i>	Animal	Iatrogènia/Inhalació
Can f 5	<i>Cannis domesticus</i>	Animal	Inhalació
Cul n 11	<i>Culicoides nubeculosus</i>	Animal	Pessigada
Der f 3	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Animal	Inhalació
Der f 6	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Animal	Inhalació
Der p 3	<i>Dermatophagoides</i>	Animal	Inhalació

	<i>pteronyssinus</i>		
Der p 6	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Animal	Inhalació
Eur m 3	<i>Euroglyphus maynei</i>	Animal	Inhalació
Hom s PSA	<i>Homo sapiens</i>	Animal	Autoal·lergen/Iatrogènia
Pol d 4	<i>Polistes dominulus</i>	Animal	Pessigada
Str g Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	Bacteria	Inhalació
Tyr p 3	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Animal	Inhalació

La reacció al·lèrgica davant d'un antígen d'origen humà té sempre un interès biològic. El cos humà conté moltes proteïnes endògenes estructuralment relacionades amb altres proteïnes presents sobretot en mamífers, cosa que està molt ben documentada amb la família de les lipocalines i, davant d'aquest fet, el sistema immunitari ha d'adaptar-se a la seva presència. S'ha proposat que la resposta immune davant d'aquestes proteïnes endògenes que tenen una alta homologia amb proteïnes exògenes és la responsable de la reacció al·lèrgica en persones genèticament predisposades.^{33, 34, 35} El mateix mecanisme s'ha de poder aplicar a les cal·licreïnes que també tenen proteïnes endògenes en el cos humà.

Patologia al·lèrgica

Al·lèrgia respiratòria

Definició

L'al·lèrgia respiratòria engloba dues entitats (rinitis i asma), la característica primordial de les quals és la presència d'inflamació en la mucosa respiratòria (nasal i bronquial respectivament).

Fisiopatologia

El procés fisiopatològic de l'al·lèrgia respiratòria es pot subdividir en dues etapes. Durant la fase inicial, de sensibilització, la presentació de l'al·lèrgen induïx la formació d'anticossos de tipus IgE davant d'aquest per part dels limfòcits B; més endavant, en la fase clínica, apareixen els símptomes com a resposta a les reexposicions posteriors.

Fase de sensibilització: Després de l'exposició inicial, els al·lèrgens són processats per les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) i presentats als limfòcits T CD4+. Els limfòcits T activats alliberen citocines Th2, com ara IL-4, IL-5, i IL-13, i interaccionen amb els limfòcits B per induir la síntesi d'IgE específica, que aleshores queda unida a la superfície dels mastòcits.

Fase de malaltia clínica: La fase de malaltia clínica es subdivideix a la vegada en dues etapes: una de precoç i una de tardana.

La fase precoç ocorre minuts després de l'exposició a l'al·lèrgen i depèn en gran part de la mediació dels mastòcits. La reexposició a l'al·lèrgen provoca la unió encreuada de dues molècules IgE que estan fixades a la superfície dels mastòcits adjacents, cosa que produeix la degranulació amb el consegüent alliberament de mediadors preformats, histamina i triptasa, i la síntesi *de novo* de mediadors com els cisteinil leucotriens i la prostaglandina D2 (PGD2). Aquests mediadors provoquen la característica rinorrea aquosa a través dels seus efectes d'estimulació de la secreció de les glàndules i de les cèl·lules calciformes, de vasodilatació, i d'inducció del filtrat de líquid a través de la paret vascular. Amb la dilatació vascular i l'acumulació de sang als sinusoides cavernosos s'adquireix un cert grau de congestió nasal durant la fase precoç. L'estimulació dels nervis sensitius induïx picor i activa el reflex de l'esternut (Figura 2).

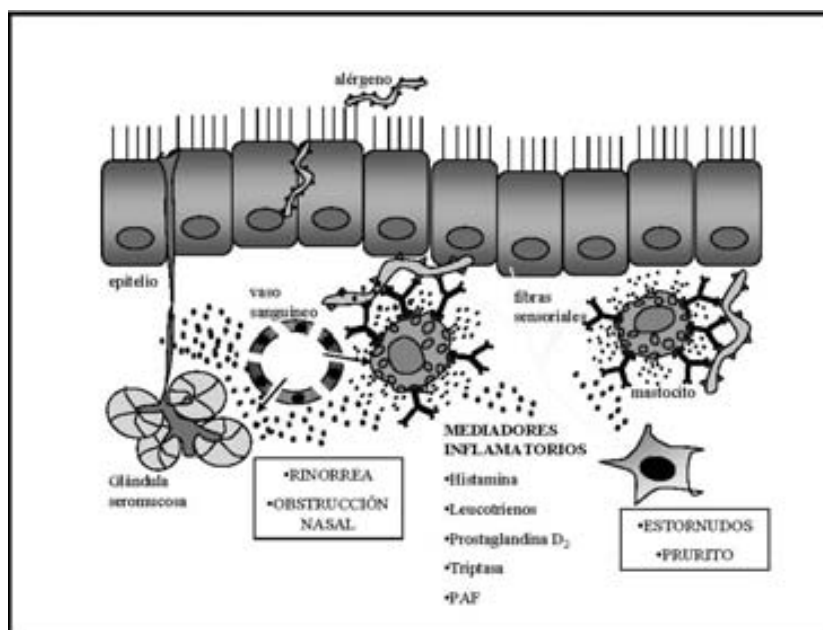


Figura 2 Fisiopatologia de la RA. Fase precoç (Extret de la tesi doctoral de la Dra. Olga Luengo).

Després de la fase inicial ve una fase tardana que ocorre a les 4-6 hores de l'estimulació per l'antigen que es caracteritza per una prolongació dels símptomes (predominantment congestió nasal) que dura entre 18 i 24 hores. Aquesta resposta és de naturalesa inflamatòria i es caracteritza per la infiltració de la mucosa nasal per eosinòfils, macròfags i limfòcits T activats. La clau de l'orquestració de la resposta tardana resideix en la producció i l'alliberament de citocines i quimiocines com IL-4 i IL-13 pels limfòcits T i mastòcits, i això resulta en un augment de la seva expressió.

Rinoconjuntivitis al·lèrgica

La rinitis al·lèrgica (RA) es defineix com una malaltia inflamatòria de la mucosa nasal vehiculada per IgE.⁸

Clínicament es manifesta amb esternuts, pruíja i congestió nasal, que es produeixen de manera aïllada o conjunta, i freqüentment ve acompanyada d'afectació ocular, en forma de pruíja i llagimeig i afectació laríngia.

Epidemiologia

De tots els trastorns al·lèrgics, la rinitis és el més freqüent, ja que afecta fins a un 30% de la població mundial³⁶, amb una prevalença entre dues i tres vegades superior a la de l'asma. Segons l'Estudi de factors epidemiològics, clínics i socioeconòmics de les malalties al·lèrgiques a Espanya, 2005 (Alergológica 2005), la rinoconjuntivitis és el primer motiu de visita a les consultes d'al·lèrgia: un 55% dels casos. Així, un de cada dos

pacients que s'atén per primera vegada a les consultes d'al·lèrgologia hi va perquè presenta rinoconjuntivitis. Aquestes xifres dupliquen les de l'asma bronquial, que és el segon motiu de consulta (28%). Respecte a la prevalença de la RA en funció de la classificació proposada pel grup de treball ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma), les dades varien en funció dels estudis, però de manera global, la rinitis al·lèrgica persistent suposa un terç del global de les RA.^{37,38}

Barchau i Durham³⁹ varen publicar el 2004 els resultats d'un estudi multicèntric sobre la prevalença de la RA a Europa, essent la prevalença global de rinitis al·lèrgica del 23%, i del 21,5% en la població espanyola. Una de les dades més rellevants d'aquest estudi epidemiològic europeu sobre la prevalença de la RA va ser que el 45% dels pacients en què es va confirmar la presència de la RA no havien estat mai estudiats prèviament i, per tant, estaven sense diagnosticar. A més de ser una malaltia infradiagnosticada, la RA és també una malaltia infratractada, com revela un estudi europeu en què s'observa que el 52,6% dels pacients afectats de RA no havien visitat mai un especialista en el darrer any i un 26% no realitzava cap tractament per a la malaltia.⁴⁰

Classificació

Des de l'any 2002 està vigent una classificació de la rinitis al·lèrgica proposada pel grup de treball ARIA, que utilitza les expressions "intermitent" i "persistent" per descriure la duració de la malaltia. D'altra banda, també estableix una divisió en casos "lleus" o "moderats-greus" segons la clínica i l'afectació de la qualitat de vida.⁴¹

Classificació de la RA segons ARIA:

Intermitent: els símptomes estan presents quatre dies a la setmana o menys, o com a màxim quatre setmanes.

Persistent: els símptomes estan presents més de quatre dies a la setmana i més de quatre setmanes.

Lleu: indica que no compleix amb cap de les següents característiques:

- a) Alteracions del son;
- b) Interferència a les activitats de la vida diària, lúdiques o esportives;
- c) Interferència a la feina o l'escola;
- d) Síntomes molestos.

Moderada-greu: està present una o més de les següents característiques:

- a) Alteracions del son;
- b) Interferència a les activitats de la vida diària, lúdiques o esportives;

- c) Interferència a la feina o l'escola;
- d) Síntomes molestos.

Recentment s'ha proposat un nou criteri per discriminar entre la RA moderada i greu, en funció del nombre d'ítems de gravetat de la classificació d'ARIA que afectin el pacient: la RA moderada seria aquella en què estan presents 1, 2 o 3 dels ítems de gravetat i la greu seria la que presenta els 4 ítems.⁴²

Etiologia

Segons les dades que es desprenen de l'estudi Alergológica 2005,⁴³ els pol·lens són els al·lèrgens causants més freqüents de la RA, seguits dels àcars, els epitelis d'animals i els fongs (Figura 3).

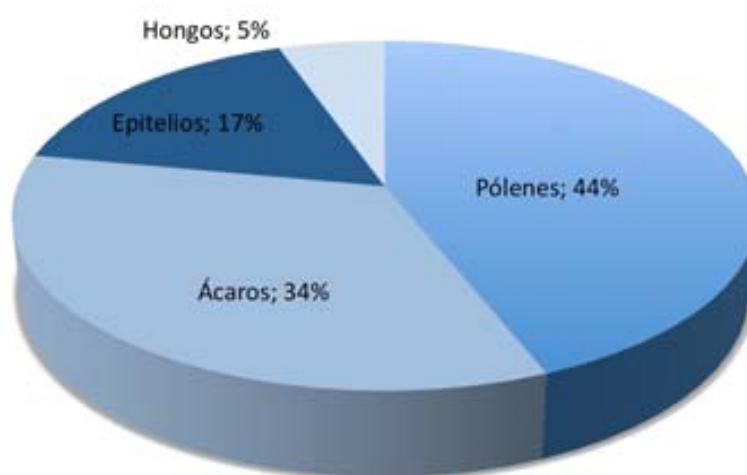


Figura 3 Etiologia de la RA segons Alergológica 2005

En l'anàlisi per Comunitats Autònomes, els àcars són la primera causa de la RA a Catalunya (48,6%), seguits pels pol·lens (41,4%) i els epitelis (23,8%). A més, es destaca de forma global que el 31,2% dels pacients estaven polisensibilitzats.

Asma al·lèrgic

L'asma al·lèrgic és la inflamació crònica de la via aèria en què algunes cèl·lules i mediadors (limfòcits Th2, eosinòfils, mastòcits) realitzen un paper destacat. Aquest procés s'associa a una hiperresposta dels bronquis que produeix episodis de sibilacions, dispnea, dolor toràcic i tos. Aquests episodis s'associen generalment amb un major o menor grau d'obstrucció del flux aeri, sovint reversible de forma espontània o amb

tractament.⁴⁴ L'espectre clínic de l'asma és altament variable i se n'han observat diversos patrons, però la inflamació aèria és una característica que sempre hi és.

Epidemiologia

L'asma és un problema de salut global que ha anat en augment en les últimes dècades. Presenta una gran variabilitat geogràfica però és més freqüent en els països desenvolupats. La prevalença estimada en nens se situa entre l'1 i el 38% d'acord amb la zona geogràfica.^{45,46} En els adults, les dades són menys fiables a causa de la freqüent superposició amb la malaltia pulmonar obstructiva crònica però la prevalença varia entre el 2 i el 12%.⁴⁷

Classificació

Antigament es classificava l'asma segons la gravetat determinada per la presència de símptomes, el grau d'obstrucció aèria i la funció pulmonar. La classificació era la següent: intermitent, lleu-persistent, moderat-persistent i greu-persistent. Com que l'asma és una patologia dinàmica la gravetat de la qual va canviant segons el control que se'n fa, actualment aquesta classificació no es considera vàlida. Avui es classifica l'asma en diversos nivells de control (controlat, parcialment controlat i no controlat) segons la presència de símptomes, la limitació de l'activitat diària, els despertars nocturns, la necessitat de tractament de rescat i el FEV1.

Taula II Classificació de la gravetat de l'asma en adults segons el grup Global Initiative for Asthma (última actualització: desembre de 2010)

	Intermitent	Persistent-lleu	Persistent-moderada	Persistent-greu
Símptomes diürns	No (<2 dies a la setmana)	>2 dies a la setmana	Símptomes diaris	Símptomes continus (diverses vegades al dia)
Medicació simptomàtica	No (<2 dies a la setmana)	>2 dies a la setmana però no diari	Cada dia	Diverses vegades al dia
Símptomes nocturns	Cap	Una mica	Bastant	Freqüents
Funció pulmonar (FEV1 o PEF) % teòric	>80%	>80%	>60%-<90%	<60%
Exacerbacions	Cap	Una o cap a l'any	Dues o més a l'any	Dues o més a l'any

FEV1: Volum expiratori forçat durant el primer segon

PEF: Flux expiratori màxim

Etiologia

S'han identificat múltiples factors relacionats amb el risc de desenvolupar asma al·lèrgic. Entre aquests factors, la predisposició genètica és un condicionament important. Aproximadament un 10% dels nens sense herència d'atòpia desenvolupen alguna manifestació al·lèrgica, però quan un dels progenitors o un germà major és atòpic, el risc de desenvolupar malalties al·lèrgiques s'eleva a un 20-30%, i si els dos progenitors són atòpics, la probabilitat és del 50%.⁴⁸ No obstant això, el desenvolupament de la malaltia al·lèrgica està condicionat per altres factors com les característiques de l'al·lèrgen i pel grau d'exposició a l'al·lèrgen.^{49,50}

S'ha demostrat que, com més gran és l'exposició al·lèrgògena, més alta és la probabilitat de sensibilització. S'ha descrit en nens d'edat preescolar que l'exposició a nivells alts d'al·lèrgens durant la primera infància augmenta el risc de sensibilització al·lèrgica.⁵¹ Aquest risc també s'ha observat en nens durant l'edat escolar, cosa que suggereix que l'efecte de la concentració al·lèrgògena es perllonga més enllà de la primera infància.^{52,53} En un interessant estudi, Kihlstrom i Cols⁵⁴, varen descriure l'efecte de la concentració de pol·len sobre el desenvolupament de l'asma i les al·lèrgies, en una cohort de pacients nascuts a Estocolm (Suècia) durant la primavera de 1993, als quals se'ls va fer un seguiment durant 5 anys. Durant la primavera de reclutament, els nivells de pol·len de bedoll van ser 10 vegades més alts que el 1992 i 50 vegades més alts que el 1994. En finalitzar els 5 anys de seguiment, els investigadors varen trobar una prevalença d'asma del 12,2% en el grup d'estudi comparat amb el 5,1% en aquells nascuts el 1994, cosa que suggereix la importància de la intensitat de l'exposició al·lèrgògena en el desenvolupament de l'asma. No obstant això, aquesta hipòtesi no està del tot confirmada i fins i tot és discutida per alguns autors.

La rinitis al·lèrgica és un factor de risc que incrementa la freqüència d'asma per exposició al pol·len i altres al·lèrgens. Linnenberg i Cols⁵⁵, varen trobar una prevalença d'asma del 14,1% en pacients amb rinitis pol·línica, i de l'1,8% en aquells sense patologia nasal, essent la prevalença més elevada en pacients amb rinitis perenne per al·lèrgia a àcars o epitelis que en els pol·línics. Casasnovas i Cols⁵⁶ descriuen una freqüència de símptomes bronquials entre el 33 i el 57% dels pacients amb rinitis per pol·lens, que són més freqüents en el subgrup de pacients que varen iniciar la rinitis abans dels 18 anys.

Les exposicions al·lèrgògenes més intenses es relacionen amb un major grau d'obstrucció bronquial,⁵⁷ i encara que els símptomes poden ser més intensos en l'asma estacional desenvolupat per pol·lens, l'alteració dels paràmetres d'obstrucció bronquial és major en l'asma degut a una exposició al·lèrgògena persistent.⁵⁸

És probable que el desenvolupament d'asma en pacients genèticament susceptibles pugui explicar-se per la interacció de tres factors: les característiques pròpies de l'al·lergen, la naturalesa de l'exposició al·lèrgica i el grau de penetració dels al·lèrgens en l'arbre bronquial.

Rinitis i asma: una via aèria, una malaltia

Diversos estudis epidemiològics han demostrat clarament que la rinitis i l'asma coexisteixen freqüentment.^{59,60} La majoria de pacients amb asma tenen rinitis, que es presenta en més del 75% dels pacients amb asma al·lèrgic, i en més del 80% d'aquells amb asma no al·lèrgic. No obstant això, en moltes ocasions el pacient només refereix els símptomes que més el preocupen o el molesten, que en la majoria dels casos són les manifestacions bronquials. En aquest sentit, Gaga et al,⁶¹ varen constatar la presència d'inflamació nasal en un grup de pacients asmàtics que negava la presència de símptomes de rinitis. És a dir, encara que els pacients es considerin lliures de símptomes, quasi sempre es demostra la presència d'afectació nasal.

D'altra banda, la prevalença d'asma en pacients amb rinitis varia entre un 15 i un 40%, i cal destacar el fet que, en aquells amb rinitis intermitent (estacional), l'asma es presenta del 10 al 15% dels casos, mentre que en aquells amb rinitis greu persistent, es presenta del 25 al 40%. La mucosa nasal i la bronquial presenten moltes similituds i són una de les característiques més importants de la complementarietat funcional. Així, la unitat tròfica epitel·li-mesenquima existeix des del nas fins a la unió broncoalveolar i les mateixes cèl·lules inflamatòries estan presents per tot l'epitel·li, suggerint un contínuum inflamatori. D'altra banda, l'origen embrionari del nas i de les vies respiratòries baixes no és el mateix, i això pot explicar algunes de les diferències entre ambdues mucoses. Basant-se en estudis publicats en els darrers anys, la WHO workshop (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) recomana avaluar l'asma a qualsevol pacient amb rinitis i viceversa, així com plantejar una estratègia de tractament combinada per tractar ambdues vies respiratòries.⁶²

Anafilaxi

Definició

No existeix una definició d'anafilaxi universalment admesa, ni tampoc criteris clars per al diagnòstic de la malaltia, i això condueix amb freqüència a confusió, tant en el diagnòstic com en el tractament.⁶³ La European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) defineix l'anafilaxi com la reacció d'hipersensibilitat generalitzada o sistèmica greu que amenaça la vida.⁶⁴ La guia GALAXIA considera que l'anafilaxi és una reacció al·lèrgica greu d'instauració ràpida i potencialment mortal.⁶⁵

Des del punt de vista clínic, es tracta d'un síndrome complex, desencadenat per mecanismes immunològics o no, amb aparició de símptomes i signes suggestius d'alliberació generalitzada de mediadors de mastòcits i basòfils tant a nivell cutani (eritema, pruíja generalitzada, urticària o angioedema) com en altres òrgans (gastrointestinal, respiratori o cardiovascular). Per a alguns autors resulta discutible el diagnòstic d'anafilaxi en pacients amb urticària i símptomes d'afectació d'altres òrgans si no està associada a hipotensió ni a obstrucció de la via aèria alta o baixa.⁶⁶

Epidemiologia

Tenim poques dades sobre la incidència de l'anafilaxi en la població general, i les que hi ha són difícilment comparables per la gran variabilitat de criteris de selecció de pacients, poblacions diana i la falta d'una definició universalment acceptada d'anafilaxi.⁶⁷ Sembla clar, però, que és una patologia pobrament reconeguda i tractada de forma inadequada en moltes ocasions.

La majoria dels articles indiquen xifres d'incidència entre el 3,2 i el 30 per 100.000 persones/any, amb una mortalitat d'entre el 0,05 i el 2% del total de reaccions.^{64,65,68} Als EUA es descriuen uns 100.000 episodis a l'any i almenys un 1% és mortal.⁶⁹

Centrant-nos en les reaccions més greus (les catalogades com a xoc anafilàctic) la incidència varia entre el 3,2 i el 10 per 100.000 persones/any⁷⁰, amb una mortalitat que arriba fins al 6,5%, molt superior a la de les reaccions anafilàctiques en general.⁷¹

Causes d'anafilaxi

Les causes més freqüents d'anafilaxi són els aliments, els fàrmacs i les picades d'himenòpters, que ocupen els primers llocs en la majoria de sèries publicades.^{72,73,74,75} La importància relativa de cadascuna de les causes varia considerablement en funció de l'edat; així, els aliments són la causa més important en la infància i els fàrmacs són els més freqüents en adults (Taula III).

Taula III Causes d'anafilaxi (Adaptat de *Guía de Actuación en AnafilAXIA: GALAXIA*)

Causas d'anafilaxi	
Fàrmacs i medis de contrast	46,7-62%
Aliments	22,6-24,1%
Picades d'insectes	8,6-13,9%
Factors físics	3,4-4%
Altres (inclou el làtex)	7,26%
Idiopàtica	3,45%

Segons l'edat, els aliments més freqüentment implicats són:^{72,76}

En adults: fruites, fruits secs, marisc i peix.

En nens: ou, llet, fruits secs, peix i marisc.

Els fàrmacs més freqüentment implicats en reaccions anafilàctiques són els antibiòtics betalactàmics, antiinflamatoris no esteroideus, altres agents infecciosos no betalactàmics i medis de contrast iodat.⁷⁷ El làtex constitueix una causa important en el medi hospitalari.

Diagnòstic d'anafilaxi

a) Sospita clínica

S'ha de sospitar una anafilaxi quan apareix de manera aguda (en minuts o poques hores) un síndrome ràpidament progressiu que afecta pell o mucoses i que s'acompanya de compromís respiratori o circulatori (Taula IV, criteri 1).⁶⁴ Com que la majoria d'anafilaxis es presenten amb símptomes cutanis (>80%), amb aquest criteri, almenys un 80% de les anafilaxis serien identificades; no obstant això, es donen presentacions menys típiques que no quedarien incloses, com el cas de les anafilaxis que no manifesten afectació cutània (fins a un 20%) o de les que es presenten exclusivament amb hipotensió. També s'ha descrit que les anafilaxis que cursen amb manifestacions digestives s'associen amb una major gravetat.^{77,78} Quan existeix afectació cardiovascular amb hipotensió es parla de xoc anafilàctic. També cal tenir en compte que la concurrència d'una exposició a un al·lergen conegut o no pel pacient ajuda al diagnòstic. Per tot això, s'han establert els criteris 2 i 3 de sospita (Taula IV). Amb aquests criteris s'espera identificar més del 95% de les anafilaxis, però calen més estudis prospectius multicèntrics per establir-ne la sensibilitat.

La dificultat en el diagnòstic d'anafilaxi és que no hi ha un grup de símptomes o signes patognòmics; el que sí que és típic és la ràpida progressió en la gravetat o intensitat dels símptomes i això és vàlid tant per a nens com adults.

Taula IV Criteris clínics per al diagnòstic d'anafilaxi (Adaptat de Sampson HA et al.)⁶³

Criteris clínics per al diagnòstic d'anafilaxi
L'anafilaxi és molt probable quan es compleix un dels tres criteris següents:
Inici agut (minuts o hores) d'una síndrome que afecta la pell o les mucoses (urticària generalitzada, pruija, eritema, enrojolament (<i>flushing</i>), edema de llavis, úvula o llengua) juntament amb un dels següents: Compromís respiratori Disminució de la TA o símptomes associats a disfunció orgànica
Aparició ràpida (minuts o hores) de dos o més dels següents símptomes: Afectació de la pell o les mucoses Compromís respiratori Disminució de la TA o símptomes associats a disfunció orgànica Símptomes gastrointestinals persistents
Disminució de la TA en minuts o algunes hores després de l'exposició a algun al·lergen conegut per aquest pacient: Lactants i nens: TA baixa o descens superior al 30% de la TA sistòlica Adults: TA sistòlica inferior a 90 mm HG o descens superior al 30% sobre la basal

b) Avaluació de la gravetat de la reacció

La gravetat de l'anafilaxi es relaciona amb la rapidesa en la progressió dels símptomes, el tipus d'antigen i la seva via d'entrada i amb els òrgans afectats. Els factors relacionats amb el pacient, com l'edat avançada (excepte en les anafilaxis per aliments), la presència de patologia respiratòria (asma) o cardiovascular associada, el tractament amb IECA o betabloquejants, o una mastocitosi de base s'han associat amb reaccions greus i de major mortalitat.^{79, 80, 81, 82, 83}

Les anafilaxis més greus són les que es presenten amb hipòxia, hipotensió i compromís neurològic. És, per tant, fonamental en l'avaluació immediata del pacient amb anafilaxi seguir els protocols ABCDE que permeten avaluar la situació respiratòria, cardiovascular i l'estat de consciència del pacient.⁸⁴

Diagnòstic diferencial

Generalment el diagnòstic d'anafilaxi és fàcil de sospitar, especialment si hi ha manifestacions cutànies i l'antecedent d'administració d'un fàrmac o l'exposició a un

al·lergen. Però, quan falten les manifestacions cutànies, o es produeix un col·lapse vascular aïllat i no es pot obtenir la identificació de l'exposició al·lèrgica per anamnesi, l'anafilaxi es pot confondre amb altres malalties amb afectació cardiovascular o respiratòria (Taula V).

Taula V Diagnòstic diferencial d'anafilaxi (Adaptat de *Guía de Actuación en Anafilaxia*. GALAXIA)

Diagnòstic diferencial de l'anafilaxi:
Urticària-angioedema: urticària idiopàtica, dèficit C1 inhibidor, angioedema per IECAS.
Malalties que simulen edema de vies respiratòries altes: reaccions distòniques per metoclopramida, proclorperazina, antihistamínics, RGE.
Síndromes que cursen amb eritema o enrojolament (<i>flushing</i>): carcinoide, postmenopàusic, induït per l'alcohol, carcinoma medul·lar de tiroide, vipomes, síndrome de l'home vermell.
Síndromes neurològiques: epilèpsia, accident cerebrovascular.
Altres causes de xoc: sèptic, cardiogènic, hemorràgic.
Destret respiratori agut: asma, embolisme pulmonar agut, crisi de pànic, globus histèric, laringoespasma, disfunció de cordes vocals.
Miscel·lània: reaccions vasovagals, escombroidosi, síndrome del restaurant xinès, sulfits, malaltia del sèrum, feocromocitoma, síndrome d'hipermeabilitat capil·lar generalitzat.

Proves de laboratori

Les proves de laboratori disponibles per ajudar al diagnòstic clínic d'anafilaxi són els nivells plasmàtics d'histamina i de triptasa basal. Fins i tot en les condicions més òptimes de recollida de les mostres, els nivells d'histamina i triptasa poden ser normals; això no és infreqüent en l'anafilaxi per aliments. En aquest cas sembla que la implicació dels basòfils en la reacció és més important que la dels mastòcits.^{64, 85}

Els nivells d'histamina en sang assoleixen un pic al cap de 5-10 minuts de l'inici dels símptomes d'anafilaxi i disminueixen als 60 minuts com a conseqüència del seu ràpid metabolisme pels enzims *N*-metiltransferasa i la diaminooxidasa, el que fa pràcticament impossible la seva utilització en la pràctica clínica. Els nivells elevats d'histamina es correlacionen amb la clínica d'anafilaxi millor que la triptasa sèrica. La medicació d'un metabòlit de l'histamina en una mostra d'orina de 24 hores pot ser d'utilitat.⁸⁶

Actualment la medicació de triptasa sèrica és la prova més útil per al diagnòstic d'anafilaxi. S'ha de sol·licitar de forma obligada davant la sospita d'anafilaxi, de forma similar a com es realitza una corba enzimàtica davant la sospita d'un infart de miocardi. Pot comprovar-se en mostres obtingudes entre els 15 i 180 minuts posteriors a l'inici dels símptomes. S'aconsella l'extracció de tres mostres seriades (millora la sensibilitat i especificitat):⁸⁷

- **1a mostra:** després de la instauració del tractament.
- **2a mostra:** a les 2 hores de l'inici de la crisi.
- **3a mostra:** a les 24 hores per tenir un nivell basal del pacient, ja que pot tornar a valors normals entre les 6 i les 9 hores després de la reacció.

La concentració normal de triptasa total en sèrum o plasma determinada mitjançant fluoroenzimimmunoanàlisis (UniCAP, Phadia) és inferior a 13,5 µg/l (segons les indicacions del fabricant). Una elevació igual o superior a dues vegades el valor basal és suggestiu d'anafilaxi.⁸⁸ No obstant això, la no elevació de la triptasa no descarta l'anafilaxi. Si la triptasa basal és superior a 20 µg/l, s'ha de descartar mastocitosi associada a anafilaxi.^{89, 90}

També s'ha descrit l'augment del leucotriè E₄ (LT₄) en orina en les primeres tres hores de l'anafilaxi, i és detectable durant les 6 hores posteriors.⁹¹

En un futur, la possibilitat d'usar medicacions d'altres marcadors d'activitat de mastòcits i basòfils com la β-triptasa madura, la carboxipeptidasa A3 del mastòcit, cinases, PAF, o un panell d'aquests marcadors en conjunt podrà ser d'utilitat.^{90,92}

Tractament

L'èxit en el tractament d'una reacció anafilàctica depèn de diversos factors: la preparació del personal que atén el pacient, el reconeixement precoç de la reacció i el tractament precoç i agressiu.⁶⁴ Els principis bàsics de tractament són els mateixos per a tots els grups d'edat.

REACCIÓ ANAFILÀCTICA

Introducció

Reconeixement precoç dels símptomes: 80% símptomes cutanis. Altres: respiratoris, gastrointestinals, cardiovasculars, neurològics.

Signes d'alarma: ràpida progressió dels símptomes, *distress* respiratori (taquipnea, hipoxèmia, cianosi), broncospasme (sibilació), edema laringi (afonia, sialorrea, estridor), vòmits persistents, hipotensió, arrítmies, síncope, confusió, somnolència, coma.

Valorar permeabilitat de la via aèria, respiració, estat cardiocirculatori

Medi extrahospitalari:
Sol·licitar ajuda (Tel. 112).
Eliminar exposició al lergen (medicaments, aliments, picades).

ADRENALINA IM

Valorar intubació, traqueotomia o cricotirotomia i ventilació mecànica si estridor marcat o aturada respiratòria.
Iniciar suport vital.

Medi intrahospitalari:
Estabilitzar via aèria.
Administrar O₂ alt flux (6-8 bpm al 100%).
Assegurar accessos venosos de gran calibre (14-16G).
Reposició de fluids.
Monitorització contínua (FC, TA, SatO₂, diuresi)

Teràpia adjuvant:
Salbutamol inhalat o nebulitzat si broncospasme.
Dexclorfeniramina (Polaramine®): 5-10 mg/8h si símptomes cutanis.
Corticoides IV: hidrocortisona 250mg/6h o metilprednisolona 1-2mg/Kg IV.

Símptomes refractaris

REPETIR DOSI ADRENALINA IM.
Iniciar perfusió adrenalina IV.
Glucagó si tractament amb betabloquejants.
Atropina si bradicàrdia prolongada.
Vasopressors (dopamina, NA) si hipotensió refractària.

Figura 4 Algorisme d'actuació general en anafilaxi (Adaptat de *Guía de Actuación en AnafilAXIA: GALAXIA*)

Al·lèrgia al líquid seminal

Definició

L'al·lèrgia al líquid seminal es defineix com una reacció immunològica davant de proteïnes presents en el líquid seminal. Clínicament es pot manifestar amb un ventall molt ampli de símptomes, tant sistèmics com locals.^{93, 94} Les dones que presenten hipersensibilitat al líquid seminal humà de forma sistèmica presenten símptomes com urticària, angioedema facial, de llengua, llavis i fins i tot de la gola amb o sense estridor, sibilacions amb dispnea, nàusees, vòmits i diarrees i, en casos excepcionals, hipotensió, pèrdua de coneixement i col·lapse circulatori que pot comprometre la vida de la pacient. Aquests símptomes sistèmics poden aparèixer associats a símptomes locals (com dolor a nivell pèlvic o vulvovaginal) o no.⁹⁵ Les dones amb hipersensibilitat al líquid seminal de forma local presenten símptomes limitats a la zona pèlvica i vulvovaginal, que consisteixen en dolor postcoital immediat, edema, cremor i fins i tot formació de vesícules. Habitualment els símptomes es resolen en menys de 24 hores però en alguns casos la urticària i el dolor vulvovaginal poden persistir dies i fins i tot setmanes. En base a aquest espectre de símptomes, la hipersensibilitat al líquid seminal humà es divideix en sistèmica o localitzada.^{96,97}

Epidemiologia

L'al·lèrgia al líquid seminal humà (HSPA) en dones és infreqüent, i tant la seva incidència com la seva prevalença en dones és encara desconeguda. La primera descripció del fenomen la va realitzar l'any 1958 un ginecòleg holandès, L.H. Specken. Des d'aleshores i fins a la darrera revisió exhaustiva del fenomen l'any 2004⁹³ s'havien descrit 80 casos en literatura mèdica en llengua anglesa. A Nord-amèrica s'ha realitzat un qüestionari per avaluar la freqüència del fenomen. El qüestionari inclou preguntes referents a l'edat de les dones, símptomes, durada dels símptomes, nombre de parelles sexuals, temps de latència de l'aparició dels símptomes des del primer coit, exploracions ginecològiques recents i història personal i familiar d'atòpia. Es va distribuir a 1.073 dones amb símptomes compatibles amb una hipersensibilitat al líquid seminal humà. El trastorn es considerava "possible" quan les dones presentaven 2 o més símptomes locals o sistèmics i "probable" quan els símptomes presentats, tant locals com sistèmics, desapareixien amb l'ús de preservatiu. 88 de les 1.073 dones avaluades presentaven HSPA "probable" (8%). Els autors refereixen que si es pogués extrapolar aquest resultat a la població general caldria esperar una prevalença als EUA d'entre 20.000 i 40.000 dones amb HSPA.⁹⁸

La tercera dècada de la vida és el període més freqüent d'aparició d'aquest trastorn. En el 40% de les pacients amb al·lèrgia al líquid seminal, els símptomes s'inicien durant o just immediatament després de la primera relació sexual. El símptomes solen ocórrer durant o immediatament després del coit i s'observa una reducció gradual del temps de latència d'aparició dels símptomes, així com una exacerbació de la severitat dels símptomes a mesura que transcorre el temps. El mecanisme etiopatogènic més comú és una resposta IgE vehiculada però també s'han descrit reaccions de tipus III i IV. Tant els símptomes locals com sistèmics es poden evitar amb l'ús de preservatiu. L'atòpia és més freqüent entre els trastorns sistèmics que els locals i sembla ser un factor predisposant important per a aquest infreqüent trastorn.⁹⁹

Al·lèrgens

Hi ha controvèrsia sobre quin dels al·lèrgens del líquid seminal és el més freqüentment implicat. A principis de 2006, Weidinger i col·laboradors varen publicar un cas on demostraven la presència d'anticossos IgE-específics davant de l'antigen prostàtic específic (PSA) en el sèrum d'una dona amb al·lèrgia al líquid seminal.¹⁰⁰

De totes maneres, hi ha molts casos clínics publicats en què es descriu l'al·lèrgen implicat, tot i que no hi ha informació sòlida sobre la seva caracterització precisa ni el seu origen. El pes molecular dels al·lèrgens descrits oscil·la entre 12 i 75 kDa. Per tant, tot i que recentment s'ha proposat el PSA d'origen prostàtic com a al·lèrgen majoritari, hi pot haver altres proteïnes del líquid seminal implicades, ja que el líquid seminal conté moltes proteïnes, tant al·lèrgògenes com no. Malgrat els avenços tecnològics dels últims anys, només algunes de les moltes proteïnes presents en el líquid seminal han estat caracteritzades. S'ha realitzat una àmplia anàlisi dels pèptids i components proteics del líquid seminal humà mitjançant la combinació d'electroforesi en gel (1-dimensional i 2-dimensional) amb *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF), espectrometria de masses (MS), electroesprai ionització (ESI), líquid cromatografia / tàndem espectrometria de masses (LC/MS/MS), i cerca en bases de dades. La majoria de proteïnes detectades han estat identificades com a formes modificades del PSA; fosfatasa àcida prostàtica, Zn- α -2-glicoproteïna, clusterina, semenogelina I i semenogelina II.¹⁰¹

Amb l'elevada proporció de dones que experimenten símptomes d'HSPA després del primer contacte amb el semen (40%) s'ha suggerit la possibilitat que hi hagi al·lèrgens de reactivitat encreuada. La hipòtesi que l'agent sensibilitzant sigui un al·lèrgen desconegut que tingui reactivitat encreuada amb el líquid seminal ja havia estat proposada per Halpern i col·laboradors molts anys enrere, però fins ara no havia estat demostrada.¹⁰²

Un altre punt obscur del trastorn és la incertesa de si les manifestacions clíniques ocorren només amb una sola parella sexual o si, contràriament, les dones afectades presentarien problemes clínicament rellevants amb el contacte amb semen d'homes diferents. Ambdues situacions han estat descrites però, en molts casos clínics publicats, aquesta informació no hi consta.

Diagnòstic i diagnòstic diferencial

El diagnòstic diferencial d'HSPA ha d'incloure totes aquelles entitats que puguin causar símptomes sistèmics i locals: malalties de transmissió sexual (tant virus com bacteries), vulvovaginitis al·lèrgiques estacionals, al·lèrgia al làtex, dermatitis de contacte, exercici, urticària física per vibració, transmissió d'aliments o fàrmacs a través de fluids corporals cap a una parella sensible a aquestes proteïnes o metabòlits i factors físics com ara microtraumatismes que puguin causar disparèunia.

El primer pas per al diagnòstic d'una al·lèrgia al líquid seminal humà és una anamnesi detallada. Es recomana també realitzar anàlisis de sang tant a la pacient com a la seva parella per descartar malalties de transmissió sexual que puguin simular un quadre d'HSPA. Altres trastorns, com la vulvovaginitis crònica infecciosa, s'han de descartar mitjançant la realització de cultius vaginals i cervicals.

Per realitzar l'estudi immunoal·lèrgic pròpiament cal una mostra d'ejaculació fresca de la parella de la pacient. Aquest es liqua a temperatura ambient durant 30 minuts i posteriorment se centrifuga a 5000 g per separar els espermatozous del líquid seminal. El sobrenedant que conté les proteïnes del líquid seminal s'usa per realitzar els *prick tests*. Es recomana també realitzar el *prick test* a la parella per assegurar que no és irritant. Hi ha preparats comercials per testar proteïnes de líquid seminal però es desconeix tant el valor predictiu positiu com negatiu de la prova. El *prick test* amb el líquid seminal de la parella amb la confirmació per tests serològics d'IgE específica davant de proteïnes del líquid seminal té un valor predictiu molt alt de la resposta als tests de dessensibilització. Hi ha molts casos, però, en què s'observa discordança entre els *prick tests* i els tests serològics, especialment en les formes locals del trastorn.¹⁰³

Tractament

El trastorn és evitable amb l'ús de mètodes de barrera com preservatius però les dones afectades d'HSPA presenten estrès i ansietat que moltes vegades porten al deteriorament de les relacions interpersonals pel fet de no poder tenir relacions sexuals no protegides i que l'ús d'aquests mètodes no permet la concepció.

S'han assajat diversos tractaments per pal·liar els símptomes d'aquest trastorn. L'ús d'antihistamínics preventivament 30-60 minuts abans del coit evita els símptomes en determinats casos. També l'ús d'antiinflamatoris no esteroideus (AINES) 30 minuts abans del coit ha pal·liat els símptomes en determinades dones. Això suggereix que els prostanoids hi poden estar implicats en alguns casos.

El tractament de l'al·lèrgia al líquid seminal humà contempla dos punts: d'una banda, el tractament del trastorn al·lèrgic amb la finalitat que la dona pugui mantenir relacions sexuals desprotegides sense presentar cap símptoma i, de l'altra, resoldre la incapacitat de concebre espontàniament perquè no pot entrar en contacte directe amb el semen.

El 1981, Shapiro et al. varen publicar el primer cas d'inducció de l'embaràs després d'inseminació artificial en una pacient amb HSPA.¹⁰⁴ Iwashashi et al. van publicar un altre cas, en el qual es va emprar esperma sense les proteïnes del líquid seminal per a la inseminació artificial.¹⁰⁵ En ambdós casos van caldre més de 4 cicles d'inseminació artificial per aconseguir la gestació.

Ja el 1967, Halpern et al. varen assajar per primer cop la immunoteràpia per tractar l'al·lèrgia al líquid seminal humà.¹⁰²

Des d'aleshores diversos estudis han provat la immunoteràpia parenteral tant en pauta convencional com, més recentment, en pautes *rush* per al tractament de l'HSPA.^{106,107} En les darreres dècades s'ha descrit amb èxit la dessensibilització intravaginal com una altra opció terapèutica per a l'al·lèrgia al líquid seminal humà. Aquesta opció terapèutica no requereix preparacions complicades i es presenta com una bona alternativa de tractament.^{108,109,110}

Ambdues teràpies, un cop realitzades, requereixen que la pacient mantingui relacions sexuals desprotegides de manera regular per mantenir la tolerància.

Infertilitat

Definició

La infertilitat és una única condició mèdica, però engloba a dos individus: “la parella”. Es defineix com la incapacitat de concepció després de 12 mesos de relacions sexuals freqüents sense usar contracepció en dones menors de 35 anys; o després de 6 mesos de relacions sexuals freqüents sense contracepció en dones de més de 35 anys.¹¹¹

La infertilitat és una condició comuna amb importants implicacions psicològiques, econòmiques, demogràfiques i mèdiques. La demanda de serveis mèdics per infertilitat ha augmentat notablement en els darrers anys, malgrat que la prevalença d'infertilitat s'ha mantingut estable.

Hi ha nombrosos estudis que demostren que la gran majoria de parelles (80-90%) conceben durant el primer any d'intentar-ho, però també demostren que la fecundabilitat de la cohort decreix al llarg del temps i també paral·lelament a l'edat de la dona.^{112, 113, 114, 115}

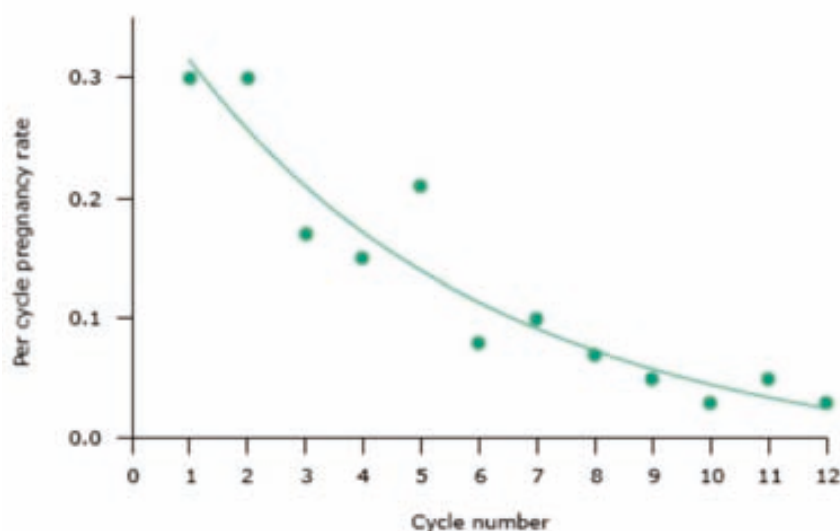


Figura 5 Gràfica de Fecundabilitat. Dades extretes de ¹¹⁶

Epidemiologia

La National Survey of Family Growth va entrevistar 15.303 dones amb parella estable d'edats entre 15 i 44 anys per estimar la incidència d'infertilitat als EUA¹¹⁷. Del 1982 al

2002, el percentatge de dones amb criteris d'infertilitat va decaure del 8,5 al 7,4%. En contrast, el percentatge estimat de dones amb trastorns de la fecunditat va augmentar de l'11% el 1982 al 15% el 2002.¹¹⁸ Els trastorns de fecunditat es varen definir com a intervals de 36 mesos de relacions sexuals desprotegides sense concepció o la percepció de les dones o els seus marits que la concepció era físicament impossible o molt difícil (sense incloure procediments quirúrgics per esterilització).

Les raons per a aquestes troballes tan discordants no es poden explicar completament. De totes maneres, és clar que actualment hi ha moltes dones que demanen ajuda mèdica per a la concepció. La National Survey of Family Growth afirma que 1,2 milions de dones (2% de les dones en edat reproductora) varen anar a una o més visites en un servei mèdic per aquesta indicació el 2002 i un 10% havia rebut tractament d'infertilitat al llarg de la seva vida.¹¹⁷

No se sap exactament si la infertilitat varia entre races i grups ètnics diferents. La National Survey of Family Growth refereix que les dones negres amb parella estable tenen el doble de possibilitats d'infertilitat que les dones blanques, després que les dades s'ajustessin per educació, ingressos i història de malaltia inflamatòria prèvia.¹¹⁷ Altres dades demostren que aquestes diferències tampoc no es poden explicar amb els diversos factors de risc per infertilitat, com el tabac, la obesitat, els fibromes o el volum ovàric, trobats en ambdós grups.¹¹⁹ El mateix estudi afirma que la proporció de dones hispàniques que tenen infertilitat s'ha mantingut estable i que s'ha reduït en dones blanques. No es tenen dades de dones asiàtiques.

Etiologia

Un estudi poblacional sobre causes d'esterilitat reporta els següents resultats:¹²⁰

- Factor masculí (hipogonadisme, defectes posttesticulars, disfunció dels tubs seminífers): 26%
- Disfunció ovàrica: 21%
- Dany tubari: 14%
- Endometriosis: 6%
- Problemes coitals: 6%
- Factor cervical :3%
- Desconeguda: 28%

Hi ha causes d'infertilitat que són fàcils d'identificar, com ara l'azoospermia, l'amenorrea de llarga evolució o una oclusió tubària uni o bilateral. No obstant això, en la majoria de parelles la situació és menys clara: l'esperma pot ser reduït en nombre, però no absent com en l'azoospermia; pot haver-hi oligomenorrea amb alguns cicles ovulatoris; o una història menstrual que suggereixi ovulació intermitent. Sovint és difícil de mesurar o prioritzar aquestes troballes quan s'estudia parelles amb infertilitat o es programen tractaments.

Un fet afegit a la complexitat de la situació, és que hi ha poques dades que avaluin el valor predictiu dels tests de diagnosi d'infertilitat malgrat el seu ampli ús. Per tant, excepte en un petit grup de causes absolutes d'infertilitat (com ara l'azoospermia o l'oclusió tubària bilateral), un resultat anormal d'aquests tests pot no explicar la causa d'infertilitat en una parella concreta. La relació incerta entre un resultat d'infertilitat en els tests i la causa real d'infertilitat fa difícil estimar la freqüència relativa de les causes d'infertilitat. No obstant això, és important i instructiu estimar la freqüència amb què diversos factors s'associen a la infertilitat per tal de determinar-ne la importància relativa.

Diagnòstic

El reconeixement, avaluació i tractament de la infertilitat és molt estressant per a la majoria de les parelles. El clínic no ha d'oblidar l'estat emocional de la parella, que pot incloure depressió, ansietat o desacords. És important reconèixer que la parella té múltiples factors que contribueixen a la infertilitat. S'ha de realitzar sempre un diagnòstic inicial complet, que inclogui la història clínica i una exploració física dels dos membres de la parella. Aquest diagnòstic ja identificarà si les causes més comunes d'infertilitat són presents.¹²¹

Els següents tests són útils en la majoria de parelles amb infertilitat:

- Anàlisi del semen per descartar factor masculí.
- Història menstrual, nivells en orina d'LH previs a l'ovulació, o nivells de progesterona en la fase lútea per assegurar la funció ovulatòria.
- Histerosalpingografia per veure la capacitat tubària i la cavitat uterina.
- Nivells en sèrum d'FSH el dia 3 i nivells d'estradiol.

En determinades parelles, cal fer els següents tests:

- Ecografia pèlvica per veure miomes uterins o quists ovàrics.

- Laparoscòpia per identificar endometriosis o alguna altra patologia pèlvica.
- Assegurar la reserva ovàrica en dones de >35 anys d'edat.
- Funció tiroïdal.

Infertilitat per causa desconeguda

Malgrat tots aquests esforços diagnòstics, ja hem comentat que fins en un 28% dels casos la causa d'infertilitat és desconeguda. La infertilitat per causa desconeguda es refereix a l'absència de causa per a la infertilitat en aquelles parelles que no aconsegueixen la concepció després de 12 mesos de relacions sexuals continuades i desprotegides o després de 6 mesos si la dona té > 35 anys.^{122, 123}

S'han proposat moltes possibilitats per explicar per què determinades parelles no poden concebre malgrat l'absència de causes identificables d'infertilitat. En algunes dones s'han descrit canvis en el desenvolupament del fol·licle, de l'ovulació o de la fase lúcia.^{124, 125} En altres parelles, l'anàlisi de l'esperma indica una concentració i una motilitat dels espermatozous en el límit baix de la normalitat.¹²⁶ Una altra possibilitat són els defectes d'implantació. Moltes vegades la infertilitat per causa desconeguda és atribuïble probablement a múltiples factors (exemple: dona de >35 anys d'edat o home amb paràmetres de semen en el límit baix de la normalitat), que per separat no tenen perquè reduir significativament la fertilitat però que combinats poden reduir notablement l'índex d'embaràs.

Immunoinfertilitat i anticossos antiesperma

En aquesta línia també s'ha postulat la possibilitat d'infertilitat per causa immunològica, en què els anticossos antiesperma juguen un paper clau.

En un article de revisió recent dels anticossos antiesperma¹²⁷ es demostra que aquests són majoritàriament d'isotipus IgG o IgA i es troben en el sèrum de dones infèrtils, i també a títol baix en parelles fèrtils. La incidència d'anticossos antiesperma en parelles infèrtils oscil·la entre el 9% i el 36%; del 8% al 21% en homes infèrtils i del 6% al 23% en dones infèrtils. Contràriament només el 0,9% i el 4% de dones i homes fèrtils respectivament presenten anticossos antiesperma detectables. Encara que hi ha estudis contradictoris, hi ha prou evidències en la literatura mèdica que demostren que la immunitat de l'esperma constitueix un problema important d'infertilitat.^{128, 129}

La tolerància a autoantígens es produeix precoçment en la vida d'un individu i les cèl·lules sexuals no es produeixen fins a la pubertat; per tant, els antígens espermàtics específics no són reconeguts com a propis pel sistema immunitari adult i, per això, s'hi

pot generar una resposta immune. Només s'observen anticossos antiesperma en humans o animals postpuberals i no en prepúbbers.^{130, 131}

Com que els antígens de l'esperma no són presentats al timus com a propis en la fase neonatal, hi ha mecanismes anatòmics o fisiològics per prevenir una resposta immune cap a aquests antígens. Una és la protecció anatòmica constituïda per les unions estretes entre les cèl·lules de Sertoli. Aquestes unions estretes creen una barrera en les porcions centrals dels tubs seminífers que exclou grans proteïnes i cèl·lules immunes. Malgrat aquesta barrera de cèl·lules de Sertoli, calen altres mecanismes immunosupressors per garantir la integritat dels antígens de l'esperma. S'ha suggerit que una petita fuga d'antígens espermàtics específics contribueix al desenvolupament de tolerància tardana a aquests antígens.¹³² La presència en el semen de limfòcits CD8 té un paper destacat a l'hora evitar la destrucció de cèl·lules espermàtiques pel sistema immunitari.¹³³ Altres molècules immunoreguladores i fins i tot la testosterona també poden inhibir una resposta autoimmunitària.¹³⁴

S'han identificat diversos factors de risc per desenvolupar anticossos antiesperma tant en homes com en dones.¹³⁵ En els homes, la vasectomia és la principal causa identificable d'anticossos antiesperma: després de la vasectomia, aquests anticossos són presents entre un 34% i un 74%. També les diverses causes d'azoospermia obstructiva han demostrat produir anticossos antiesperma. La torsió testicular teòricament pot comprometre la barrera sang-testis per isquèmia. En humans i animals, la torsió que ocorre abans de la pubertat té un molt baix risc de produir infertilitat immunològica. En canvi, en animals s'ha vist que la torsió postpuberal pot induir una resposta immune, però en humans no s'ha pogut demostrar. Recentment, diversos estudis han demostrat la presència d'anticossos antiesperma en un 18-73% d'homes amb carcinoma testicular. Això suggereix que l'autoimmunitat pot contribuir a la subfertilitat comunament detectada entre els homes amb neoplàsies de testicles. També s'ha estudiat l'autoimmunitat entre la població que presenta criptorquídia. El 66% dels pacients amb criptorquídia presenten anticossos antiesperma comparat amb el 2,6% d'homes infèrtils controls i 2,8% de donants fèrtils. L'edat de l'orquidopèxia és un factor molt important en el desenvolupament posterior d'anticossos. Les infeccions genitourinàries també s'associen a anticossos antiesperma, especialment uretritis no específiques, *Chlamydia*, *Mycoplasma* i *Gonococ*. És controvertit si la presència de varicocele s'associa o no a anticossos antiesperma. També s'ha relacionat l'homosexualitat amb la presència d'anticossos, que s'observen en el 28% d'homosexuals versus el 9,6% en heterosexuals.

S'observa una correlació important entre la presència d'anticossos antiesperma en dones i de les seves parelles masculines. Això suggereix que la presència d'anticossos

antiesperma en l'home pot induir una resposta immune en la dona o que antigens espermàtics anormals induïxin una resposta en ambdós membres de la parella.

En dones que han estat sotmeses a inseminació intrauterina no s'observa un increment d'anticossos antiesperma o la seva presència és baixa i habitualment transitòria, fins i tot en aquells casos en què han estat sotmeses a molts cicles d'inseminació artificial. Sí que s'ha observat que les dones amb infeccions pèlviques de repetició tenen una major incidència d'autoimmunitat espermàtica. La producció d'anticossos està associada a infecció per *Chlamydia*, *Mycoplasma* i *Ureaplasma*. Contràriament al que passa amb els homosexuals masculins, les pràctiques sexuals no semblen ser un factor de risc en les dones. Les prostitutes tenen una major incidència d'anticossos antiesperma segurament a causa de l'exposició a múltiples parelles i major freqüència d'infeccions pèlviques.

Els anticossos antiesperma (ASA), tant en homes com en dones, són policlonals, és a dir: es dirigeixen a més d'un antigen de l'esperma. Alguns d'aquests anticossos tindran importància en la infertilitat immunològica i altres no. Només aquells que vagin dirigits a proteïnes crucials en la fertilitat podran produir infertilitat. Les tècniques de diagnòstic actuals no són capaces de distingir entre aquells autoanticossos que produeixen infertilitat i els que no, perquè aquestes tècniques diagnòstiques no examinen l'especificitat antigènica dels ASA i només tenen en compte la fixació d'anticossos a l'espermatozou o a determinades regions de l'espermatozou. Els ASA es poden trobar tant en homes com en dones en sang i en secrecions del tracte reproductiu com el líquid seminal, moc cervical o líquid fol·licular.

En aquest sentit, els anticossos dirigits contra el PSA (tot i que en el nostre cas són de tipus IgE i no IgA o IgG com és habitual en els ASA) a priori sí que podrien tenir un paper en la infertilitat ja que el PSA es produeix essencialment a la glàndula prostàtica per liquar el semen ejaculat i permetre un medi on els espermatozous es puguin moure lliurement.¹³⁶ També es creu que és útil per dissoldre la capa mucosa cervical i així permetre l'entrada dels espermatozous.¹³⁷

Per entendre millor la infertilitat immunològica és molt important continuar estudiant l'estructura, la funció i la conseqüent patofisiologia d'aquests antigens. Fins ara, només s'han caracteritzat uns pocs antigens de l'esperma. L'estudi dels ASA va avançar ràpidament durant els anys setanta, vuitanta i començaments dels noranta però està estancat des d'aleshores. Això és en part perquè la tècnica terapèutica per tractar la infertilitat immunològica més emprada, la injecció intracitoplasmàtica d'esperma (ICSI), pot ser usada eficaçment per tractar la immunoinfertilitat independentment de l'anticòs antiesperma involucrat.

Alguns exemples d'ASA descrits són els següents dirigits contra:

- L'antigen de fertilització-1 (FA-1): és una glicoproteïna del cap de l'espermatozou aïllat tant d'espermatozous humans com murins. És específica de les cèl·lules germinals madures i rellevant en la producció d'infertilitat immunològica en humans.^{138, 139, 140, 141}
- La *cleavage signal protein* (CS-1): és una proteïna derivada de l'esperma que produeix escissió inicial del zigot. Es troba a la superfície dels espermatozous de diverses espècies de mamífers.^{142, 143}

Les proteïnes de la família CRISP: també són possibles candidates com a anticossos antiesperma i tindrien un particular interès. Són cadenes polipeptídiques amb dos dominis diferents: un aminoterminal *PR-1-like* i un domini cisteïna amb un carboni final.¹⁴⁴

Les CRISP estan àmpliament distribuïdes en molts organismes i comparteixen entre el 40 i el 80% d'identitat de seqüència. S'han aïllat proteïnes CRISP de mamífers i les seves funcions biològiques han estat ben caracteritzades. CRISP-1: només expressada en epidídim de mamífers, s'uneix lliurement als espermatozous i participa en la fusió de gàmetes.^{145,146, 147, 148, 149}

CRISP-2: també coneguda com a proteïna testicular específica tipus 1 (TPX-1), és expressada majoritàriament als testicles i està vinculada a la fusió de gàmetes, així com al desenvolupament i maduració de l'esperma.^{150, 151}

CRISP-3: està molt més àmpliament distribuïda. S'expressa en glàndules salivals, neutròfils, plasma, pròstata i secrecions exocrines.^{152, 153, 154}

Els anticossos davant de CRISP-1 (hCRISP-1) i CRISP-2 (hCRISP-2) inhibeixen de manera dosidepenent la penetració de la zona lliure de l'òcit de hàmsster (interacció esperma/òcits), cosa que indica que els anticossos anti-CRISP poden comportar reducció de la fertilitat.^{155, 156} Els anticossos anti-CRISP-1 i anti-CRISP-2 inhibeixen la penetració de l'òcit per l'esperma en un test de fertilització artificial. Els anticossos antiesperma es determinen en circumstàncies que detallem a la Taula VI.

Taula VI Indicacions per realitzar tests de detecció d'anticossos antiesperma

Indicacions per realitzar tests de detecció d'anticossos antiesperma
Infertilitat i almenys un dels següents:
Factors de risc identificables (vasectomia, epididimitis aguda, etc.)
Anàlisi anormal del semen: aglutinació de l'esperma / baixa motilitat / escassa viabilitat / vibració per motilitat
Test postcoital anormal: pocs espermatozous al moc cervical / pobre motilitat / vibració per motilitat
Test de penetració de moc cervical in vitro anormal
Fallada o feble sensibilització en FIV
Test de penetració de l'esperma anormal
Infertilitat desconeguda després de l'examen d'ambdós membres de la parella

Tractament:

El tractament d'aquestes parelles amb infertilitat per causa desconeguda ha de tenir en compte l'eficàcia, el cost, la seguretat i el risc de totes les alternatives terapèutiques. Habitualment contempen tractaments que necessiten un major nombre de recursos progressivament: 1) Inseminació intrauterina (IUI); 2) Clomifè; 3) Clomifè més inseminació artificial; i, finalment, les que consumeixen més recursos: 4) Injeccions de gonadotrofines; 5) Inseminació intrauterina, i 6) Fertilització in vitro (IFV) (Taula VII). L'aproximació terapèutica s'ha d'individualitzar per a cada parella. En general, si un tractament específic no aconsegueix l'embaràs després de 3 cicles, s'han de provar alternatives.^{157, 158}

Taula VII Gestació estimada i cost per cicle en tractaments per infertilitat per causa desconeguda

Intervenció	Ratio embaràs per cicle, %	Cost per cicle en dolars US
Actitud expectant	1 a 3	< 50
IUI	4 a 6	300
Clomifè	4 a 6	100
Clomifè + IUI	7 a 9	400
Injecció gonadotrofines	4 a 10	2.000
Injecció gonadotrofines + IUI	9 a 16	2.300
Fertilització in vitro	20 a 40	12.000

IUI: Intrauterine insemination

L'impacte econòmic d'aquests tractaments és molt alt. Un estudi del cost per nadó nascut viu per diversos tractaments d'infertilitat reporta els següents costos: clomifè + IUI = 10.000\$ per embaràs; FSH + IUI = 17.000\$ per embaràs, i IVF= 50.000\$ per embaràs.¹⁵⁹ Aquesta anàlisi suporta la idea d'iniciar el tractament amb aquells procediments que impliquin menys recursos.

L'edat de la dona influeix notablement en l'índex de gestació associat al tractament.¹⁶⁰ Per tant, l'actitud expectant pot ser una opció en parelles amb esterilitat per causa desconeguda en què la dona té <32 anys d'edat i no hi ha dades de depleció d'òcits. En canvi, el *pool* d'òcits ovàrics decau ràpidament en dones de més de 37 anys d'edat; per tant, l'actitud expectant no és una opció en aquestes dones.

La inseminació intrauterina (IUI), és un procediment que consisteix a dipositar l'esperma directament a la cavitat intrauterina. Ha estat usada eficaçment per tractar múltiples causes d'infertilitat sempre que hi hagi almenys una trompa de Fal·lopi. Tot i

que es fa servir des de fa molt temps, tant la seva eficàcia com el seu lloc entre les tècniques de reproducció assistida continuen sota debat.

Segons les dades publicades pel Ministeri de Salut francès l'any 2000, la IUI es considera la millor opció terapèutica en els casos d'infertilitat per factor cervical però el seu paper no està clar en els casos d'infertilitat per factor masculí ni en els casos d'infertilitat per causa desconeguda. No hi ha gaires estudis prospectius aleatoritzats, en especial, són escassos els que inclouen població control no tractada. Els darrers 10 anys s'han publicat diverses metanàlisis per permetre definir millor el paper de la IUI en el maneig dels pacients. No obstant això, factors com el *cutt-off* de l'esperma usat per definir l'esterilitat masculina i la seva contribució a la IUI i els tractaments usats per estimular l'ovulació no permeten desenvolupar pautes d'utilització de la IUI basades en evidències. Totes les metanàlisis modulen les seves conclusions basant-se en la necessitat de grans estudis aleatoris controlats. A més, el nivell d'hiperestimulació ovàrica controlat és altament qüestionable tant pel que respecta a la incidència de síndrome d'hiperestimulació ovàrica com als riscos d'embarassos múltiples. Els pacients que no han aconseguit gestació amb IUI poden recórrer a la FIV (fertilització in vitro) o la ICSI (injecció intracitoplasmàtica d'esperma). Les dades procedents del registre nacional de França (FIVNAT) no van mostrar diferències importants entre les parelles que van recórrer a la FIV després de fracassar amb la IUI de les que van recórrer directament a la FIV.¹⁶¹

La IUI sembla un tractament cost-efectiu en parelles infèrtils però les condicions precises de la seva gestió (cicle espontani o estimulat, monofolicular, paucifolicular o multifolicular d'inducció) encara no s'han avaluat.

Infertilitat i atòpia

L'al·lèrgia i l'autoimmunitat poden ser vistes com a pols oposats de patologies del sistema immunitari. Per les reaccions tipus I, vehiculades per IgE, prototip de reacció al·lèrgica, la característica primordial és la producció d'anticossos IgE contra antígens ambientals innocus per a l'organisme en pacients atòpics. A nivell cel·lular, aquesta reacció està dirigida per les cèl·lules *T helper 2* (Th2), que juguen un paper clau, ja que són una font important d'interleucines (IL-4, IL-13 i IL-5). La IL-4 i la IL-13 són citocines que indueixen el canvi d'immunoglobulina a IgE. La IL-5 és la responsable de l'eosinofília.¹⁶² Cal remarcar les similituds entre respostes immunes en l'al·lèrgia i en les infeccions per paràsits. En la dominància Th2, característica de les dues condicions, s'observa producció d'IgE i eosinofília.¹⁶³ Per contra, la progressió de desordres autoimmunitaris en models animals s'associa habitualment a respostes no Th2 (prèviament Th1 i ara més complexes Th1, Th17, alteracions de Tregs, etc.). Encara avui

la desviació de la resposta immune cap a una predominança Th2 sembla conduir a una millora o a la prevenció de trastorns autoimmunitaris.¹⁶⁴

La disfunció del sistema immunitari en diverses malalties s'ha associat freqüentment a atòpia. Fins ara però, no hi ha suficient evidència que existeixi aquesta associació entre atòpia i fracàs de l'embaràs o infertilitat primària.¹⁶⁵ En la literatura mèdica trobem tant suports a favor com en contra d'aquesta associació.

El grup de Mathur et al.¹⁶⁶ varen detectar IgE i anticossos antiespermàtics en mostres de líquid seminal i sèrum de 25 homes fèrtils (grup A), 18 homes infèrtils sense anticossos antiesperma (grup B) i 42 homes infèrtils amb anticossos antiesperma (grup C), i en mostres de sèrum i secrecions cervicals i vaginals de 25 dones fèrtils (grup D), 28 dones infèrtils sense anticossos antiesperma (grup E), i 32 dones infèrtils amb anticossos antiesperma (grup F). Entre els homes, van ser elevats en el grup C (230 + / - 41 anys, mitjana + / - SEM), en comparació amb els grups B (94 + / - 33, P menor que 0,05) i A (55 + / - 8, p menor de 0,001). En contrast, els nivells d'IgE en el líquid seminal en el Grup C (180 + / - 44) no van ser significativament diferents dels del grup B (48 + / - 21), però van ser més alts que els del grup A (8 + / - 2, P menor que 0,05). En les dones, els nivells sèrics d'IgE van ser més grans (p menor que 0,001) en el grup F. Les dones dels marits amb autoanticossos, tenien nivells sèrics d'IgE més alts (406 + / - 55), que les dones dels marits sense autoimmunitat (247 + / - 97) encara que aquesta dada no és estadísticament significativa. Aquests resultats proporcionen evidència d'una resposta d'IgE elevada en els subjectes amb títols d'anticossos antiespermàtics significativament elevats.

El grup de Harrison et al.¹⁶⁷ varen fer en un estudi exploratori inicial per estudiar la relació entre infertilitat i atòpia. La tendència a l'atòpia es va mesurar per una història clara d'al·lèrgia, positivitat a les proves cutànies a pneumoal·lèrgens i valors d'IgE plasmàtica positius en parelles amb esterilitat sense causa aparent i en un grup control de parelles que havien tingut recentment un fill. Almenys una de les avaluacions va ser positiva en 29 de les 47 parelles infèrtils i en 52 dels 103 controls, però només cinc pacients del grup infèrtil i dos del grup fèrtil tenien les tres avaluacions positives. Els nivells elevats d'IgE van ser significativament més freqüents en les parelles infèrtils que en el grup de comparació.

Al Brasil, el grup de Zac et al.¹⁶⁸ varen realitzar un estudi retrospectiu per verificar epidemiològicament la relació entre al·lèrgia i avortaments i infertilitat. Es varen entrevistar 250 dones d'edats compreses entre els 40 i els 60 anys i es varen dividir en dos grups: grup 1 (dones al·lèrgiques) i grup 2 (dones sanes no atòpiques). Les pacients varen ser seleccionades de manera aleatòria entre les pacients ateses en el Servei de

Ginecologia i Obstetricia de l'Hospital das Clínicas-UFMG. Les dones varen ser identificades per edat i raça en ambdós grups. Es registraven episodis previs d'avortaments i dificultats per quedar embarassada. Si hi havia dubtes sobre qualsevol dels temes anteriors, la pacient quedava exclosa de l'estudi. Es va observar una major incidència de dificultat per concebre entre les pacients al·lèrgiques. En ambdós grups, tant l'antecedent d'avortament com la dificultat per concebre era més freqüent en dones mulates, seguides per les caucàsiques i finalment les dones negres. Els autors conclouen que la presència d'al·lèrgia sembla relacionada a un major índex d'infertilitat.

Contràriament a aquests estudis presentats, el grup de Hanzlikova et al.¹⁶⁹ varen estudiar la producció intracel·lular de IL-4 i INF- γ per les cèl·lules perifèriques CD4+ LT així com els nivells sèrics d'IgE total i específica. Al mateix temps varen realitzar *prick tests* a pneumoal·lèrgens i es varen registrar manifestacions d'atòpia en un qüestionari. Els autors varen trobar una menor producció intracel·lular d'IL-4 per les cèl·lules CD4+ i valors més baixos d'IgE total i específica en aquelles dones amb infertilitat comparat amb les dones control, així com una menor freqüència de manifestacions d'atòpia en aquestes pacients. Així, els autors conclouen que es demostra una hipoactivitat Th2 en dones infèrtils que es pot associar amb una baixa presència d'atòpia entre aquestes dones. Cal remarcar que en aquest estudi, contràriament als anteriors presentats, es varen excloure dones que tenien altres anormalitats immunològiques com ara anticossos antiesperma.

Altres autors creuen que només les respostes immunes tipus Th1 s'associen al fracàs de l'embaràs o a la infertilitat primària.^{170, 171}

Sensibilització a l'epiteli / caspa de gos

Epidemiologia

La caspa de gos és una causa comuna d'al·lèrgia respiratòria, amb símptomes que inclouen des de rinoconjuntivitis, inflamació bronquial i asma. La prevalença exacta d'al·lèrgia al gos és desconeguda però De Groot et al. tenien una prevalença d'al·lèrgia al gos en la seva població del 17%, comparat amb la prevalença d'al·lèrgia al gat del 24%.¹⁷² En un estudi epidemiològic realitzat recentment a Espanya, s'observa un increment important de la sensibilització als epitelis de mamífers. La sensibilització als epitelis globalment representa la tercera causa de sensibilització en rinitis i asma després dels àcars i els pol·lens. En el subgrup analitzat de pacients amb rinitis, l'epiteli sensibilitzant més freqüentment implicat era el gat, seguit de l'epiteli de cavall. Malgrat aquests resultats, l'animal que més freqüentment es trobava a les cases com a animal de companyia era el gos i, en canvi, no es trobava sensibilització a l'epiteli de gos en cap dels casos estudiats de rinitis inclosos en l'estudi. En el subgrup de pacients amb asma, l'epiteli més freqüentment implicat tornava a ser el gat, i en el cas de l'asma, l'epiteli de gos era el segon més rellevant amb una sensibilització entre asmàtics del 15,3% i el 13,7% respectivament.⁴³

Entre els pacients al·lèrgics al gos, se'n desconeix el percentatge que és monosensible a aquest epiteli. A la pràctica clínica diària s'observa que la majoria de pacients sensibles a l'epiteli de gos ho són també a l'epiteli de gat. S'ha postulat que els al·lèrgens majors, tant de gat com de gos, poden compartir epítops IgE.¹⁷³ Recentment s'ha descrit l'existència de reactivitat encreuada entre Fel d 1, l'al·lèrgen major del gat, i una proteïna de la caspa de gos. És la primera vegada que es descriu la presència d'un al·lèrgen semblant al Fel d 1 a la caspa de gos que podria ser el responsable de la doble positivitat observada freqüentment *in vitro* entre l'extracte de caspa de gat i l'extracte de caspa de gos.¹⁷⁴

Al·lèrgens de gos

Hi ha molta controvèrsia sobre les qüestions que porten una proteïna a sensibilitzar els humans, però sembla que, a grans trets, qualsevol proteïna forana a l'individu que és inhalada persistentment pot esdevenir un al·lèrgen.¹⁷⁵ L'origen dels al·lèrgens animals és molt divers: orina (rosegadors), femta (àcars), saliva (gat i panerola) i pèls o escames de pell (gat i gos). En principi es creu que la majoria d'al·lèrgens de mamífers no presenten activitat enzimàtica. La sensibilització a l'epiteli de gat, gos o ratolí s'associa amb consistència a la presència d'asma. En el cas dels individus simptomàtics amb *prick test* positiu a epitelis d'animals hi ha forta evidència que cal evitar l'exposició a

l'al·lergen. En canvi, no hi ha evidència per defensar una prevenció primària en els individus no sensibilitzats a epitelis, ja que la majoria de pacients al·lèrgics a epitelis no conviuen habitualment amb animals. S'incrementa l'evidència científica que l'exposició a gats, gossos, rates i altres animals pot induir una forma de tolerància immunològica sense causar trastorn al·lèrgic.¹⁷⁶

Així, doncs, els al·lèrgens de gos poden ser detectats no tan sols en cases que tenen gos com a animal de companyia sinó també en altres llocs, com escoles, centres de dia, etcètera, on generalment no hi ha gossos i aquestes quantitats són suficients per sensibilitzar els pacients.¹⁷⁷

Els extractes procedents de caspa i epiteli de gos contenen proteïnes al·lergògenes i no al·lergògenes.^{178, 179}

Fins ara, s'han descrit cinc al·lèrgens de gos que han estat identificats i estudiats en detall i han estat inclosos a la base de dades de l'Allergen Nomenclature Sub-committee (<http://www.allergen.org>) of the International Union of Immunological Societies: Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4 i Can f 5.

Can f 1 i Can f 2 són dos membres de la família de les lipocalines; ambdós han estat purificats i expressats com a antigens recombinants.¹⁸⁰

Can f 3 és una albúmina del gos; és una proteïna relativament ben conservada al llarg de l'evolució i és responsable d'una extensa reactivitat encreuada entre altres albúmines animals.^{181, 182, 183, 184, 185}

El Can f 1 és el més important dels al·lèrgens de gos coneguts; aproximadament el 50% dels pacients al·lèrgics al gos presenten anticossos IgE davant de Can f 1. Aproximadament el 20% dels pacients tenen anticossos IgE específics per a Can f 2, la majoria dels quals estan també sensibilitzats a Can f 1.¹⁸⁶ Entre el 30 i el 40% dels adults amb al·lèrgia al gos presenten anticossos IgE específics davant de Can f 3, però la rellevància clínica de la sensibilització a les albúmines animals es desconeix.¹⁸⁷

També ha estat descrita la presència en caspa de gos d'una tercera lipocalina IgE-fixadora, designada com a Can f 4. Ha estat identificada, purificada i expressada com a al·lergen recombinant. Els sèrums reactius a Can f 4 presenten IgE específica davant d'una proteïna de 23 kDa present a l'extracte d'epiteli de vaca. És una proteïna de la família de les *odor-binding proteins*. Encara no està ben definida la seva importància com a al·lergen.¹⁸⁸

És rellevant la freqüència de presentació d'anticossos de tipus IgE davant de caspa de gos en absència d'anticossos IgE davant de Can f 1, Can f 2, Can f 3 i Can f 4, per tant, això implica l'existència d'altres al·lèrgens de gos encara no identificats.

Recentment s'ha descrit una proteïna IgE de la caspa de gos aïllada a partir de l'orina de gos i amb reactivitat encreuada demostrada in vitro amb l'antigen prostàtic específic del líquid seminal humà. Aquesta proteïna ha estat anomenada Can f 5 i pertany a la família de les cal·licreïnes o serina-proteases.¹⁸⁹

JUSTIFICACIÓ

Malgrat que en les últimes dècades, aprofitant el desenvolupament de la biologia a nivell molecular, s'han realitzat esforços a nivell clínicoassistencial amb estreta col·laboració amb equips de recerca bàsica per identificar els al·lèrgens implicats en la majoria de reaccions al·lèrgiques (especialment les més prevalents en la població), encara són moltes les proteïnes causals que desconeixem. Això comporta una deficiència important en el camp de la immunoal·lèrgia tant pel que fa al diagnòstic com a la terapèutica d'aquests trastorns.

Això és especialment palès en aquells trastorns com l'al·lèrgia al líquid seminal humà que, per la seva baixa prevalença en la població general, no són objecte habitual d'estudi. Això comporta que la majoria de professionals mèdics de diferents disciplines que poden trobar-se amb pacients afectades d'aquest trastorn el desconeguin i no sàpiguen procedir correctament en l'assistència d'aquestes malaltes. Al mateix temps, ens fa plantejar si la prevalença és realment tan baixa com la publicada fins al moment o hi ha formes localitzades del trastorn que queden infradiagnosticades en forma de vulvovaginitis cròniques inespecífiques.

Des de la primera descripció del fenomen el 1958, s'ha avançat considerablement en el coneixement de les formes clíniques del trastorn i fins i tot en teràpies que poden ajudar aquestes pacients a mantenir relacions sexuals lliures i obertes, així com en procediments que permeten la concepció si és la voluntat de la parella. Encara som lluny, però, de contestar preguntes com per què una dona se sensibilitza a una proteïna que li és pròpia, o per què una pacient sensibilitzada a un al·lèrgen del líquid seminal humà desenvolupa la reacció al·lèrgica des de la seva forma més lleu a la més severa i una altra també igualment sensibilitzada no desenvolupa el trastorn.

En el cas de l'al·lèrgia al líquid seminal ens trobem dins un camp complex d'estudi; primer perquè el líquid seminal humà conté una gran quantitat de proteïnes, moltes de les quals encara no han estat ben identificades, que poden comportar-se com a al·lèrgens; per tant, això fa pensar que hi poden haver molts agents causals possibles, encara que de moment només el PSA s'ha identificat i descrit com a agent etiològic del trastorn; en segon lloc, per la dificultat de completar l'estudi a nivell clínic amb proves de provocació in vivo per les consideracions ètiques que això comportaria.

D'altra banda, tenim l'al·lèrgia a la caspa de gos, la prevalença de la qual està augmentant a tots els països desenvolupats. En la pràctica clínica al·lèrgològica és un fet habitual trobar-se amb la falta de resposta a la immunoteràpia específica amb caspa de

gos. Aquest fet ja ha estat prèviament descrit per Lijla et al.¹⁹⁰ i això ens suggereix que disposem d'un extracte menys ben estandarditzat, contràriament al que passa amb extractes d'altres epitelis com el de gat, en què la potència de l'extracte la determina pràcticament en la seva totalitat l'al·lèrgen major Fel d 1.

Això es pot explicar perquè l'extracte no conté quantitats suficients d'al·lèrgens clínicament rellevants en determinats pacients.

Els resultats d'aquests estudis contribueixen a: 1) Identificar l'al·lèrgen causal en un cas d'al·lèrgia al líquid seminal; 2) Explicar el possible origen del trastorn en els casos que aquest es presenta des de la primera exposició al semen mitjançant un fenomen de reactivitat encreuada amb una nova proteïna de la caspa de gos; 3) Identificar i caracteritzar aquesta proteïna de la caspa de gos; 4) Observar la rellevància de la sensibilització a aquest nou al·lèrgen de gos descrit en la nostra població d'al·lèrgics al gos i observar que es comporta com un al·lèrgen major, i 5) Determinar que l'al·lèrgia al líquid seminal no es relaciona amb l'esterilitat.

Paral·lelament, aquestes troballes contribueixen a millorar els tests diagnòstics com el *microarray* d'al·lèrgens individuals (ImmunoCAP® ISAC; Phadia, Upssala, Suècia) amb la incorporació d'aquesta proteïna i a obrir un nou camí per millorar els extractes disponibles en immunoteràpia específica per a al·lèrgics a la caspa/epiteli de gos.

OBJECTIUS

Propòsit general

Estudiar un cas d'al·lèrgia al líquid seminal des del punt de vista molecular i descriure l'al·lergen implicat.

Objectius específics

Objectiu 1

Demostrar l'existència de reactivitat encreuada entre una proteïna de la caspa de gos i una proteïna del líquid seminal humà com a possible origen de l'al·lèrgia al líquid seminal.

Objectiu 2

Descriure els al·lèrgens implicats tant en la caspa de gos com en el líquid seminal.

Objectiu 3

Descriure la importància de reconeixement d'aquestes proteïnes al·lergògenes entre al·lèrgics al gos i entre dones amb esterilitat per causa desconeguda.

Objectiu 4

Determinar l'al·lergenicitat del PSA en una mostra de 40 sèmens de donants sans.

MÈTODES

Selecció de pacients dels estudis:

Primer i tercer article

- Es presenta el cas d'una pacient nuligràvida de 38 anys d'edat que presenta reaccions d'anafilaxi immediates després del coit, des del primer contacte amb el semen. Com a història personal d'atòpia, la pacient presenta asma bronquial des dels 18 anys d'edat per al ·lèrgia a l'epiteli de gos. La pacient presenta monosensibilització a la caspa de gos. La pacient refereix convivència amb un gos al domicili des de l'adolescència i actualment, encara que no té gos a casa, continua amb contacte habitual amb gossos.

Segon article

- Entre setembre de 2004 i setembre de 2005, tots els pacients visitats consecutivament al Servei d'Al·lèrgia de l'Institut Universitari Dexeus (Barcelona, Espanya) amb un diagnòstic de certesa d'al·lèrgia al gos varen ser proposats per participar a l'estudi. Els pacients varen ser seleccionats basant-nos en una història clara d'al·lèrgia al gos i respostes positives al *prick test* amb extracte d'epiteli/caspa de gos.

A tots els participants se'ls va passar un petit qüestionari. El qüestionari va ser dissenyat per recollir la següent informació: edat, sexe, símptomes davant de l'exposició al gos, símptomes davant de l'exposició a altres animals, i símptomes davant de l'exposició a líquid seminal humà, immunoteràpia específica amb extracte d'epiteli de gos i convivència amb gos.

Altres resultats del treball de recerca

Primer apèndix

- Entre gener de 2007 i desembre de 2008 tots els pacients diagnosticats d'al·lèrgia a la caspa de gos visitats consecutivament al Servei d'Al·lèrgia de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona i a la Secció d'Al·lèrgia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron de Barcelona varen ser proposats per participar a l'estudi. Els pacients varen ser seleccionats basant-nos en una història clara d'al·lèrgia al gos amb símptomes respiratoris (asma o rinoconjuntivitis), respostes positives al *prick test*

amb extracte d'epiteli/caspa de gos i resultats positius d'IgE específica davant de caspa de gos.

Segon apèndix

- Es varen reclutar 43 pacients amb diagnòstic d'esterilitat per causa desconeguda procedents del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Universitari Sant Pau i Santa Creu de Barcelona durant l'any 2010. Els pacients van ser seleccionats en base una història clara d'esterilitat, en què s'havia descartat el factor masculí i femení.

A totes les participants se'ls va passar un petit qüestionari. El qüestionari va ser dissenyat per recollir la següent informació: edat, símptomes respiratoris davant de l'exposició amb animals de pèl, símptomes davant de l'exposició a líquid seminal humà, immunoteràpia específica amb extracte d'epiteli de gos i convivència o contacte habitual amb gos.

Tercer apèndix

- En el tercer apèndix varem usar el sèrum de 8 pacients al·lèrgics al gos que contenien IgE específica davant de la proteïna de 28 kDa, identificada com a PSA humà, per realitzar SDS-PAGE *immunoblotting* usant 40 sèmens de donants sans. (De la mostra de 10 pacients, inclosos en el segon article de la tesi, 2 pacients varen discontinuar el seguiment i no varem poder recuperar sèrum.)

Tots els pacients inclosos varen signar el consentiment informat i els estudis van ser aprovats pel comitè ètic de l'Hospital.

Mostres al·lèrgenes i extractes

a) Líquid seminal:

El líquid seminal va ser recollit amb preservatiu pel marit de la pacient amb HSPA procedent del Servei d'Al·lèrgia de l'Institut Universitari Dexeus (Barcelona, Espanya) i va ser usat per realitzar tots els assaigs in vitro del primer i segon article.

En el tercer article es va utilitzar semen procedent de donant sa (Banc d'esperma, Laboratoris Sabater Tobella, Barcelona, Espanya).

En el tercer apèndix es van usar sèmens de 40 donants sans (Banc d'esperma, Laboratoris Sabater Tobella, Barcelona, Espanya).

En tots dos casos, les proteïnes del líquid seminal varen ser extretes a través d'agitació magnètica en 50 mmol/L PBS a pH 7,5 durant 4 hores a temperatura ambient. Es varen centrifugar les mostres a 5.600 g durant 30 minuts i el sobrenedant es va dialitzar amb aigua. L'extracte dialitzat es va filtrar a través d'una membrana de 0,22- μ m de diàmetre de porus.

b) Secrecions prostàtiques:

Les mostres de secrecions prostàtiques de gos es varen recollir al Servei de Reproducció de Petits Animals de l'Hospital Clínic Veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona (Dra. Teresa Rigau i Maria Montserrat Rivera). Les mostres es varen recollir mitjançant manipulació manual del penis del gos i es varen emprar sense tractar per realització dels estudis in vitro. Les mostres es varen usar sense tractar per realitzar els assaigs in vitro inclosos en el tercer article.

c) Proteïnes recombinants i purificades:

Can f 1 i Can f 2 recombinants (Department of Clinical Microbiology, University of Kuopi, Kuopi, Finlàndia), que van ser produïts i purificats segons descriuen Saarelainen i col·laboradors.¹⁸⁶

Proteïna Can f 5 purificada (Phadia AB, Upssala, Suècia), que va ser proporcionada per Mattsson i col·laboradors.¹⁸⁹

Els ImmunoCAPS (Phadia AB, Upssala, Suècia) de líquid seminal humà i Can f 5.

Tests cutanis (*skin prick test*)

Els tests cutanis amb extractes d'epiteli de gos (3 mg/mL) i caspa de gos (1,3 mg/mL) es varen realitzar a tots els pacients inclosos en els 3 articles i en el treball inclòs en el primer apèndix. En el segon article també es van realitzar tests cutanis amb un panell d'extractes d'altres epitelis animals que contenia extracte de rata, ratolí, hámster, gat, vaca, porc, be, conill de guinea i conill (Bial-Arístegui, Bilbao, Espanya). Tots els tests cutanis varen ser realitzats d'acord amb el procediment estàndar¹⁹¹ a la cara anterior de l'avantbraç amb una llanceta Prick Lancettes Dome (Hollister-Stier, Spokane, Washington, EUA). Es va usar una llanceta estèril en cada test. Es va fer servir fosfat d'histamina (10 mg/mL) i sèrum fisiològic estèril 0,9% com a controls positiu i negatiu respectivament. Es va considerar com a resposta positiva una pàpula mitjana de 7 mm de diàmetre o superior a la produïda pel control negatiu 15 minuts després de la punció.

Determinació d'IgE específica

Les determinacions d'IgE específica davant de líquid seminal humà, epiteli de gos, caspa de gos i Can f 5 es van realitzar amb tests ImmunoCAPS regulars o experimentals produïts per Phadia. Els resultats dels tests s'expressen en KU/l tal com assenyalen les instruccions del fabricant. Els resultats de CAP > 0,35 KU/l es consideren positius. Els immunoCAPS experimentals van ser produïts tal com descriuen Marknell i col·laboradors.¹⁹²

ImmunoCAP® ISAC (Phadia, Upssala, Suècia)

Es va usar un immunoassaig de *microarray* per detectar anticossos IgE específics davant de diversos components al·lergògens individuals per a la realització del diagnòstic per components. Els resultats de l'ImmunoCAP ISAC es consideren positius a partir de 0,3 ISU (unitats arbitràries).

SDS-PAGE immunoblotting i immunoblotting inhibició

Els SDS-PAGE es van realitzar en base al mètode de Laemmli;¹⁹³ per apilar i separar les proteïnes respectivament, es van fer servir gels amb el 4% i el 12,5% d'acrilamida.

Les mostres varen ser dissoltes en un tampó que contenia 0,125 mol/L HCl-Tris (pH 6,8) i desnaturalitzades amb 0,1% SDS i 5% 2-β-mercaptoethanol (2ME) a 100 °C durant 5 minuts (no s'hi va afegir 2ME quan es varen usar condicions no reductores). D'acord amb la tècnica proposada per Bradford, es varen aplicar 20 µg a cada carril.¹⁹⁴

Després de l'electroforesi, les proteïnes separades es van identificar: mitjançant la tinció d'un gel control amb 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 dissolt en metanol / àcid acètic / aigua destil·lada (4:1:5). Les bandes proteïques separades (en un altre gel) varen ser transferides electroforèticament a una membrana de polifluorur de vinilidè (PVDF) o nitrocel·lulosa (NTC), tal com descriuen Towbin i col·laboradors,¹⁹⁵ i bloquejades durant una hora a temperatura ambient amb 0.1% Tween-20 i 5% col·lagen de peix (o 5% de llet desnatada) en tampó Tris (TBS). A continuació les membranes varen ser incubades durant tota la nit a 4 °C amb el sèrum dels pacients (dilució 1:2- 1:10), seguit per la incubació amb un anticòs de conill o ratolí anti-IgE humana (dilució 1:2.000- 1:10.000) marcat amb peroxidasa de rave (HRP) i detecció mitjançant un mètode de quimoluminiscència tal com recomana el fabricant (ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buck, Regne Unit).

Quan es realitzaven els assaigs d'*immunoblotting* inhibició, els sèrums dels pacients varen ser prèviament incubats amb diferents fases inhibidores (extractes d'epiteli de gos (9 mg/mL) , de caspa de gos (1.8 mg/mL) o Can f 5 purificat (50 ug/ml)) durant tota la nit a 4 °C i posteriorment es va realitzar l'*immunoblot* tal i com hem comentat anteriorment.

Es va electroeluir una banda de 17 kd de la separació electroforètica (SDS-PAGE) de la secreció prostàtica de gos. La proteïna electroeluída es va usar com a fase inhibidora en els assaigs de *blotting* inhibició.

EAST inhibició

L'EAST inhibició va ser realitzat seguint els mètodes de Yman i col·laboradors.¹⁹⁶ El líquid seminal humà (HSP) va ser usat en la fase sòlida i els sèrums dels pacients van ser preincubats amb extracte de caspa de gos (1.8 mg/mL) i Can f 1 i Can f 2 recombinants 120 µg/mL (Department of Clinical Microbiology, University of Kuopi, Kuopi, Finlàndia).

Identificació proteica i caracterització mitjançant espectrometria de masses

Les proteïnes d'interès varen ser identificades per espectrometria de masses. Les bandes seleccionades varen ser retallades dels gels amb un bisturí estèril i subjectes a digestió tripsínica d'acord amb el mètode de Shevchenko et al,¹⁹⁷ amb alguna modificació. La digestió *in-gel* va ser purificada tal com descriuen Gobom et al.¹⁹⁸ Els pèptids van ser analitzats usant un Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation instrument (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), i els ions carregats positivament van ser analitzats en mètode reflector usant extracció retardada amb els següents ajustaments: *acceleration voltage* de 20 kV, *grid* de 72%, *delay time* de 300 ns, *100 shots per spectrum*, i *mass range* de 800 a 3500d.

L'espectre va ser calibrat usant productes d'autòlisis de tripsina, i l'exactitud de massa era inferior a 50 ppm. L'empremta dels pèptids va ser analitzada usant el programari Data Explorer (Applied Biosystems).

A més, la identificació va ser confirmada per MS/MS en un MALDI-TOF/TOF 14700 Analitzador de proteïnes (Applied Biosystems). La identificació de proteïnes va ser realitzada a través de la cerca de seqüències proteiques en una base de dades (National Center for Biotechnology Information) amb el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Els següents paràmetres varen ser usats: detecció de masses monoisotòpica inferior a 50 ppm, *1 missed cleavage*, i *carbamidomethylation modifications of cysteine (complete), methionine, i pyroglutamic acid (partial)*.

Anàlisi estadística

Es varen comparar dades demogràfiques, clíniques i de laboratori de pacients al·lèrgics al gos amb reconeixement de la proteïna de 28 Kd i davant de pacients al·lèrgics al gos sense reconeixement d'aquesta proteïna. Les variables categòriques es varen expressar en percentatges i freqüències i les variables contínues es varen presentar com a mitges i SD.

El test χ^2 , el Student t test, el Mann-Whitney U test, i la Spearman correlation van usar-se per analitzar les dades. L'anàlisi estadística es va fer amb programari SAS, versió 9.1.3 (SAS Institute, Inc, Cary, NC, EUA). La significació estadística va ser valorada amb $P < 0.05$.

RESULTATS

Primer article

Human Seminal Plasma Allergy and Successful Pregnancy

L Ferré-Ybarz, M Basagaña, B Coroleu, B Bartolomé, A Cisteró-Bahima

J Investig Allergol Clin Immunol. 2006; 16(5): 314-6

Resum

Les reaccions d'hipersensibilitat immediata al líquid seminal humà són infreqüents. S'han descrit gran varietat de símptomes des de pruija localitzada a reaccions sistèmiques. Les reaccions sistèmiques no són habituals però hi ha lesions cròniques o recurrents a nivell local que podrien ser més freqüents i estar infradiagnosticades. L'ús de mètodes anticonceptius de tipus barrera s'ha recomanat per prevenir les reaccions al·lèrgiques en aquestes pacients però aquesta opció no és vàlida per aquelles parelles que volen tenir descendència.

Es presenta el cas d'una dona amb al·lèrgia al líquid seminal humà que després del quart cicle d'inseminació artificial ha aconseguit quedar embarassada. En l'estudi in vitro del líquid seminal del marit mitjançant poliacrilamidadodecilsulfat sòdic i posterior immunotransferència s'observa una banda fixadora de 28 kDa com l'al·lèrgen responsable.

Encara que actualment existeixen diversos tractaments vàlids per a l'al·lèrgia al líquid seminal humà, la inseminació artificial és un mètode efectiu per aconseguir l'embaràs.

Case Report

Human Seminal Plasma Allergy and Successful Pregnancy

L Ferré-Ybarz,¹ M Basagaña,¹ B Coroleu,² B Bartolomé,³ A Cisteró-Bahima¹

¹Allergy Department and ²Gynecology and Obstetrics Department, Institut Universitari Dexeus, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Investigation and Development-Arístegui Laboratories, Bilbao, Spain

Abstract. Human seminal plasma allergy in women is an uncommon phenomenon. A great variety of reactions ranging from local swelling to generalized systemic reactions have been described, and local symptoms have often been misdiagnosed as chronic vulvovaginitis. Sperm barriers, such as condoms, are the most widely advocated method for avoiding these reactions; however this is not acceptable to couples who wish to have children. We present a case of a woman with human seminal plasma allergy who became pregnant after a fourth cycle of artificial insemination. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting showing an IgE binding band at 28kDa in the husband's seminal fluid identified the culprit allergen. Artificial insemination is an effective way to achieve a pregnancy in patients with seminal plasma allergy.

Key words: Human seminal plasma allergy. Artificial insemination.

Resumen. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata a líquido seminal son infrecuentes. Se han descrito una gran variedad de síntomas desde prurito localizado a reacciones sistémicas. Las reacciones sistémicas no son habituales pero lesiones crónicas o recurrentes a nivel local podrían ser más frecuentes y estar, actualmente, infradiagnosticadas. El uso de métodos anticonceptivos de tipo barrera se ha recomendado para prevenir reacciones alérgicas en estas pacientes pero esta opción no es válida para las parejas que quieren tener descendencia. Se presenta el caso de una mujer con alergia al líquido seminal que tras el cuarto ciclo de inseminación artificial ha conseguido quedar embarazada. En el estudio *in vitro* del líquido seminal del marido mediante poliacrilamida-dodecilo sulfato sódico y posterior inmunotransferencia se observó una banda fijadora de 28 kDa como alérgeno responsable. Aunque actualmente existen diferentes tratamientos válidos en la alergia al líquido seminal humano, la inseminación artificial es un método efectivo para obtener el embarazo.

Palabras clave: Alergia a líquido seminal humano. Inseminación artificial.

Introduction

Immediate hypersensitivity reactions to human seminal fluid have been increasingly recognized and documented. However, no accurate data on the prevalence of such reactions are available, although the disorder appears to be more common than previously believed [1]. Only a few cases involve generalized systemic reactions and seminal plasma allergens have been found in the range from 12 to 75kDa [2-4], and immunotherapy has been recommended. We report a case of successful pregnancy after only 4 cycles of artificial insemination following diagnosis of human seminal plasma allergy by skin prick test before the artificial insemination procedure. Furthermore, a single allergen was identified by immunoblotting as responsible for the anaphylactic reaction.

Case Description

A 38-year-old nulligravida was referred for allergy evaluation because of an anaphylactic reaction after sexual intercourse. She had a history of postcoital facial erythema and angioedema, dyspnea, and breathlessness.

These symptoms occurred immediately after ejaculation during intercourse and she reported that reactions had begun several years earlier. The husband had been the patient's only sexual partner. Although she explained that the use of condoms had completely abolished the symptoms, this option was not acceptable since the couple wanted to start a family.

She had a family and personal history of atopy. At the age of 18 she was diagnosed with bronchial asthma and sensitization to dog epithelium; some years later she began immunotherapy to dog epithelium.

Because the patient wanted to become pregnant an allergy study was carried out and she was enrolled in the artificial insemination program.

Skin Prick Tests

The skin prick tests were performed with a standardized technique: reactions were read after 15 minutes by measuring the mean diameter of the papule and erythema induced by the allergen. The test was considered positive when the diameter of the papule was equal to or greater than that produced by histamine, or 3 mm greater than that produced by saline solution (following the recommendations of the European Society of Allergy and Clinical Immunology) [5]. Histamine (10 mg/mL) and saline solution were used as positive and negative controls, respectively.

Prick tests with inhalant allergens, food extracts, and latex disclosed an immediate hypersensitivity to dog epithelium as the only positive result. The patient had had a dog at home for 10 years. Human and bovine serum albumin (BSA) (Bial-Aristegui, Bilbao, Spain) prick tests were negative. Subsequently, prick tests with the patient's husband's fresh whole semen elicited a clearly positive response, whereas the prick with sperm devoid of seminal plasma proteins was negative. Both partners were negative for human immunodeficiency virus. Prick tests with human seminal plasma were not performed in control subjects for ethical reasons because of the risk of sensitization or infection.

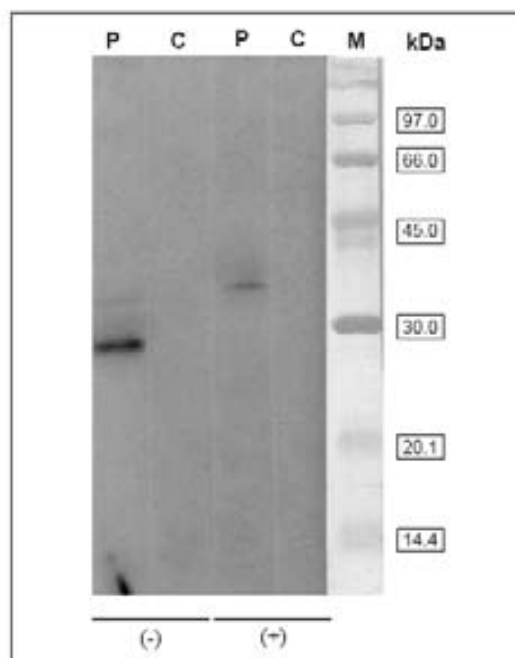
In Vitro Allergy Tests

Total IgE and seminal fluid-specific serum IgE were measured by fluorescent-enzyme immunoassay (CAP-System, Pharmacia, Uppsala, Sweden). The total IgE determination was 329 kU/L (normal value, <100 kU/L), the concentration of specific IgE to dog epithelium and seminal fluid were 30.8 kU/L and 0.91 kU/L, respectively.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) immunoblotting was carried out with the husband's whole seminal plasma with and without 2-mercaptoethanol. The immunoblotting identified IgE-binding bands of 34.6 kDa and 28 kDa in 2-mercaptoethanol-treated and non-treated samples, respectively (Figure).

Artificial Insemination

The husband's seminal fluid was processed to remove allergenic components. Artificial insemination was performed following a previously published protocol [6]. Four artificial insemination cycles were performed, the last of which resulted in a successful pregnancy.



Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting. Lane P, patient's serum. Lane C, control serum (pool from nonatopic subjects' serum). Lane M, molecular weight pattern. (+) indicates 2-mercaptoethanol treated samples; (-) samples not treated with 2-mercaptoethanol.

Discussion

Immediate hypersensitivity reactions to human seminal fluid range from local swelling to generalized systemic reactions [1, 2, 7-9]. Local symptoms may be more frequent than systemic reactions but are underdiagnosed. The third decade of life is the commonest period for the appearance of clinical manifestations. In some cases, hypersensitivity reactions to seminal plasma have occurred after an intercourse-free period, such as after pregnancy, hysterectomy, menopause, or partial prostatectomy in the partner. Although the most common mechanism to explain this clinical picture is an IgE mediated reaction, type III and IV immunological reactions have been documented [2]. In our patient the reaction was IgE mediated.

Since the first reports in which the humoral immune response suggested serum sickness-like reaction 6 to 10 days after follicle aspiration, BSA present in the follicle rinsing has been suspected [10, 11]. Other anaphylactic reactions related to the BSA and penicillin used in the semen culture medium have also been described after artificial insemination [12-14]. These causes were not involved in our patient.

Several seminal plasma allergens have been characterized and their molecular masses reported to range

from 12 to 75 kDa [2-4]. In our patient, an IgE-binding band of 34.6 kDa was identified in SDS-PAGE immunoblotting treated with 2-mercaptoethanol and another of 28 kDa in the untreated SDS-PAGE. Allergenic antigens could reside in a glycoprotein fraction of seminal plasma since allergenicity of the fluid is not changed after a vasectomy [2].

Sperm barriers are usually recommended to prevent allergic reactions in human seminal plasma-allergic patients. However, this is not an acceptable alternative for couples who wish to achieve pregnancy. Therefore, other options like artificial insemination have been proposed. Two cases of patients with allergy to both latex and seminal plasma have been described [15].

In 1981, Shapiro et al [16] reported the first successful induction of pregnancy after artificial insemination in a woman with human seminal fluid allergy. In that case, 7 cycles of artificial insemination were performed and a pregnancy was achieved. Another case of successful pregnancy after artificial insemination with sperm devoid of seminal plasma proteins was described by Iwashashi et al [17]. In both cases, more than 4 cycles of insemination were required.

In 1967 Halpern et al [18], were the first to try immunotherapy to treat human seminal allergy. Subsequently, attempts with parenteral immunotherapy have been reported using a conventional method or, more recently, a rush protocol [2, 3, 19]. In recent decades, local intravaginal desensitization has been reported [2, 4, 20, 21]. This treatment option does not require complicated preparation and could be an alternative for treating seminal plasma-allergic patients. To maintain the tolerant state after all these treatments, patients need to have regular unprotected sexual activity.

This case of successful pregnancy after only 4 cycles of artificial insemination confirms this approach as an alternative for patients with human seminal plasma allergy who wish to become pregnant. Immunoblotting showed the 28 kDa allergen to be responsible for the reaction in our patient and application of washed semen as normally used in the artificial insemination protocols circumvented the allergic reaction.

References

- Bernstein JA, Sugumaran R, Bernstein DI, Bernstein L. Prevalence of human seminal plasma hypersensitivity among symptomatic women. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1997;78:54-8.
- Shah A, Panjabi C. Human seminal plasma allergy: a review of a rare phenomenon. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:827-38.
- Ohman JL, Malkiel S, Lewis S, Lorusso JR. Allergy to human seminal fluid. Characterization of the allergen and experience with immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:103-7.
- Park JW, Ko SH, Kim CW, Bae SW, Hong C. Seminal plasma anaphylaxis: successful pregnancy after intravaginal desensitization and immunodetection of allergens. *Allergy*. 1999;54:990-3.
- European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Position paper: allergen standardization and skin tests. *Allergy*. 1993;48(Suppl):48-82.
- Tur R, Barri PN, Coroleu B, Buxaderas R, Martinez F, Balasch J. Risk factors for high-order multiple implantation after ovarian stimulation with gonadotrophins: evidence from a large series of 1878 consecutive pregnancies in a single centre. *Human Reprod*. 2001;16(10):2124-9.
- Prandini M, Marchesi S. Allergy to human seminal fluid: a case of self-diagnosis. *Allergy*. 1999;54:530.
- Chen WW, Baskin M. A 33-year-old woman with burning and blistering of perivaginal tissue following sexual intercourse. *Ann Allergy Clin Immunol*. 2004;93:126-30.
- Tomikata A, Suzuki K, Akamatsu H, Matsunaga K. Anaphylaxis to human seminal plasma. *Allergy*. 2002;57(11):1081-2.
- Cisteró A, Rigo M, Coroleu B, Ribera M, Barri P. IgG antibodies in front of bovine albumin in patients under in vitro fertilization. *Allergologie*. 1989;Kongressausgabe, XIVe Congress EAACI Berlin: 95.
- Moneret-Vautrin A, Wal J-M, Guillet-Rossof F, Gerard H. Bovine serum albumin immunization: a new risk of allergy during protocols for in vitro fertilization. *Allergy*. 1991;46:228-34.
- Orta M, Ordoqui E, Aranzabal A, Fernández C, Bartolomé B, Sanz ML. Anaphylactic reaction after artificial insemination. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;90:446-51.
- Matheu V, Caloto M, Barrio M, Baeza ML, Rubio M. Life-threatening anaphylaxis after artificial insemination. *Lancet*. 2002;359:1779.
- Al-Ramahi M, Leader A, Léveillé MC. An allergic reaction following intrauterine insemination. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3368-70.
- Yocum MW, Jones RT, Yunginger JW. Concurrent sensitization to natural rubber latex and human seminal fluid. *J Allergy Clinical Immunol*. 1996;98(6):1135-6.
- Shapiro SS, Kooistra JB, Schwartz D, Yunginger JW, Haning RV. Induction of pregnancy in a woman with seminal plasma allergy. *Fertil Steril*. 1981;36:405-7.
- Iwashashi K, Miyazaki T, Kuji N, Yoshimura Y. Successful pregnancy in a woman with a human seminal plasma allergy. A case report. *J Reprod Med*. 1999;44(4):391-3.
- Halpern BN, Ky T, Robert B. Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitization to human seminal fluid. *Immunology*. 1967;12:247-58.
- Drouot M, Sabbah A, Hassoun S. Thirteen cases of allergy to human seminal plasma. *Allergy*. 1997;52(1):112-14.
- De Cuiper C, Bogaerts Y, Vanderkerckhove F, Gunst J. Intravaginal desensitization and successful pregnancy in a woman with seminal fluid allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1427-8.
- Nusam D, Geva A, Kalderon I, Cohen S. Intravaginal desensitization to seminal fluid. *Allergy*. 1999;54:765.

Laila Ferré-Ybarz, MD

Allergy Department
 Institut Universitari Dexeus UAB
 Pg. Bonanova 69-72
 08017 Barcelona, Spain
 Email: laiafy@hotmail.com

Segon article

Allergy to human seminal fluid: cross-reactivity with dog dander

Basagaña M, Bartolomé B, Pastor C, Torres F, Alonso R, Vivanco F, Cisteró-Bahíma A

J Allergy Clin Immunol. 2008 Jan; 121(1): 233-9

Resum

Introducció: L'al·lèrgia al líquid seminal humà és infreqüent, amb símptomes que poden anar des de pruija vulvovaginal fins a quadres d'anafilaxi que poden arribar a comprometre la vida. S'han descrit múltiples al·lèrgens implicats en el trastorn, amb un pes molecular que oscil·la entre 12 i 75 kDa. Recentment l'antigen prostàtic específic (PSA) ha estat identificat com a al·lèrgen causal en un cas d'al·lèrgia al líquid seminal humà. Ja que en molts casos el trastorn apareix o bé immediatament o bé poc després del primer coit, s'ha postulat la possibilitat que un fenomen de reactivitat encreuada estigui implicat en aquests casos.

Objectius: Detectar la presència de reactivitat encreuada IgE entre al·lèrgens de l'epiteli de gos i líquid seminal humà i intentar identificar els al·lèrgens implicats.

Mètodes: Es varen seleccionar 41 pacients amb al·lèrgia a epiteli de gos. Una d'elles presentava episodis d'anafilaxi postcoital per al·lèrgia a les proteïnes del líquid seminal humà del seu marit. Per estudiar el patró de proteïnes fixadores d'IgE i la reactivitat encreuada potencial entre proteïnes de l'epiteli de gos i el líquid seminal humà, a tots se'ls van realitzar tests cutanis, determinacions d'IgE específiques, SDS-PAGE *immunoblotting* i test d'inhibició. Es va usar la tècnica d'espectrometria de masses per identificar les proteïnes involucrades en les reaccions.

Resultats: El vint-i-quatre per cent dels sèrums de pacients al·lèrgics a l'epiteli de gos reconeixien una banda fixadora d'IgE de 28 kDa en l'*immunoblotting* del líquid seminal humà. L'espectrometria de masses va identificar aquesta banda com a PSA. SDS-PAGE *immunoblotting*-inhibició mostrava una inhibició completa de la banda IgE fixadora quan els sèrums eren preincubats amb extracte de caspa de gos.

Conclusions: Aquest estudi demostra la presència de reactivitat encreuada entre el PSA i una proteïna de la caspa de gos. L'al·lèrgia a l'epiteli/caspa de gos podria ser considerat com un factor de predisposició a patir al·lèrgia al líquid seminal.

Implicació clínica: L'al·lèrgia a l'epiteli de gos podria estar implicada per un mecanisme de reactivitat encreuada en problemes de reproducció (infertilitat).

Allergen articles

Allergy to human seminal fluid: Cross-reactivity with dog dander

Maria Basagaña, MD,^a Borja Bartolomé, MD, PhD,^b Carlos Pastor, MD, PhD,^c Ferran Torres, MD, PhD,^{d,e} Rosario Alonso, MD,^a Fernando Vivanco, MD, PhD,^{f,g} and Anna Cisteró-Bahima, MD, PhD^a *Barcelona, Bilbao, and Madrid, Spain*

Background: Human seminal plasma (HSP) allergy is uncommon, with symptoms ranging from vulvovaginal pruritus to life-threatening anaphylaxis. Although several seminal plasma allergens have been reported and their molecular masses have been estimated to range between 12 and 75 kd, the prostate-specific antigen (PSA) has recently been identified as a causative allergen. Given that in a large number of cases symptoms appeared during or after the first intercourse, a cross-reactivity phenomenon might be implicated.

Objective: We sought to assess the presence of IgE cross-reactivity among proteins from dog epithelium and HSP and to attempt to identify the allergens involved.

Methods: Forty-one patients with dog epithelium allergy were selected. One of them experienced anaphylaxis in contact with her husband's seminal plasma. Skin prick tests, serum specific IgE measurements, SDS-PAGE immunoblotting, and inhibition tests were performed to study the pattern of IgE-binding proteins and the potential cross-reactivity between HSP and dog epithelium. Mass spectrometry was carried out to identify the protein involved in allergy reactions.

Results: Twenty-four percent of the sera from patients with dog epithelium allergy recognized an IgE-binding band of 28 kd in HSP immunoblotting. Mass spectrometry identified this band as the PSA. SDS-PAGE immunoblotting-inhibition showed a complete IgE-binding inhibition when sera from these patients were preincubated with dog dander extract.

Conclusions: IgE cross-reactivity among proteins from dog dander and human PSA is demonstrated.

(*J Allergy Clin Immunol* 2008;121:233-9.)

Key words: Allergen characterization, cross-reactivity, dog epithelium allergy, human seminal plasma allergy, prostate-specific antigen

Abbreviations used

EAST:	Enzyme Allergo Sorbent Test
HSP:	Human seminal plasma
HSPA:	Human seminal plasma allergy
MALDI-TOF:	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MS:	Mass spectrometry
PSA:	Prostate-specific antigen

Human seminal plasma allergy (HSPA) in women is rare. Only 80 cases in the English literature have been reported since the first mention of HSPA in 1967 by Halpern et al.¹ The third decade of life has been found to be the most frequent period of appearance of this disorder, and an IgE-mediated response is the most common etiopathogenetic mechanism. In clinically sensitive subjects skin prick tests against human seminal plasma (HSP) produce a typical wheal-and-flare response, and a measurable serum specific IgE antibody has been detected.² Atopy status has been pointed out as an important predisposing factor to this infrequent phenomenon.³

In 40% of patients with HSPA, symptoms begin during or after the first sexual intercourse. Symptoms usually occur either immediately, during, or after coitus, and a gradual reduction in the time of onset of symptoms and a gradual worsening of symptoms over the course of time have been reported.⁴ The hypothesis that the sensitization agent would be an unknown antigen that cross-reacts with some of the proteins present in HSP was originally proposed by Halpern et al¹ several years ago, but until now, it has not been demonstrated. Another unclear point of this disease is whether the clinical manifestations occur only with one particular partner or if they appear after coitus with more than one sexual partner. Both situations have been reported, but there are many cases in which this information is lacking.²

Concerning the allergen involved, several IgE-binding antigens have been found, and their molecular masses were reported to range from 12 to 75 kd. However, there is no solid information concerning the precise characterization and origin of the responsible allergen, although a possible prostate origin has been suggested.¹

Recently, a case report demonstrated the presence of specific IgE antibodies against prostate-specific antigen (PSA) in the serum from a woman with HSPA.⁴ Despite technologic advances in recent years, few of the proteins detected in seminal fluid have been fully characterized. A comprehensive analysis of the peptide and protein components of human seminal fluid was performed by combining gel electrophoresis (1-dimensional

From ^athe Allergy Department, Institut Universitari Dexeus, Universitat Autònoma de Barcelona; ^bLaboratorio Iñal-Aristegui, I+D, Bilbao; ^cSIC Ingenieros SLL, Madrid; ^dthe Biostatistics and Epidemiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona; ^ethe Department of Clinical Pharmacology, Hospital Clínic, Barcelona; ^fthe Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid; and ^gthe Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complutense, Madrid.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication June 5, 2007; revised October 9, 2007; accepted for publication October 10, 2007.

Available online December 3, 2007.

Reprint requests: Maria Basagaña, MD, Allergy Department, Institut Universitari Dexeus, Passeig de la Bonanova 67-69, E-08017 Barcelona, Spain. E-mail: 34917mbi@comb.es.

0091-6749/\$34.00

© 2008 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2007.10.008

and 2-dimensional) with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)/mass spectrometry (MS), electrospray ionization (ESI) liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), and database searching. The majority of the detected proteins were identified as modified forms of PSA, prostate acid phosphatase, Zn- α -2-glycoprotein, clusterin, semenogelin I, and semenogelin II.⁵

We have recently published the case of a 38-year-old nulligravida woman who experienced anaphylactic reactions after sexual intercourse with her husband since her first coitus. The husband had been her unique sexual partner. As a personal allergy history, she only mentioned bronchial asthma with sensitization to dog epithelium. The use of sperm barrier methods completely abolished the symptoms, but it was not acceptable at the time she wanted to become pregnant. The identification of the responsible allergen as a 28-kd allergen and the application of washed semen (free from this protein) in the artificial insemination allowed achievement of pregnancy and avoided an allergic reaction.⁶

This research was performed with the following objectives: (1) to characterize the 28-kd allergen involved in the case of HSPA previously reported,⁶ (2) to study the presence of cross-reactivity between this allergenic protein and some component of dog epithelium, and (3) to determine the percentage of patients with dog epithelium allergy in which serum IgE antibodies reacting with the 28-kd antigen from the HSP were present.

METHODS

Subjects

Between September 2004 and September 2005, all consecutive patients given diagnoses of dog epithelium hypersensitivity at the Allergy Department of Institut Universitari Dexeus (Barcelona, Spain) were eligible to participate in the study. The patients were selected based on a clear history of dog epithelium allergy and positive skin test responses against this allergenic source. Patients provided written informed consent, and the study was approved by the hospital ethics committee.

A short questionnaire was distributed among participants. The questionnaire was designed to collect the following information: age, sex, symptoms manifested by exposure to dog epithelium, symptoms manifested by exposure to other mammal epithelia, first clinical sensitization to mammal epithelium, treatment desensitization to dog epithelium, and symptoms experienced in contact with HSP.

Allergen sources and extracts

Seminal fluid was collected by condom from the partner of the patient with HSPA and was used to perform all the *in vitro* assays. Recombinant Can f 1 and recombinant Can f 2 (Department of Clinical Microbiology, University of Kuopi, Kuopi, Finland) was produced and purified, as previously described.⁷ Defatted dog epithelium and dog dander (Greer Laboratories, Lenoir, NC) were extracted by means of magnetic stirring during agitation in 50 mmol/L PBS at pH 7.5 for 4 hours at room temperature. The sample was centrifuged at 5600g for 30 minutes, and the supernatant was dialyzed against water. The dialyzed extract was filtered through a membrane with 0.22- μ m-diameter pores.

Skin prick test

Skin prick tests with dog epithelium (3 mg/mL) and dander (1.3 mg/mL) extracts and a panel of other mammal epithelia, including rat, mouse, hamster, cat, cow, pork, lamb, guinea pig, and rabbit (Bial-Aristegui, Bilbao, Spain), were performed according to a standard procedure⁸ on the volar side of the forearm by means of puncture with the Prick Lancettes Dome (Hollister-Stier, Spokane, Wash). One sterile device was used for each test. Histamine phosphate

(10 mg/mL) and sterile 0.9% saline were used as positive and negative controls, respectively. A mean wheal area of 7 mm² or greater compared with that elicited by the negative control 15 minutes after puncture was considered a positive response.

Specific IgE determination

Specific IgE measurement against human seminal fluid, dog epithelia, and dog dander was carried out by using the Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST). The solid phase was obtained by coupling the seminal fluid (2 mg/mL) and dog extract (10 mg/mL) to the 6-mm-diameter cyanogen bromide-activated paper discs, as described by Ceska and Lunqvist.⁹ The EAST was performed, and results were expressed in accordance with the manufacturer's instructions (Specific IgE EIA kit; HYTEC, Hycor Biomedical Ltd, Penicuik, United Kingdom). A pool of sera from nonallergic subjects was used as a negative control.

SDS-PAGE immunoblotting and inhibition

SDS-PAGE was carried out according to the method of Laemmli¹⁰; 12.5% and 4% acrylamide were used for separating and stacking gels, respectively. Samples were dissolved in 0.125 mol/L HCl-Tris (pH 6.8) and were denatured with 0.1% SDS at 100°C for 5 minutes when nonreducing conditions were used. According to the technique of Bradford,¹¹ 20 μ g of protein was applied per lane.

After electrophoresis, gels were stained by means of diffusion in 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 dissolved in methanol/acetic acid/distilled water (4:1:5). Separated protein bands were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride, essentially as described by Towbin et al,¹² and blocked for 1 hour at room temperature with 0.1% Tween-20 and 5% fish collagen in Tris-buffered saline. Membranes were incubated overnight at 4°C with the patient's serum, followed by antihuman IgE-horse radish peroxidase conjugate incubation and detection with the chemoluminescence method, as recommended by the manufacturer (ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buck, United Kingdom).

When Western inhibition assays were performed, the patient's serum was preincubated with different inhibitor phases (dog epithelium or dog dander extracts) overnight at 4°C, and then membranes were incubated with the patient serum sample obtained.

EAST inhibition

EAST inhibition was performed according to methods reported by Yman et al.¹³ HSP was used as the solid phase, and the patient's serum was preincubated with dog dander extract (1.8 mg/mL) and Can f 1 and Can f 2 recombinant molecules at 120 μ g/mL (Department of Clinical Microbiology, University of Kuopi, Kuopi, Finland).

Protein identification and characterization by means of MS

The proteins of interest were identified by means of MS. The bands selected were cut out from the gels with a sterile scalpel and subjected to in-gel trypsin digestion according to the method of Shevchenko et al,¹⁴ with some modifications. The in-gel digests were purified as described by Gobom et al.¹⁵ Peptides were analyzed by using a Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation instrument (Applied Biosystems, Foster City, Calif), and positively charged ions were analyzed in reflector mode by using delayed extraction with the following settings: acceleration voltage of 20 kV, grid of 72%, delay time of 300 ns, 100 shots per spectrum, and mass range of 800 to 3500 d. Spectra were calibrated by using trypsin autolysis products, resulting in a mass accuracy of less than 50 ppm. Peptide fingerprinting was analyzed by using Data Explorer software (Applied Biosystems, Foster City, Calif). In addition, the identification was confirmed by means of MS/MS in a MALDI-TOF/TOF 14700 Protein Analyzer (Applied Biosystems). Protein identification was performed by searching a nonredundant protein sequence database (National Center for Biotechnology Information) with the Mascot program (<http://www.matrixscience.com>). The following parameters were

used: monoisotopic mass accuracy of less than 50 ppm, 1 missed cleavage, and allowed carbamidomethylation modifications of cysteine (complete), methionine, and pyroglutamic acid (partial).

Statistical analysis

Demographic, clinical, and laboratory data of patients with and without the 28-kd IgE-binding band recognition were compared. Categorical data are expressed as frequencies and percentages, and continuous data are presented as means and SDs. The χ^2 test, the Student *t* test, the Mann-Whitney *U* test, and Spearman correlation were used for the analysis of data. Statistical analysis was performed with SAS version 9.1.3 software (SAS Institute, Inc, Cary, NC). Statistical significance was set at a *P* value of less than .05.

RESULTS

The study population included 41 patients, 30 women and 11 men, aged between 7 and 67 years, who presented with a clear history of dog epithelium allergy with positive skin prick test responses to dog epithelium extracts, dog dander extracts, or both and with serum specific IgE to 1 or both allergenic sources of greater than 0.35 kU/L. There were no statistical differences between the groups of patients with and without HSP 28-kd IgE-binding band recognition regarding the mean age, sex, and clinical manifestations of dog allergy. In addition, 2 patients whose IgE recognized the protein of 28 kd presented with a sexual disease (HSPA in one and infertility of unknown cause in the other). The presence of sexual disorders was significantly more frequent among patients with 28-kd IgE-binding band recognition compared with that in the group without recognition of this protein (*P* < .0107). No case of sexual disease was observed among the population of patients with dog allergy who did not recognize the protein.

The percentage of patients with clinical symptoms related to dog allergy only and not allergy to other mammals was also significantly higher among those with serum specific IgE against the HSP 28-kd IgE-binding protein (*P* < .0004). Moreover, 80% of patients in this group were monosensitized to dog. The difference was statistically significant (*P* < .001).

The main demographic characteristics and allergy history of the study patients are summarized in Table I.

SDS-PAGE of HSP showed multiple protein bands with an apparent molecular mass ranging from 14 to 120 kd (Fig 1, A). IgE immunoblotting of this sample in nonreducing conditions and incubated with the serum of the woman with anaphylaxis revealed 2 IgE-binding bands, a clear band of 28 kd and a faint band of 32.7 kd. However, when reducing conditions were used, only a faint band of 34.6 kd was observed (Fig 1, B, and Fig 2, lane 29), indicating that after reduction of the disulfide bridges, the protein unfolds, and thus its apparent molecular mass increases. In nonreducing conditions similar results were obtained with 9 other sera from the studied group (9+1/41 [Fig 2, lanes 4, 10, 14, 16, 28, 29, 31, 36, 39, and 41] or 24% of the sera). An additional IgE-binding band of 53 kd was revealed with 3 of the sera, but it also appeared with sera from atopic patients with pollinosis who were not allergic to dog epithelium (data not shown).

The patient with clinical seminal fluid allergy had an IgE titer to complete HSP of 5 kU/L. Results in the other 9 patients with dog epithelium allergy who reacted to this band were as follows: 1.5, less than 0.35, less than 0.35, 0.7, 0.6, 0.4, less than 0.35, 1.5, and 3.4 kU/L. The serum from the anaphylactic patient showed the highest specific IgE level against HSP.

TABLE I. The main demographic characteristics and allergy history of the selected patients

	PSA recognition		<i>P</i> value
	No (n = 31)*	Yes (n = 10)*	
Age (y), mean (SD)	33.52 (14.17)	35.80 (9.35)	.637
Sex (female)	24 (77.4%)	6 (60.0%)	.279
Sexual disease	0 (0%)	2 (20.0%)	.010
Dog allergy			
Rhinoconjunctivitis	25 (81%)	5 (50%)	.057
Asthma	21 (67.7%)	6 (60.0%)	.653
Cutaneous	4 (12.9%)	1 (10.0%)	.807
Subclinical	1 (3.2%)	1 (10.0%)	.387
Other mammal allergy	18 (58.1%)	1 (10.0%)	<.001
Hyposensitization to dog	6 (19.4%)	3 (30.0%)	.480
Skin prick test to dog	31 (100.0%)	10 (100.0%)	NA
Skin prick test to cat	24 (77.4%)	2 (20.0%)	.001
Skin prick test to other epithelia	14 (45.2%)	3 (30.0%)	.473

NA, Not applicable.

*Descriptive statistics are presented as numbers (percentages) unless otherwise indicated.

EAST inhibition assays were performed with the serum from the patient with HSPA to investigate whether HSP proteins cross-reacted with Can f 1 and Can f 2, the 2 major dog epithelium allergens. The results showed that Can f 1 and Can f 2 recombinant allergens as inhibitors (120 μ g/mL) were not able to avoid any level of IgE-binding activity to seminal fluid, whereas in the same assay dog dander extract (1.8 mg/mL) produced a total inhibition (data not shown).

SDS-PAGE immunoblotting inhibition in nonreducing conditions showed a complete inhibition (both IgE-binding bands disappeared) when the serum of the anaphylactic patient was preincubated with dog dander extract at 1 mg/mL (Fig 3). A 5-fold concentration was necessary to obtain the same result with dog epithelium extract (data not shown). A similar inhibition result was obtained with the sera from patients 4, 36, 39, and 41 (data not shown).

The 28-kd IgE-binding band from the HSP was identified by means of MS and turned out to be the PSA. Sixty-five percent coverage was obtained by means of MALDI analysis, with 4 peptides identified. A score of 125 was generated by using the Mascot program, corresponding to human PSA. The MS/MS analyses of 3 peptides yielded the sequences IVGGWECEK, HSQPWQVLVASR, and AVCGGVLVHPQWVLTAAHCIR, which match with positions 1 to 9, 10 to 21, and 22 to 44 in the PSA sequence (Fig 4).

DISCUSSION

HSPA in women is rare. There is little information on the nature of the antigen involved in HSPA. The molecular mass of several seminal plasma allergens have been described ranging from 12 to 75 kd, but the origin of the allergens, as well as whether there is only 1 or multiple allergenic components involved in HSPA, is unclear.

Several years ago, Halpern et al¹ proposed that the allergy symptoms experienced by some women after their first sexual intercourse might be caused by a previous sensitization to unknown antigens that cross-react with HSP proteins; however, to our knowledge, this hypothesis has not been previously

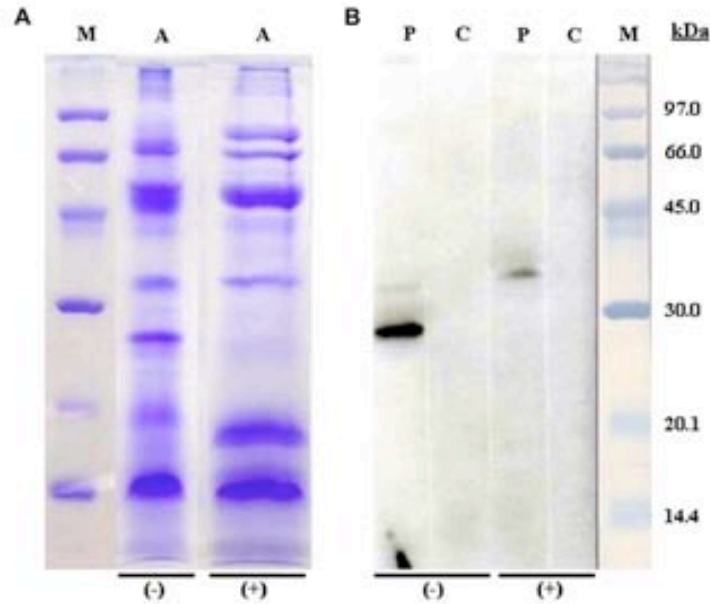


FIG 1. A, SDS-PAGE after Coomassie Brilliant Blue R-250 staining; lane A, HSP; lane M, molecular mass marker. B, IgE immunoblotting; lane P, patient serum; lane C, control serum (pool from nonatopic subject sera). The + and - symbols indicate the presence and absence of β -mercaptoethanol, respectively.

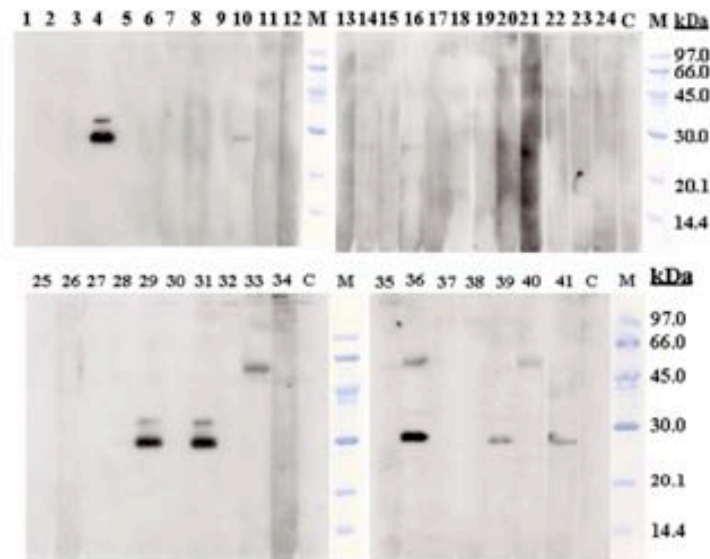


FIG 2. IgE immunoblotting; lanes 1-41, patient sera; lane C, control serum (pool from nonatopic subject sera); lane M, molecular mass markers. Samples are without β -mercaptoethanol.

demonstrated. Given that we encountered a patient with dog epithelium allergy who experienced an anaphylactic reaction in her first sexual intercourse, we examined the possibility of cross-reactions between both HSP and dog epithelium.

Dog allergens have been involved in mammal protein cross-reactivity. Can f 3, dog albumin, which is an important allergen

for up to 35% of patients with dog epithelium allergy, has been demonstrated to show IgE cross-reactivity with other serum albumins, such as cat, mouse, chicken, and rat albumin, and significantly with human albumin as well.¹⁶⁻¹⁹

We identified and characterized by means of MS the responsible allergen in the HSP anaphylactic reaction here

studied, and it turned to be the PSA, a kallikrein protein with serine protease activity that is present at levels of 0.5 to 2 mg/mL in HSP. The possible prostate origin of the HSP allergens, confirmed in our study by means of allergen characterization, was proposed by Levine et al²⁰ several years ago. They fractionated a pool of seminal plasma obtained from 4 vasectomized men, isolated a protein of 20 to 30 kd as the responsible allergen, and proposed its prostate origin because a filtered extract of prostate tissue caused positive cutaneous reactions in sensitized women.

The HSP immunoblot in nonreducing conditions carried out with the serum from the anaphylactic patient showed 2 IgE-binding bands of 28 and 32 kd, respectively. The 28-kd protein was identified as the mature form of the PSA. This enzyme is synthesized as a polypeptide of 261 amino acids (pre-pro-enzyme), which in its mature form consists of a single polypeptide chain of 237 amino acids with 5 disulfide bridges that correspond to a molecular mass of approximately 26 kd. The backbone contains a carbohydrate moiety attached at asparagine 45 that increases the mass by another 2 to 3 kd to the total mature molecular mass of 28 kd, as we observed. The 32-kd IgE-binding band detected was one of the intermediate forms of the PSA, which is corroborated by the simultaneous disappearance of both IgE-binding bands in the blotting inhibition assay. The disappearance of the 28-kd IgE-binding band in the HSP immunoblotting under reducing conditions is in accordance with the presence of 5 disulfide bridges that maintain the tertiary structure of the protein.

Members of the kallikrein family are becoming of clinical interest because of their potential as prognostic biomarkers, particularly for hormone-dependent cancers. PSA or human kallikrein 3 has long been an effective biomarker for prostate cancer.²¹ There were 37 kallikreins described as allergens in animals and fungi, including dust mites, Hymenoptera, fungal species, and PSA belonging to the *Homo sapiens* group.²²

Surprisingly, the responsible allergen was a protein omnipresent in human prostate secretions; however, it is unclear why the number of women affected is very small. It might be postulated that the majority of female subjects might induce tolerance with current sexual intercourses and also through the participation of the complex homeostatic mechanism in the female genital tract that modulates recognition of antigens of HSP.²³ Although the exact prevalence of HSPA is unknown,²⁴ probably minor forms of this disorder, such as local reactions, are misdiagnosed as chronic vulvovaginitis.

The occurrence of allergic reactions to an antigen of human origin is always of biologic interest. The human body contains numerous endogenous proteins structurally related with others present in mammals, as described with lipocalins, and the immune system has to adapt to their presence. It has been proposed that under these conditions the immune response against the lipocalin allergens, which are structurally related to endogenous lipocalin proteins, might be the pathway to allergy in genetically predisposed persons.²⁵⁻²⁷ The same mechanism might be applied to other allergens with homologous endogenous counterparts, such as kallikreins.

Because of the low prevalence of allergy to HSP and after the cross-reactivity between HSP and dog dander in the first studied patient was demonstrated, blood samples from 40 other patients with dog allergy were collected. We carried out immunoblotting with HSP. The 28-kd IgE-binding band, identified as a PSA, was observed in 10 lanes. This represents a prevalence of 24.4%

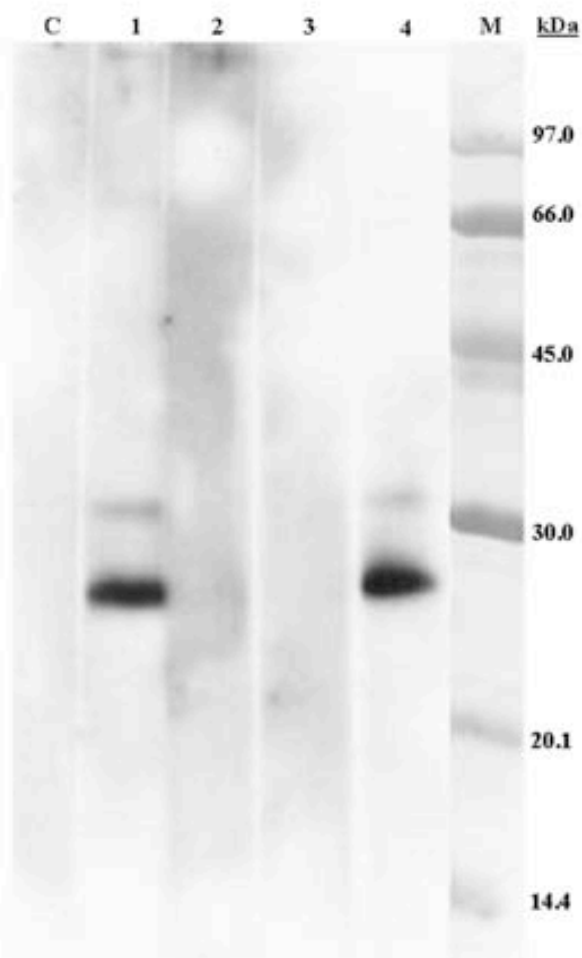


FIG 3. IgE immunoblotting inhibition: lane C, control serum (pool from nonatopic subject sera); lane 1, patient serum; lane 2, patient serum previously incubated with HSP; lane 3, patient serum previously incubated with dog dander extract; lane 4, patient serum previously incubated with lamb extract; lane M, molecular mass markers. Samples are without β -mercaptoethanol.

(10/41). There were significant statistical differences between the total population of patients with dog allergy and the group with dog allergy that recognizes the protein of 28 kd. Six of 10 of these patients were women, and 2 had a history of infertility. The HSP-specific IgE titers observed in the sera from these 2 women with infertility problems were among the highest detected (1.5 and 5 kU/L), and both revealed a strong 28-kd IgE-binding band in HSP Western blotting assay (Fig 2, lanes 4 and 29). The significance of this sensitization in male subjects is unknown.

The exact prevalence of dog allergy is unknown, but De Groot et al²⁸ found that in their own patient population, the incidence of dog dander allergy was 17% compared with an incidence of cat dander allergy of 24%. In a recent epidemiologic study carried out in Spain, an increased prevalence of sensitization to mammals' epithelia was observed. The mammal's epithelia represent the third most frequent cause of sensitization in rhinitis and

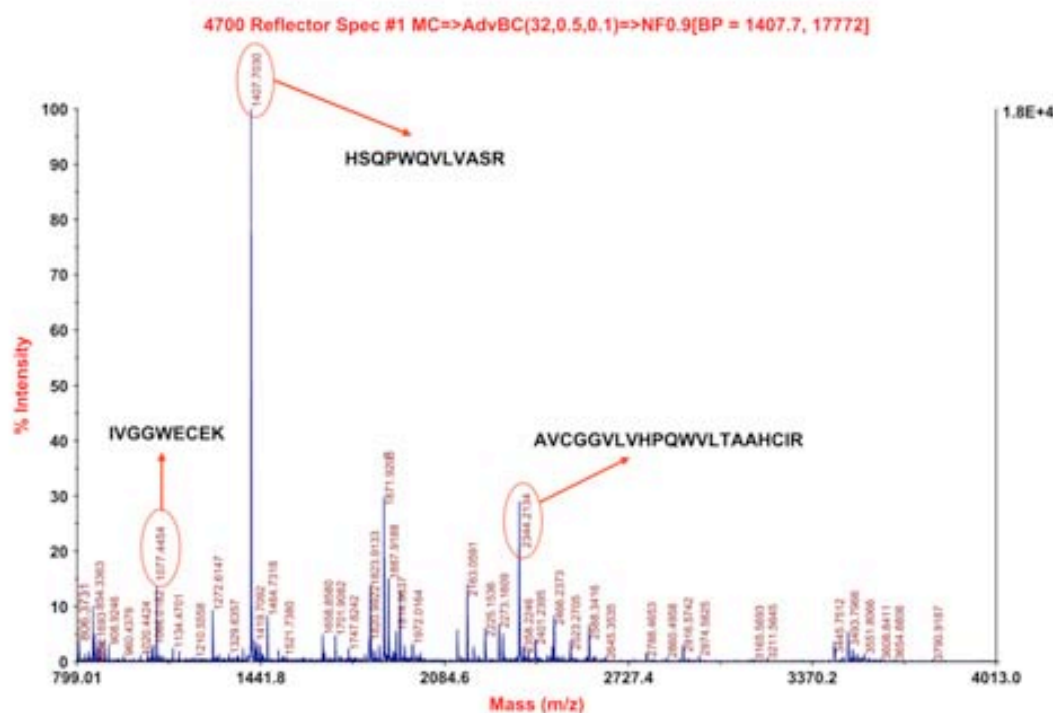


FIG 4. Identification by means of MS. Peptide fingerprinting of the 28-kd protein is shown. The signaled peaks were analyzed by means of MS/MS, obtaining the amino acid sequence.

asthma. In the subgroup of rhinitis, the most relevant epithelium was cat epithelium, followed by horse epithelium. Despite this, dogs were the animal most frequently present in the household of patients as a pet (25.9%), and no case of sensitization to dog epithelium among patients with rhinitis was observed. In the subgroup of patients with asthma, the most important sensitization to mammals' epithelia was also cat epithelium, followed by dog epithelium (15.3% and 13.7%, respectively).²⁹ Among the population with dog allergy, it is uncertain how many patients are monosensitized to dog. Many patients with cat allergy are also allergic to dog. It has been postulated that shared IgE epitopes of the major cat and dog allergens might provide an explanation for this clinical observation.³⁰ Recently, cross-reactivity between Fel d 1 and a protein from dog dander has been described. This is the first report demonstrating the presence of a Fel d 1-like allergen in dog dander extracts that might be responsible for *in vitro* double positivity to cat and dog.³¹ In our study in the group that recognized the 28-kd allergen of HSP, there were 8 (80%) of 10 patients monosensitized to dog compared with the other group, in which there were 7 of 31 (22.6%) monosensitized. We have not found any statistically significant relationship between HSP-specific IgE levels and the severity of dog allergy symptoms. However, because of the limited sample size, a correlation between higher IgE levels and the presence of asthma cannot be excluded. In fact, the *P* value was .095 (Mann-Whitney *U* test) when studying whether the IgE levels were higher in patients with asthma symptoms (either alone or associated to rhinoconjunctivitis). IgE levels presented a linear correlation with the class global assessment (*P* < .001, *r* = 0.98, Spearman nonparametric correlation test).

The prevalence of monosensitization to dog epithelium found in the studied group is higher than that observed in daily practice. In this group there were 3 to 10 patients who followed a specific immunotherapy regimen to dog epithelium, in all cases with low response to this desensitization treatment. Probably these patients recognize some allergens that have not yet been characterized. The poor effectiveness of dog allergen-specific immunotherapy has been described by Lilja et al.³² The effect of immunotherapy with dog dander extract is less convincing than that with cat epithelium, and this might be caused by a less suitable extract, probably caused by the absence or low level of some of its allergens clinically relevant for some selected patients.

Two interesting points were the 5-fold concentration required with dog epithelium extract versus dog dander to produce the same IgE-binding inhibition on PSA immunoblotting and the higher specific IgE values detected against dog dander versus dog epithelium in those sera with detectable specific IgE against human seminal fluid (data not shown). Therefore the cross-reactive allergen is in a higher percentage in terms of weight in dander than in epithelium dog extract. This finding supports the hypothesis that the dog PSA cross-reactive protein is a dander protein, and we should test dog dander extract and not only dog epithelium to detect the kind of patients described in this article.

An interesting finding of the study was the fact that the cross-reactivity described is not with the major dog allergen (Can f 1/Can f 2).

In the current study we demonstrated the presence of cross-reactivity between HSP and dog dander and identified the HSP allergen involved as PSA. In addition, 24% of patients with dog

allergy showed serum specific IgE antibodies against the PSA from HSP. An increasing number of patients are needed to confirm these interesting preliminary findings.

We thank Dr Tuomas Virtanen from the Department of Clinical Microbiology, University of Kuopio, Kuopio, Finland, for providing recombinant Can f 1 and recombinant Can f 2. We thank C. Sastre, B. Zabala, and A. Merino for technical assistance and Dr Marta Pulido for editing the manuscript and editorial assistance.

Clinical implications: Dog epithelium allergy might be a risk for HSP allergy.

REFERENCES

- Halpern BN, Ky T, Robert B. Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitization to human seminal fluid. *Immunol* 1967;12:247-59.
- Shah A, Panjabi C. Human seminal plasma allergy: a review of a rare phenomenon. *Clin Exp Allergy* 2004;34:827-38.
- Weidinger S, Mayerhofer A, Raemisch R, Ring J, Kohn FM. Prostate-specific antigen as allergen in human seminal plasma allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:213-5.
- Weidinger S, Ring J, Kohn FM. IgE-mediated allergy against human seminal plasma. *Chem Immunol Allergy* 2005;88:128-38.
- Fung K, Glode LM, Green S. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate* 2004;61:171-81.
- Ferré-Ybarz L, Basagaña M, Coroleu B, Bartolomé B, Cistero-Bahima A. Human seminal plasma allergy and successful pregnancy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:314-6.
- Saarelahti S, Taivainen A, Rytönen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantylarvi R, et al. Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1576-82.
- Malling HJ. Allergen standardisation and skin tests. *Methods of skin testing. Allergy* 1993;48(suppl 14):55-6.
- Ceska M, Lunqvist U. A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 1972;9:102-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Towbin H, Staehelin Y, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
- Yman L, Pommerius G, Brandt R. RAST-based allergen assay methods. *Dev Biol Stand* 1975;29:151-65.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov A, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14440-5.
- Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 2002;74:3915-23.
- Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, et al. Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 1991;94:346-8.
- Spitzauer S, Schweiger C, Sperr WR, Pandjaitan B, Valenta R, Muhl S, et al. Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:614-27.
- Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky-Pichler F, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. *Escherichia coli* expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:279-85.
- Boose D, Praus M, Kiesling P, Nyman L, Andresen C, Waters J, et al. Phase I comparability of recombinant human albumin and human serum albumin. *J Clin Pharmacol* 2005;45:57-67.
- Levine BB, Siraganian RP, Schenkein L. Allergy to human seminal plasma. *N Engl J Med* 1973;288:894-6.
- Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery—what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999;162:293-306.
- Mari A. Importance of databases in experimental and clinical allergology. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:88-96.
- Bernstein IL, Englander BE, Gallagher JS, Nathan P, Marcus ZH. Localized and systemic hypersensitivity reactions to human seminal fluid. *Ann Intern Med* 1981;116:209-65.
- Bernstein JA, Sugumaran R, Bernstein DI, Bernstein L. Prevalence of human seminal plasma hypersensitivity among symptomatic women. *Ann Allergy Immunol* 1997;78:54-8.
- Virtanen T, Zeiler T, Mantylarvi R. Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic? *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:247-58.
- Virtanen T, Zeiler T, Rautianen J, Mantylarvi R. Allergy to lipocalins: a consequence of misguided T-cell recognition of self and nonself? *Immunol Today* 1999;20:398-400.
- Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:259-69.
- De Groot H, Goei HGH, Van Swieten P, Aalberse R. Affinity purification of a major and minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f 1 and Can f 1-depleted extract. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:1056-65.
- SEAI. *Alergológica 2005: factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. 1st ed. Madrid: Luzan; 2005.
- Spitzauer S, Pandjaitan B, Muhl S, Ebner C, Kraft D, Valenta R, et al. Major cat and dog allergens share IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:100-6.
- Reminger R, Varga EM, Zach M, Balic N, Lindemeier AD, Swoboda I, et al. Detection of an allergen in dog dander that cross-reacts with the major cat allergen, Fel d 1. *Clin Exp Allergy* 2007;37:116-24.
- Lilja G, Sundin B, Graff-Lonnevig V, Hedling G, Heilboen H, Noerlind K, et al. Immunotherapy with cat and dog-dander extracts. Effects of two years of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:37-44.

Tercer article

Involvement of Can f5 in a case of Human Seminal Plasma Allergy

Maria Basagaña, Borja Bartolomé, Carlos Pastor-Vargas, Lars Mattsson, Jonas Lidholm; and Moises Labrador-Horrillo

International Archives of Allergy and Immunology. En premsa. 201107012. Submitted: 04/01/2012 Current Status: Accepted

Resum

Introducció: L'existència de bandes fixadores d'IgE en l'extracte de caspa de gos en absència d'anticossos IgE davant dels al·lèrgens coneguts de gos (Can f 1, 2, 3 i 4) implica la presència d'altres al·lèrgens de gos encara no identificats. Recentment, una banda fixadora d'IgE ha estat aïllada de l'orina de gos i identificada com la cal·licreïna prostàtica; s'ha anomenat Can f 5.

Prèviament ja s'havia descrit la reactivitat encreuada entre una proteïna de la caspa de gos i el PSA humà.

Objectiu: Identificar l'al·lergen present en la caspa de gos que presenta reactivitat encreuada amb el PSA i demostrar la seva rellevància clínica en una pacient.

Mètodes: Es varen realitzar assajos SDS-PAGE *immunoblotting* i assajos d'inhibició. Es va usar la metodologia d'espectrometria de masses per identificar la proteïna involucrada en la reacció al·lèrgica.

Resultats: SDS-PAGE-inhibició amb una proteïna fixadora d'IgE de la secreció prostàtica de gos demostra una inhibició total de la proteïna de 28 kDa identificada com a PSA. La proteïna electroeluída de la secreció prostàtica de gos va ser identificada per espectrometria de masses com a Can f 5. IgE immunoblotting del líquid seminal humà amb el sèrum de la pacient amb al·lèrgia al líquid seminal humà, demostra la presència de dues bandes fixadores d'IgE (28 kDa i 32.7 kDa). Ambdós SDS-PAGE immunoblotting-inhibició, tant amb líquid seminal humà com amb PSA purificat en fase sòlida, demostren una inhibició completa quan el sèrum de la malalta és preincubat amb extracte de caspa de gos a concentració de 1 mg/mL i rCan f 5 a concentració de 10 µgr/ml.

Conclusions: L'al·lergen de la caspa de gos que presenta reactivitat encreuada amb el PSA plasmàtic ha estat caracteritzat i resulta ser el recentment descrit Can f 5. En aquest treball demostrem la rellevància clínica en una pacient d'aquesta reactivitat encreuada.

Involvement of Can f 5 in a case of human seminal plasma allergy.

Maria Basagaña, MD¹, Borja Bartolome, PhD², Carlos Pastor Vargas, PhD³, Lars Mattsson, PhD⁴, Jonas Lidholm, PhD⁴; and Moises Labrador Horrillo, MD, PhD⁵.

¹ Allergy Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain.

² Laboratorios Bial-Aristegui, R&D, Bilbao, Spain

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

⁴ Phadia AB, Uppsala, Sweden.

⁵ Allergy Department, Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Corresponding Author:

Maria Basagaña

Allergy Department

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.

Carretera del Canyet s/n. 08916 Badalona

Tel: 93- 497 88 51.

Fax: 93-274 61 69

E-mail: maria.basagana.torrento@gmail.com

Word count: 1461

Figures: 1

Short title: Clinical relevance of cross-reactivity between Can f5 and PSA.

Introduction:

Human seminal plasma allergy (HSPA) is a rare phenomenon but the exact prevalence of this condition is unknown. Several seminal plasma allergens have been described, ranging in molecular mass between 12 and 75 kDa¹

In two separate studies of HSPA, prostate specific antigen (PSA) has been identified as the causative allergen.^{2,3} In one of these studies, cross-reactivity between human PSA and dog dander proteins was demonstrated.²

In a recently concluded epidemiological study carried out in Spain⁴, an increased prevalence of sensitization to animal epithelia was observed. These epithelia represent the third most common cause of sensitization in rhinitis and asthma.

Dog dander is an important cause of allergy respiratory symptoms, including rhinoconjunctivitis, asthma and bronchial inflammation. Among described dog allergens, Can f 1, Can f 2 and Can f 4 are all members of the lipocalin protein family and have been purified and expressed as recombinant proteins.^{5,6} Can f 3, dog serum albumin, is a highly conserved protein and antibodies directed to Can f 3 cross-react extensively with albumin of other animal species.⁷ Approximately 50% of dog allergic patients present IgE antibodies against Can f 1, 20% against Can f 2 and 15-40% against Can f 3 and Can f 4.⁶

Recently, a new IgE binding protein was isolated from dog urine, identified as prostatic kallikrein and named Can f 5. The protein was shown to be present also in dog dander and among the dog allergic subjects analysed in that study, Can f 5 bound IgE antibodies from 70% of sera of dog allergic patients tested so it was found to be a major dog allergen.⁸

Methods:

Here we present the case of a 38-year-old nulligravida woman who experienced anaphylactic reactions after sexual intercourse since her first coitus, previously described by our group.^{2, 9} The patient was monosensitized to dog dander since she was 18 years old and she had been suffering from bronchial asthma due to this sensitization.

The patient reported on the presence of a dog at home since she was a teenager and now she has frequent dog contact. The patient also followed a specific immunotherapy to dog epithelium for one year after the beginning of HSPA symptoms, the treatment was discontinued because of the low response to this desensitization treatment. The patient provided written informed consent and the study was approved by the hospital ethical committee.

Allergen Source:

Seminal fluid was collected by condom from a healthy donor. It was used to perform all the in vitro assays.

Samples of dog prostatic secretions were collected at the Small Animals reproduction Service of the Veterinary Faculty at UAB (Universitat Autònoma de Barcelona). Prostatic secretions were collected by manual manipulation of the dog's penis. Untreated samples were used to performed all the in vitro assays.

Skin prick test

Skin prick tests with dog epithelium (3 mg/mL) and dander (1.3 mg/mL) extracts were performed according to a standard procedure.⁹ Histamine phosphate (10 mg/mL) and sterile 0.9% saline were used as positive and negative controls, respectively. A mean wheal area of 7 mm² or greater compared with the negative control, 15 minutes after puncture, was considered a positive response.

Specific IgE Determination

Serum specific IgE against dog dander, dog epithelium and human seminal plasma were performed using ImmunoCAPS regular test by Phadia. Test results were expressed as kU/L, according to manufacture instructions. CAP results higher than 0.35 kU/L were considered positive.

EAST inhibition

EAST inhibition was performed according to methods reported by Yman et al.¹⁰ HSP was used as the solid phase, and the patient's serum was preincubated with dog dander extract (1.8 mg/mL) and Can f 1 and Can f 2 recombinant molecules at 120 µg /mL (Department of Clinical Microbiology, University of Kuopi, Kuopi, Finland).

SDS-PAGE immunoblotting and inhibition tests

To perform the in vitro assays, seminal fluid from a healthy human donor, prostatic secretions collected from two different dogs, purified PSA from human semen (Sigma-Aldrich) and purified recombinant Can f 5 were used.

SDS-PAGE was carried out according to the method of Laemmli.¹¹ When reducing conditions were used samples were dissolved in 62 mM HCL-Tris, pH 6.8 and were dissociated with 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol at 100 °C for 5 minutes; in non-reducing conditions 2-mercaptoethanol was not added. When western-inhibition assays were performed, patient serum was preincubated with different inhibitor phases (Can f 5_at 10 µg/mL) overnight at 4°C; then membranes were incubated with the patient serum sample obtained

Mass spectrometry

Bands were extracted from the gel, digested with trypsin, and the proteins were identified by mass spectrometry (MS), as previously described.¹²

Results:

The patient showed positive Skin Prick Test to dog dander and dog epithelium. Serum IgE titer was 5 kU/l to complete human seminal plasma, 7.5 kU/l to dog epithelium, 8.9 kU/l to dog dander, and 95 kU/L to dog prostatic secretion

EAST inhibition assays were performed with the serum from the patient with HSPA to assess whether HSP proteins crossreacted with Can f 1 and Can f 2, the 2 major dog epithelium allergens. The results showed that Can f 1 and Can f 2 recombinant allergens as inhibitors (120 µg /mL) were not able to reduce the IgE antibody binding to seminal fluid, whereas in the same assay dog dander extract (1.8 mg/mL) produced a total inhibition (data not shown). This result is consistent with the absence of known homologues of Can f 1 and Can f 2 in HSP.

Immunoblotting assay in reducing conditions with patient serum using 2 samples of dog prostatic secretions in solid phase revealed two IgE binding bands of 31 and 17-18 kDa (Panel 1, Figure 1).

The IgE binding bands in dog prostate secretions (31 and 17-18 kDa) were identified by mass spectrometry and turned out to match with the recently described Can f 5 (arginine esterase peptidase S1 family; kallikrein subfamily).⁸ In order to examine the relationship to human PSA, the 31 kDa band was electroluted and used as inhibitor in IgE-immunoblotting inhibition experiments. Pre-incubation of the anaphylactic patient's serum with this protein, at a concentration of 50 µg/mL, caused complete inhibition of IgE binding to PSA in HSP Immunoblotting inhibition assay (non shown results) as well as to the 17-18 kDa in dog dander Immunoblotting inhibition assay in reducing conditions (Panel 2, Figure 1). The PSA inhibition is explained by the sequence homology described between the dog prostate arginine esterase (31 kDa band) and the human PSA as both proteins belong to the kallikrein subfamily, and the inhibition on the 17-18 kDa dog dander protein by the aforementioned Can f 5 presence in dog dander.

IgE immunoblotting in no-reducing electrophoretic conditions of human seminal plasma, incubated with serum of the patient with HSPA, revealed an IgE-binding band of 28 kDa and a faint one of 32.7 kDa (the 28-kDa protein was identified as PSA as we previously described²) (Panel 3, Figure 1). Pre-incubation of this serum with either dog

dander extract (1 mg/ml) or purified rCan f 5 (10 µg/ml) caused complete inhibition of IgE binding to both bands (Panel 3, Figure 1). Furthermore SDS-PAGE immunoblotting-inhibition assay using purified PSA from human semen (Sigma- Aldrich) in solid phase and dog dander extract (1 mg/ml) and rCan f 5 (100 µg/ml) as inhibitors, showed the capacity of both samples to produce a total IgE binding inhibition on the purified PSA protein (Online Supplemental Figure 1).

Discussion:

In this studied case of a dog dander sensitized patient displaying HSPA, Can f 5 is clearly identified as a dog allergen cross-reactive with PSA from human seminal plasma.

We have noted with several serum determinations that high concentrations of IgE antibodies against Can f 5 are accompanied by weak positive responses to HSP ImmunoCAP. Unlike the HSPA case presented here, it appears that these low IgE levels against HSP typically do not elicit allergy symptoms (unpublished observations).

Mattsson L et al⁸ described Can f 5 molecular weight about 28 kDa in nonreducing conditions and two bands about 18 and 10 kDa under reducing conditions in urine and dander. In this way, this article describes Can f 5 expressed in *P. pastoris* gives two bands, one of about 31 kDa and another of about 18 kDa, as we describe in our manuscript. Differences are probably due to proteins purified from these natural sources (urine, dander) has been degraded. 31 kDa protein was purified from the original source (prostatic secretions) in a natural form without degradation

In conclusion, studying a patient with anaphylactic HSPA, we have demonstrated cross-reactivity between the allergenic protein from HSP, PSA, and the recently characterized dog allergen Can f 5, suggesting that dog protein sensitization may in some cases be relevant to HSPA, perhaps as a predisposing factor or as an environmental booster of the immune response against PSA.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Teresa Rigau and Dr. Maria Montserrat Rivera from Reproduction Service Hospital small animal Veterinary Medicine to UAB for providing prostatic dog secretions and to Dr. Jordi Rodriguez from Sabater-Tobella Laboratories, Sperm Bank for providing healthy donor's semen. We thank C. Sastre, B. Zabala, and A. Merino for technical assistance.

References

- ¹ Halpern BN, Kyt Robert B. "Clinical and immunological study of an excepcional case of reaginic type sensitization of human seminal fluid". *Immunol* 1967;12: 247-59.
- ² Basagaña M, Bartolome B, Pastor C et al. "Allergy to human seminal fluid: Cross-reactivity with dog dander". *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:233-239.
- ³ Weidinger S, Mayerhofer A, Raemsch R, Ring J, Kohn FM." Prostate-specific antigen as allergen in human seminal plasma allergy". *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:213-5.
- ⁴ SEAIC. "Alergológica 2005: Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005". 1st ed. Madrid (Spain). Luzan Editors.
- ⁵ Saarelainen S, Taivainen A, Rytönen-Nissinen M et al. "Assessment of recombinant dog allergens Can f1 and Can f2 for the diagnosis of dog allergy". *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1576-1582.
- ⁶ Mattsson L, Lundgren T, Olsson P, Sundberg M, Lidholm J. "Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander". *Clin Exp Allergy*. 2010, 40:1276-1287.
- ⁷ Cabañas R, López-Serrano MC, Carreira J et al. "Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens". *J Investig Allergol Clin Immunol* 2000;10:71-7.
- ⁸ Mattsson L, Lundgren T, Everberg , Lidholm J. "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen". *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:362-368.
- ⁹ Ferré-Ybarz L, Basagaña M, Coroleu B, Bartolomé B, Cistero-Bahima A." Human seminal plasma allergy and successful pregnancy". *J Investing Allergol Clin Immunol* 2006;16:314-6.
- ¹⁰ Malling HJ. "Allergen standardisation and skin tests. Methods of skin testing". *Allergy* 1993;48(suppl 14):55-6.
- ¹¹ Yman L, Ponterius G, Brandt R. "RAST-based allergen assay methods". *Dev Biol Stand* 1975;29:151-65.
- ¹² Laemmli U K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T". *Nature* 1970; 277: 680-685.
- ¹³ Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Pérez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M, Vivanco F. "Identification of major allergens in watermelon". *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149:291-8.

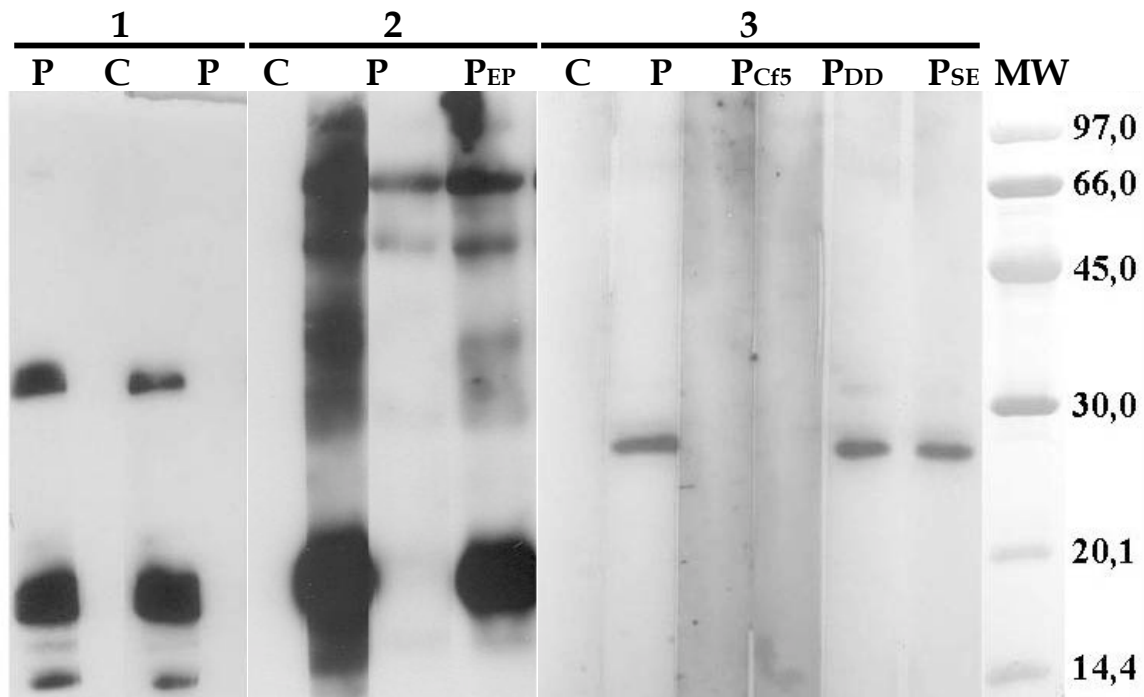
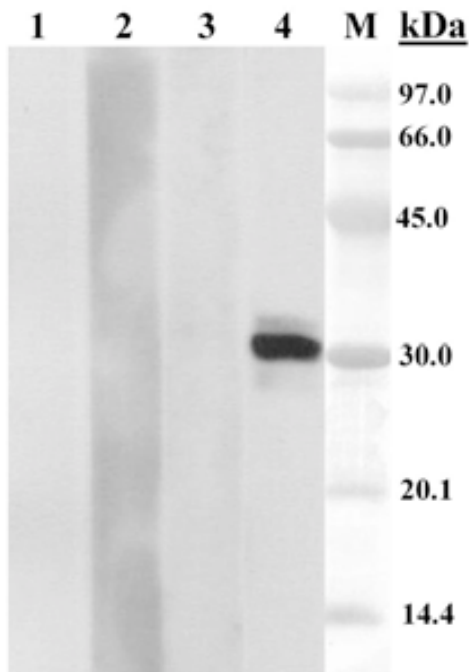


Figure 1

IgE- Immunoblotting results. Reducing conditions Panels 1 and 2; non-reducing condition Panel 3. Panel 1 shows two samples of dog prostatic secretions incubated with serum from patient with HSPA (Lane P) and with a pool of sera from non atopic patients (Lane C). Panel 2 shows dog dander incubated with serum of patient with HSPA: non preincubated (Lane P), preincubated with 31 kDa electroeluted protein at 50µg/ml (Lane P_{EP}), preincubated with BSA at 50µg/ml (Lane P_{BSA}). Panel 3 shows human seminal plasma from healthy donor incubated with serum from patient with HSPA: non preincubated (Lane P), preincubated with Can f 5 at 10µg/ml (Lane P_{Cf5}), preincubated with dog dander extract at 1mg/ml (Lane P_{DD}), preincubated with shrimp extract at 1mg/ml (Lane P_{SE}), preincubated with BSA at 10µg/ml (Lane P_{BSA}). Lane C, solid phase incubated with a pool of sera from non atopic patients. Lane MW. Molecular Weight standard.



Online Supplemental Figure 1

IgE- Immunoblotting results (in non-reducing conditions). Purified PSA in solid phase. Lane 1: control serum (pool of sera from non atopic subjects); lanes 2, 3, 4: patient's serum previously incubated with dog dander extract (1mg/ml), or purified rCan f 5 (100 μ l/ml), or BSA (100 μ l/ml), respectively. Lane M: Molecular weight standard.

Primer apèndix

Component resolved diagnosis of dog allergy

Maria Basagaña, Olga Luengo, Lars Mattsson, Jonas Lindholm, Teresa Garriga, Moisés Labrador-Horrillo, and Victoria Cardona

29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology

Londres, Regne Unit, 2010.

Resum

Introducció: Fins ara, dues lipocalines, Can f 1 i Can f 2, i una albúmina sèrica, Can f 3, han estat caracteritzats en detall com a al·lèrgens de gos. Recentment, ha estat descrit un nou al·lèrgen major de gos, la cal·licreïna prostàtica (Can f 5). L'objectiu d'aquest estudi és avaluar pacients al·lèrgics a la caspa de gos mitjançant el diagnòstic per components, per tal d'establir la rellevància de cadascun d'aquests al·lèrgens en la nostra població.

Mètodes: En 70 sèrums de pacients al·lèrgics al gos es varen determinar els valors d'IgE davant de Can f 1, Can f 2 i Can f 3, amb la plataforma ImmunoCAP ISAC® i valors d'IgE davant de Can f 5 recombinant usant ImmunoCAP® (Phadia). Tots els pacients presentaven una història d'al·lèrgia a gos amb símptomes respiratoris (asma o rinoconjuntivitis), i tests cutanis positius i valors positius d'IgE específica davant de l'extracte de caspa de gos.

Resultats: De tots els sèrums testats, 47 (67%) mostraven una reactivitat de tipus IgE al Can f 5. Can f 1, Can f 2 i Can f 3 eren al·lèrgens menors entre els pacients estudiats: van fixar IgE en 29 pacients (41,4%), 10 pacients (14,3%) i 14 pacients (20%), respectivament. A més, 27/70 sèrums (39%) no reaccionaven a cap d'aquests tres al·lèrgens. 26/70 (37%) dels sèrums reaccionaven únicament davant de rCan f 5. Només 4/70 sèrums no presentaven reactivitat de tipus IgE amb cap dels quatre al·lèrgens testats.

Conclusions: El Can f 5 és un al·lèrgen major en la nostra població d'al·lèrgics al gos i considerant que fins a un 37% dels nostres pacients eren monosensibilitzats a aquest al·lèrgen, la seva inclusió en panells per diagnòstic per components milloraria significativament la seva sensibilitat. Can f 1, Can f 2 i Can f 3 són al·lèrgens menors en la nostra població.

Segon apèndix

Sensibilització al líquid seminal humà i caspa de gos en una població de dones amb esterilitat per causa desconeguda

Sessió de Professors Invitats del Servei d'Andrologia de l'Hospital de Sant Pau. Fundació Puigvert

Barcelona, gener de 2012.

Resum

Fins a l'actualitat no hi ha cap referència publicada que associï l'HSPA i la infertilitat, més enllà del problema que presenten aquestes pacients per concebre a causa de la seva impossibilitat de mantenir relacions sexuals desprotegides.⁹⁴

La infertilitat és una única condició mèdica però que engloba a dos individus "la parella". Es defineix com la incapacitat de concepció després de 12 mesos de relacions sexuals freqüents sense usar contracepció en dones menors de 35 anys; o després de 6 mesos de relacions sexuals freqüents sense contracepció en dones de més de 35 anys. Un estudi poblacional sobre causes d'infertilitat demostra que fins en un 28% dels casos la causa de la infertilitat és desconeguda.¹²⁰ Dins d'aquesta divisió, cal tenir present la infertilitat immunològica, en què els anticossos antiesperma juguen un paper clau. Els anticossos antiesperma (ASA) que són majoritàriament d'isotipus IgG o IgA, són policlonals tant en homes com en dones, és a dir, es dirigeixen a més d'un antígen de l'esperma. Alguns d'aquests anticossos tindran importància en la infertilitat immunològica i altres no. Només aquells que vagin dirigits a proteïnes crucials en la fertilitat podran produir infertilitat.¹²⁷ En aquest sentit, el anticossos dirigits contra el PSA, tot i que, en el nostre cas són de tipus IgE i no IgA o IgG, com és habitual en els ASA, a priori, sí que podrien tenir un paper en la infertilitat, ja que el PSA és produït essencialment en la glàndula prostàtica per liquidar el semen ejaculat i permetre un medi on els espermatozous es puguin moure lliurement. També es creu que és útil per dissoldre la capa mucosa cervical permetent l'entrada dels espermatozous.^{136, 137}

Ja que en un treball previ del nostre grup¹⁹⁹ es demostrava que entre els pacients al·lèrgics al gos que presentaven IgE específica davant del PSA, una malalta presentava trastorns relacionats amb la fertilitat (infertilitat no estudiada), varem reclutar 43 dones tractades al Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona per una infertilitat per causa desconeguda. Durant l'any 2010, totes les dones amb

esterilitat per causa desconeguda que acudien a l'Hospital de Sant Pau varen ser proposades per participar a l'estudi i les que varen signar el consentiment informat varen ser incloses. A totes se'ls va sol·licitar una analítica amb determinació d'IgE específica davant d'epiteli de gos, epiteli de gat i líquid seminal, així com IgE total. A totes se'ls va passar un petit qüestionari en què es recollien dades demogràfiques, com l'edat, i també s'hi incloïen unes preguntes sobre: a) símptomes d'al·lèrgia respiratòria (rinoconjuntivitis o asma amb el contacte amb epitelis animals); b) a les que havien respost que sí a la primera pregunta se'ls demanava si havien rebut immunoteràpia específica davant d'epitelis; c) si tenien contacte habitual amb gat o gos; d) si presentaven alguna simptomatologia amb el contacte amb semen.

La població estudiada tenia una edat mitja de 35,4 anys, 2/43, és a dir, un 4,6% referia clínica respiratòria davant del contacte amb epitelis. Cap de les pacients incloses a la mostra havia rebut immunoteràpia específica amb epitelis. 5/43, és a dir, un 11,6% referia contacte habitual amb animals. Tan sols una pacient (2,3%) havia presentat clínica amb el contacte amb semen i es tractava d'una urticària generalitzada postcoital que només s'havia produït en una ocasió. La IgE total mitja era de 106,7 KU/L amb un rang de 2,76 KU/L a 355 KU/L. Totes les pacients estudiades tenien un CAP negatiu (< 0.1 KU/L) davant de líquid seminal; una pacient tenia un CAP a epiteli de gat de 1,83 KU/L i la mateixa pacient tenia un CAP a gos de 0,82 KU/L.

En cap cas s'ha trobat sensibilització al líquid seminal i la sensibilització a la caspa i l'epiteli de gos detectades en aquesta població és inferior a la de la trobada en població general;⁴³ per tant, d'això es pot inferir que l'HSPA no seria una condició causal en pacients amb esterilitat per causa desconeguda.

Tercer apèndix

Tenen tots els sèmens el mateix potencial al·lèrgic?

Maria Basagaña

Jornada de Cloenda SCAIC, 2008

Treball presentat com a comunicació oral.

Resum

L'al·lèrgia al líquid seminal humà és un fenomen infreqüent amb símptomes que van des de pruija local vulvovaginal a quadres d'anafilaxi que poden arribar a comprometre la vida de la pacient. La prevalença exacta del fenomen es desconeix i tampoc no hi ha informació sòlida sobre l'al·lèrgen que el produeix. S'han descrit una gran varietat d'al·lèrgens implicats amb uns pesos moleculars que oscil·len entre 12 i 75 kDa, però l'origen d'aquests al·lèrgens, així com el nombre de components al·lèrgens implicats continuen incerts.⁹³

Recentment, el nostre grup¹⁹⁹ ha identificat per espectrometria de masses el PSA, l'antigen prostàtic específic, com l'al·lèrgen responsable en un cas d'HSPA. Segons el nostre coneixement, és el segon cas d'HSPA publicat a on l'al·lèrgen causal és identificat, i en els dos casos el PSA és l'al·lèrgen responsable.¹⁰⁰

Un altre punt obscur d'aquesta malaltia és la incertesa de si l'al·lèrgia al líquid seminal humà apareix exclusivament amb una única parella sexual o si, contràriament, la reacció al·lèrgica pot aparèixer amb el contacte amb el semen de subjectes diferents. Ambdues situacions han estat publicades i en la literatura mèdica hi ha molts casos clínics publicats en què aquesta informació no apareix.⁹³

Per estudiar aquesta qüestió, i tenint en compte la baixa prevalença del trastorn, varem usar 8 sèrums de pacients al·lèrgics al gos que presentaven IgE específica davant de la proteïna de 28 kDa (de la mostra de deu pacients del segon article de la tesi, dos varen discontinuar el seguiment), identificada com a PSA per espectrometria de masses, per realitzar SDS-PAGE *immunoblotting* usant 40 sèmens de donants sans.

Breument, les bandes proteiques separades electroforèticament mitjançant SDS-PAGE varen ser transferides a una membrana de polifluorur de vinilidè (PVDF), tal com descriuen Towbin i col·laboradors¹⁹⁵ i bloquejades durant una hora a temperatura

ambient amb tampó Tris amb 0,1% Tween-20 i 5% de llet desnatada (TBST). A continuació, les membranes varen ser incubades durant tota la nit a 4 °C amb el sèrum dels pacients (dilució 1:5), seguit per la incubació amb un anticòs de conill anti-IgE humana (dilució 1:2.000) marcat amb peroxidasa de rave (HRP) i detecció mitjançant un mètode de quimoluminiscència tal com recomana el fabricant (ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buck, Regne Unit).

Els resultats de l'*immunoblotting* en condicions no reductores (sense 2-mercaptoethanol), varen revelar dues bandes IgE fixadores, una clara i ben marcada de 28 kDa i una menys intensa de 32,7 kDa, en totes les mostres de líquid seminal testades amb tots els sèrums provats. (a la Figura 6 adjuntem els *immunoblottings* dels pacients 4, 36 i 29 (HSPA).) La intensitat del senyal IgE obtinguda amb cadascuna de les bandes fixadores d'IgE sobre diversos sèmens de donants és diferent, però cada semen, analitzat de manera individual, presenta la mateixa intensitat amb tots el sèrums (forta o dèbil), cosa que indica que la concentració de PSA en els diversos sèmens és diferent, i això pot ser degut tant a polimorfismes individuals del donant com al temps d'abstinència previ a la recollida de la mostra.

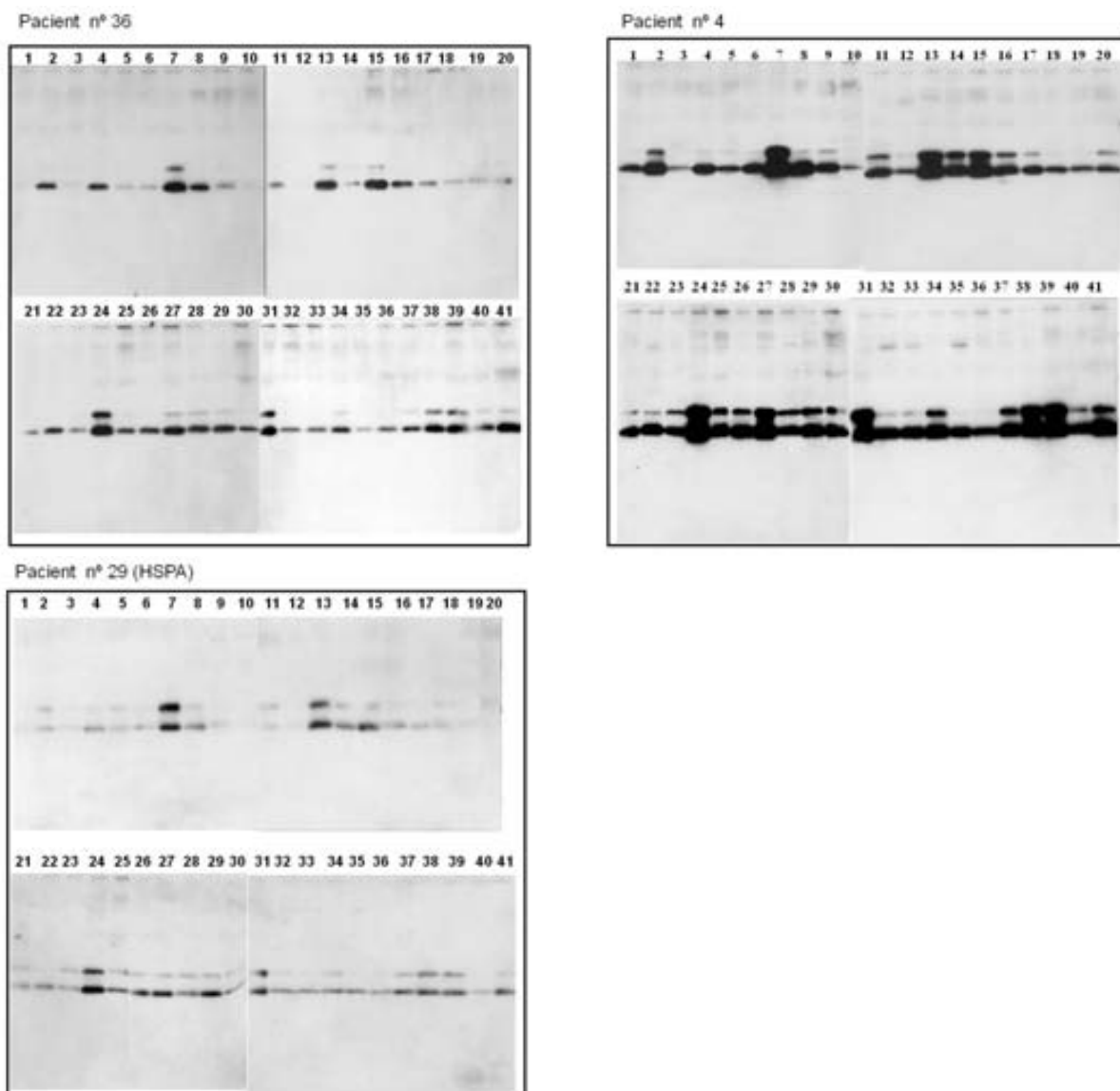


Figura 6 Immunoblotting amb el sèrum dels pacients al·lèrgics al gos que reconeixen la proteïna identificada com a PSA (núm. 4 i 36) i el sèrum de la pacient amb HSPA (núm. 29) sobre la separació electroforètica del líquid seminal de 40 donants sans i del marit de la pacient afectada d'HSPA (carril 41).

Els dos sèrums dels malalts al·lèrgics a la caspa de gos de la Figura 6 (núm. 4 i 36) presentaven uns nivells d'IgE específica al líquid seminal humà de 1,5 KU/l i < 0,35 KU/l respectivament, però, el pacient 36 té una IgE específica a caspa de gos de 5,5 KU/l (sèrums 4 i 36 de la Taula VIII).

Taula VIII Valors d'IgE específica davant de caspa de gos, epiteli de gos i líquid seminal humà en els 10 pacients inclosos en l'estudi (pacients al·lèrgics al gos que reconeixen el PSA del líquid seminal)

Valors IgE específica						
	Epiteli de gos		Caspa de gos		Líquid seminal humà	
<i>Núm.</i>	<i>kU/L</i>	<i>Classe</i>	<i>kU/L</i>	<i>Classe</i>	<i>kU/L</i>	<i>Classe</i>
4	2,3	2	14,0	3	1,5	2
10	<0,35	0	1,6	2	<0,35	0
14	<0,35	0	3,1	2	<0,35	0
16	1,7	2	46,2	4	0,7	1
28	<0,35	0	3,9	3	0,6	1
29	7,5	3	8,9	3	5,0	3
31	0,9	2	3,2	2	0,4	1
36	<0,35	0	5,5	3	<0,35	0
39	0,5	1	12,6	3	1,5	2
41	9,3	3	63,4	4	3,4	2

S'observa una correlació positiva entre valors més alts d'IgE específica davant de la caspa de gos i davant de líquid seminal.

El nostre grup ha observat en diferents sèrums que les concentracions altes davant de Can f 5 van acompanyades de febles respostes positives davant de líquid seminal en ImmunoCAP comercial Phadia, Upssala, Suècia (o70). En tots aquests casos, al contrari del que passa amb el cas control amb HSPA presentat, sembla que aquests baixos títols d'IgE davant de líquid seminal no comporten símptomes al·lèrgics (observacions no publicades).

Els resultats d'aquest estudi demostren que IgE específiques davant del PSA d'un individu també reaccionen davant del PSA procedent de sèmens d'altres individus encara que la reactivitat és diferent in vitro. Així, és probable que les dones amb IgE específica davant del PSA manifestin símptomes al·lèrgics amb diferents intensitats davant del contacte amb un determinat semen.

Som conscients de les limitacions d'aquest estudi: primer, a causa de la naturalesa del trastorn no s'han fet proves de provocació; i, en segon lloc, donada la baixa prevalença del trastorn s'ha estudiat la qüestió en un grup particular de pacients (al·lèrgics al gos que presenten IgE específica davant de la proteïna que presenta reactivitat encreuada amb el PSA) i que aquest grup no representa exactament l'heterogeneïtat que el grup de pacients afectats d'HSPA sembla tenir. Probablement, en diversos casos d'HSPA, l'al·lèrgen involucrat pot ser diferent del PSA. Per tant, aquestes limitacions s'han de tenir en compte a l'hora d'analitzar els resultats.

La qüestió de per què l'HSPA és un trastorn tan infreqüent si l'al·lèrgen involucrat és una proteïna omnipresent en el líquid seminal humà continua sense resposta.

DISCUSSIÓ

Aquesta tesi doctoral recull diversos estudis realitzats sobre diversos aspectes de l'al·lèrgia al líquid seminal i de l'al·lèrgia a la caspa de gos, referint-se tant a la identificació molecular dels al·lèrgens implicats com a la rellevància clínica de la sensibilització i la freqüència de reconeixement d'aquests nous al·lèrgens descrits en les poblacions estudiades. Per facilitar la discussió, se seguirà l'estructura proposada en els objectius generals de la tesi.

Estudi d'un cas d'al·lèrgia al líquid seminal humà des del punt de vista molecular i caracterització dels al·lèrgens implicats

Caracterització del PSA com a al·lèrgen responsable d'un cas d'HSPA

Aquest primer objectiu s'inclou en el segon article publicat, en què hem caracteritzat l'al·lèrgen responsable en un cas d'anafilaxi per HSPA per espectrometria de masses com a PSA. Segons el nostre coneixement, és el segon cas d'HSPA publicat en què s'identifica l'al·lèrgen causal, que en ambdós casos és el PSA. El grup de Weidinger et al.⁹⁸ varen identificar el PSA com a al·lèrgen per positivitat al PSA per *prick test*, *immunoblotting*, test d'estimulació cel·lular antigènica i per test d'activació de basòfils (TAB).

El PSA és una cal·licreïna amb activitat serina-proteasa que es troba al líquid seminal humà a dosis de 0,5-2 mg/ml; en canvi, en sèrum el PSA es troba en una forma complexa amb inhibidors de la proteasa com α 1-antiquimiotripsina.²⁰⁰ És la proteasa més abundant en el líquid seminal humà, i la seva funció és degradar les molècules d'alt pes molecular sintetitzades en les vesícules seminals amb la finalitat de liquar el semen. El possible origen prostàtic de l'al·lèrgen implicat en l'HSPA ja havia estat proposat molts anys abans per el grup de Levine et al.²⁰¹ Varen usar un *pool* de líquid seminal humà procedent de 4 homes vasectomitzats i varen aïllar una proteïna d'entre 20-30 kDa com a al·lèrgen responsable, i proposaven un origen prostàtic d'aquest al·lèrgen perquè un extracte de teixit prostàtic prèviament filtrat produïa reaccions cutànies positives al *prick test* en dones sensibilitzades al líquid seminal humà. Posteriorment, això ha estat

també recolzat pel fet que l'al·lergicitat del líquid seminal no es modifica després de la vasectomia.²⁰²

L'*immunoblotting* de líquid seminal humà en condicions no reductores amb el sèrum de la pacient amb HSPA mostrava dues bandes fixadores d'IgE: una banda clara i ben marcada de 28 kDa i una banda menys intensa de 32 kDa, respectivament. Quan s'usen condicions reductores, només apareix una fina banda de 34,6 Kd, cosa que indica que després de la reducció dels ponts disulfur, la proteïna es desnatura i el seu pes molecular aparent augmenta. La proteïna de 28 Kd procedent del líquid seminal va ser identificada per espectrometria de masses com la forma madura del PSA: es va obtenir el 65% de cobertura per anàlisi MALDI, amb 4 pèptids identificats. L'anàlisi MS/MS dels 3 pèptids mostrava les seqüències IVGGWECEK, HSQPWQVLVSR, i AVCGGVLVHPQWVLTAAHCIR, que concorden amb les posicions 1 a 9, 10 a 21, i 22 a 44 en la seqüència de PSA.

Aquesta proteïna se sintetitza com un polipèptid de 261 aminoàcids (pre-proenzim), que en la seva forma madura consisteix en un única cadena polipeptídica de 237 aminoàcids amb 5 ponts disulfur que correspon a una massa molecular d'aproximadament 26 kDa. La cadena principal conté un carbohidrat a la meitat, adjunt a asparagina 45, que augmenta el pes molecular en 2-3 kDa més, fins al pes molecular total de la forma madura de 28 kDa. La banda de 32 kDa detectada és una de les formes intermèdies de PSA, fet que queda provat per la desaparició simultània de les dues bandes d'IgE en els assajos d'*immunoblotting* inhibició. La desaparició de la banda de 28 kDa en l'*immunoblotting* de líquid seminal humà en condicions reductores depèn de la presència dels 5 ponts disulfur que mantenen l'estructura terciària de la proteïna.

Des del punt de vista biomèdic, el PSA i altres membres de la família de les cal·licreïnes ja tenien un interès clínic especial abans d'identificar-lo com un al·lergen pertanyent al grup dels *Homo sapiens*, ja que la seva concentració sèrica era usada com a marcador de pronòstic, sobretot en càncers hormonodepenents.²⁰³

Un fet sorprenent de la identificació del PSA com a al·lergen causal d'HSPA és que es tracti d'una proteïna omnipresent en les secrecions prostàtiques de l'home i l'aparent baixa prevalença de l'al·lèrgia al líquid seminal humà entre les dones. Podríem suggerir que la majoria de dones indueixen una tolerància espontània amb una activitat sexual continuada i també per la participació d'un complex mecanisme homeostàtic present en el tracte genital femení encarregat de modular el reconeixement d'antígens del líquid seminal humà.⁹⁵ Aquesta teoria vindria recolzada pel fet que en determinats casos l'al·lèrgia al líquid seminal apareix just després d'un període en que no es tenen

relacions sexuals, com ara després d'un embaràs, histerectomia, menopausa o prostatectomia parcial en la parella.⁹³

El PSA, en ser específic de la pròstata, es creia que només es trobava en homes. Recentment, però, els mètodes de detecció ultrasensibles han determinat la presència de PSA en dones (teixit ovàric i mamari),²⁰⁴ i això explicaria que es tracti d'un autoal·lèrgen.

Ja abans del descobriment de la IgE com a anticòs, molts investigadors havien explicat en diferents publicacions que extractes preparats de caspa humana provocaven una reacció positiva en *prick test* en pacients que patien formes greus d'atòpia com la dermatitis atòpica.^{205, 206} El llibre clàssic *The Chemistry of Atopic Allergens* publicat per Berren el 1971,²⁰⁷ i, més concretament, el capítol "Al·lèrgens procedents de teixits epitelials", aporta suports experimentals a l'existència d'autoal·lèrgens. Des d'aleshores, i fins a principis dels noranta, el concepte d'"autoal·lèrgen" va caure en l'oblit. Aleshores, coincidint amb la caracterització molecular d'al·lèrgens ambientals, es van demostrar similituds entre al·lèrgens exògens i proteïnes humanes. L'observació de similituds tant de reconeixement immunològic com estructurals entre la profilina del pol·len de bedoll i una profilina humana va donar peu a la idea que la reactivitat encreuada entre al·lèrgens ambientals i proteïnes humanes podia ser el mecanisme patogènic en formes greus d'atòpia.^{208, 209} Posteriorment es va demostrar que al·lèrgens d'*Aspergillus fumigatus* tenien reactivitat encreuada amb proteïnes humanes i que aquestes induïen proliferació de cèl·lules T i reaccions cutànies en pacients amb sensibilització a aquest fong.²¹⁰ Des d'aleshores, s'han descrit una gran quantitat d'al·lèrgens ambientals amb similituds amb proteïnes humanes. Els autoal·lèrgens s'anomenen seguint la International Allergen Nomenclature.²⁷

Així, doncs, malgrat les nombroses descripcions d'autoal·lèrgens, l'existència de reaccions al·lèrgiques a antígens humans sempre desperta un gran interès biològic.

Descripció de la reactivitat encreuada entre el líquid seminal i la caspa de gos

Aquest segon objectiu de la tesi també està inclòs en el segon article publicat, en què demostrem la presència de reactivitat encreuada entre una proteïna del líquid seminal identificada com a PSA i una altra proteïna de la caspa de gos. La idea inicial ve donada per la història particular de la pacient que presentava reaccions anafilàctiques des de la primera exposició al semen. Això ens va portar a qüestionar-nos el possible origen d'aquesta sensibilització. La reactivitat encreuada amb altres al·lèrgens ambientals se'ns

va plantejar com una possibilitat plausible, ja que la pacient estava monosensibilitzada a la caspa de gos, i varem iniciar l'estudi amb aquest extracte.

En l'estudi d'inhibició de SDS-PAGE *immunoblot* en condicions no reductores mostra una inhibició completa (ambdues bandes fixadores d'IgE desapareixen) quan el sèrum de la pacient amb anafilaxi postcoital és preincubat amb extracte de caspa de gos a concentració de 1 mg/ml.

El cos humà conté nombroses proteïnes endògenes estructuralment relacionades amb d'altres presents en mamífers i el nostre sistema immunitari ha d'adaptar-se a la seva presència. En aquest sentit, el model de reactivitat encreuada entre proteïnes endògenes i exògenes millor estudiat és el de les lipocalines (antigen molt important en l'al·lèrgia als epitelis d'animals).^{33, 34, 35}

Hi ha poca informació sobre la resposta cel·lular de tipus T davant de les lipocalines. Basant-se en diferents estudis, el grup de Virtanen et al.^{33, 34} ha proposat que l'al·lèrgenicitat de les lipocalines està associada a la capacitat del sistema immunitari a adaptar-se a la presència de lipocalines endògenes. Així l'al·lèrgenicitat de les lipocalines es manifesta per si mateixa com una feble resposta cel·lular Th2 (al·lèrgica).

Una resposta intensa Th1 contra antígens pot comportar pel contrari, reaccions autoimmunitàries davant de lipocalines endògenes.

Per evitar tant l'activació Th1 com l'activació Th2 pot ser que cèl·lules T reactives davant de lipocalines endògenes estiguin sota control de la tolerància perifèrica.^{211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221}

En aquest estudi observàvem que per obtenir la mateixa inhibició amb extracte d'epiteli de gos que amb la caspa de gos necessitàvem una concentració cinc vegades superior. Per tant, podem concloure que l'al·lèrgen de gos que té reactivitat encreuada amb el líquid seminal es troba en major percentatge en la caspa que en l'epiteli de gos. Això suporta la idea que l'antigen de reactivitat encreuada amb el PSA és una proteïna de la caspa de gos, i per tant, recomanariem testar sempre extracte de caspa de gos i no només extracte d'epiteli de gos per detectar el tipus de pacients al·lèrgics al gos descrits en aquest article. De fet, hem de ressaltar que l'empresa que comercialitza la determinació d'IgE específica (Phadia) davant d'epiteli i caspa de gos ha retirat del mercat l'epiteli de gos per aquestes observacions i altres dades pròpies.

Una altra troballa interessant del treball és que l'antigen de reactivitat encreuada no és cap dels al·lèrgens majors de gos descrits fins al moment de l'estudi (Can f 1 / Can f 2).

Caracterització de l'al·lergen de la caspa de gos que té reactivitat encreuada amb el PSA: Can f 5

Aquest tercer objectiu està recollit en el tercer article, en què s'estudia el mateix cas d'HSPA que presenta sensibilització a la caspa de gos i s'identifica per espectrometria de masses l'al·lergen de caspa de gos que presenta reactivitat encreuada amb el líquid seminal humà, el recentment descrit Can f 5.

Un estudi publicat el 2009¹⁸⁹ identifica un nou al·lergen major de gos. En aquest treball es va fraccionar l'orina de gos per mesura mitjançant cromatografia i es va detectar una banda fixadora d'IgE, que va ser identificada per espectrometria de masses com una cal·licreïna prostàtica. Una proteïna altament relacionada, o la mateixa proteïna identificada, també ha estat detectada en la caspa de gos. El mateix grup ha produït la forma recombinant de la nova proteïna identificada en *P. Pastoris* i presenta propietats immunològiques i bioquímiques similars a les presentades per la proteïna natural. La DPK (cal·licreïna prostàtica de gos) s'ha anomenat Can f 5 segons el WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee.²⁷

Les cal·licreïnes no havien estat mai prèviament descrites com a al·lèrgens animals, i la seva seqüència d'aminoàcids no presenta similituds amb cap dels al·lèrgens animals de caspa o orina descrits fins ara. No obstant això, la cal·licreïna prostàtica de gos i altres membres de la mateixa família proteica de diverses espècies (vaca, cavall, rata, conill, ratolí i porc guineà) presenten un grau intermedi de conservació de seqüència que pot oscil·lar entre el 53 i el 59%.

La presència d'al·lèrgens en l'orina de mamífers ja havia estat reportada prèviament.^{222, 223, 224, 225} En rates, s'ha vist que el major contingut de determinats al·lèrgens d'orina es troba en els mascles adults.²²⁶ La cal·licreïna prostàtica de gos no té similitud de seqüència amb l'al·lergen major de l'orina de rata, que ha estat descrita com una proteïna reguladora d'andrògens expressada en la pròstata.²²⁷

S'ha vist que la castració dels gossos redueix dràsticament la producció de DPK. Per tant, una possibilitat interessant és que els pacients al·lèrgics al gos, depenent del seu perfil al·lèrgic, poden ser sensibles de manera diferent a gossos mascles i femelles. Això, seria esperable especialment per als pacients al·lèrgics al gos monosensibles a la cal·licreïna prostàtica de gos. D'això se'n deriva que, posat que els hàbits de castració dels gossos mascles varia d'un país a un altre i fins i tot d'una regió a una altra, la sensibilització a la cal·licreïna prostàtica de gos podria tenir diferències regionals

importants. No obstant això, no tenim constància de l'existència d'estudis sistemàtics que examinin aquests aspectes de l'al·lèrgia al gos.

La cal·licreïna prostàtica de gos i el PSA comparteixen una similitud de seqüència d'entre el 55 i el 60%.

En conclusió, estudiant un cas d'HSPA que presenta reaccions anafilàctiques amb el contacte amb semen, hem demostrat la reactivitat encreuada entre PSA i Can f 5, suggerint que la sensibilització a la caspa de gos pot ser rellevant en determinats casos per desenvolupar una HSPA, per exemple, com a factor predisponent o com a factor ambiental que actui de *booster* de la resposta immune davant del PSA.

Estudi de la prevalença de reconeixement dels al·lèrgens identificats en una població d'al·lèrgics al gos i en una població de dones amb esterilitat per causa desconeguda

Prevalença de reconeixement de Can f 5 en una població d'al·lèrgics al gos de l'àrea mediterrània

Aquest objectiu es desenvolupa en el primer apèndix, en què es demostra que el Can f 5 és un al·lèrgen major en la nostra població (reconegut pel 67% dels malats) i que el 37% dels pacients estudiats estaven monosensibilitzats a aquest al·lèrgen. Els al·lèrgens de gos prèviament descrits (Can f 1, Can f 2, Can f 3) són al·lèrgens menors en la nostra població.

Abans de caracteritzar l'al·lèrgen de caspa de gos amb reactivitat encreuada amb el PSA com a Can f 5, el nostre grup va determinar la freqüència de reconeixement del PSA en els al·lèrgics al gos (inferint la prevalença de sensibilització al Can f 5).

La prevalença exacta d'al·lèrgia al gos es desconeix, però un estudi epidemiològic recent realitzat a Espanya⁴³ observa un increment de la sensibilització als epitelis animals en general, i entre ells la sensibilització a la caspa de gos. Es desconeix el percentatge d'al·lèrgics al gos que són monosensibles al gos i no a altres epitelis, però l'observació en la pràctica clínica diària fa pensar que la monosensibilització al gos és molt infreqüent.

Del grup estudiat, en el subgrup que reconeixia la proteïna de 28 kDa del líquid seminal, vuit dels deu pacients (80%) estaven monosensibilitzats al gos mentre que, en l'altre subgrup, la monosensibilització representava un 22,6% (7 de 31 pacients). Aquesta prevalença de monosensibilització al gos en aquest subgrup és molt superior a la que habitualment ens trobem a la consulta.

No varem trobar diferències estadísticament significatives entre els dos grups pel que fa a la severitat de la clínica presentada davant de l'exposició a la caspa de gos. En el subgrup que reconeixia la proteïna de 28 kDa, tres dels deu pacients havien iniciat un tractament de dessensibilització amb immunoteràpia específica amb extracte d'epiteli de gos però en els tres casos la vacuna s'havia discontinuat per falta de resposta o per una resposta molt pobra al tractament. Aquesta baixa resposta a la immunoteràpia específica

amb extracte de gos ja ha estat prèviament descrita per Lijla et al.¹⁹⁰ i això suggereix que en el cas del gos disposem d'un extracte menys ben estandarditzat, contràriament al que passa amb extractes d'altres epitelis com el de gat, en què la potència de l'extracte la determina, pràcticament en la seva totalitat, l'al·lergen major Fel d 1. En el mateix subgrup s'observa una major prevalença de trastorns sexuals (una pacient presentava HSPA i l'altra una infertilitat no estudiada).

En general, l'estandardització d'extractes preparats a partir de mostres de pèl, cabell, caspa, saliva, sèrum, orina i femtes de diversos animals és difícil malgrat tots els treballs bioquímics i immunològics per caracteritzar-los al·lergògenament. Els extractes d'epitelis animals difereixen molt entre ells pel que fa a la concentració d'al·lèrgens majors i menors.²²⁸ Així, doncs, per a nosaltres, l'efecte de la immunoteràpia amb extracte d'epiteli de gos és menys eficaç que la immunoteràpia amb extracte d'epiteli de gat ja que disposem d'un extracte pitjor, probablement per l'absència o els baixos nivells de determinats antígens que poden ser rellevants en alguns pacients. Per tant, concloïem que els pacients sensibilitzats a aquesta proteïna amb reactivitat encreuada amb el PSA tenien una pobre resposta a la immunoteràpia específica i eren majoritàriament monosensibilitzats.

El grup de Mattsson i col·laboradors¹³⁰ també va estudiar la prevalença de reconeixement de la cal·licreïna prostàtica de gos (Can f 5) en una població de pacients al·lèrgics al gos i també trobaven una prevalença de reconeixement de DPK del 70%, cosa que el convertia en un al·lergen major. Aquí cal tenir present que la població estudiada pel grup suec majoritàriament també procedia d'Espanya; per tant, no es pot assegurar que en una població sueca també sigui un al·lergen major, tenint en compte les possibles diferències regionals que es podrien trobar en la sensibilització a les cal·licreïnes en funció de l'hàbit de castració dels gossos o, fins i tot, de possibles reactivitats encreuades d'aquest al·lergen amb al·lèrgens ambientals (tema, d'altra banda, que no ha estat mai estudiat). En aquest estudi, contràriament al que observem nosaltres a la nostra població, el Can f 1 és reconegut pel 49% dels pacients; per tant, com s'havia reconegut fins ara, seria un al·lergen major en aquesta població. Can f 2 i Can f 3 serien al·lèrgens menors.

Per la nostra part, concloem que la inclusió del Can f 5 en els panells al·lergògens de la plataforma ISAC per al diagnòstic per components augmentaria molt la rendibilitat diagnòstica de la plataforma pel que fa al diagnòstic d'al·lèrgia al gos en la nostra població i això ha motivat la inclusió del Can f 5 en la darrera versió comercial d'aquesta plataforma comercialitzada al setembre de 2011.

Sensibilització a la caspa de gos i al líquid seminal en una població de pacients amb esterilitat per causa desconeguda

A conseqüència dels resultats trobats en el segon article publicat i ja comentats en l'apartat quatre de la discussió, i pensant que la sensibilització al PSA podia estar infradetectada i que explicaria determinats trastorns no filiatos etiològicament fins ara (com determinades formes de vulvovaginitis crònica o esterilitat per causa desconeguda) varem decidir fer un estudi preliminar per detectar sensibilització al líquid seminal i a l'epiteli de gos en pacients amb esterilitat per causa desconeguda.

No és la primera vegada que un grup es planteja la possibilitat que un fenomen de reactivitat encreuada entre anticossos antiesperma i anticossos davant de proteïnes exògenes sigui responsable d'infertilitat immunològica, com és el plantejament del nostre estudi preliminar.

Recentment s'ha creat un sistema bioinformàtic que defineix que compartir *motif* en les seqüències d'aminoàcids de proteïnes al·lergògenes permet predir reactivitat encreuada entre elles.²²⁹ Amb aquest sistema s'ha trobat un *motif* que contenen totes les seqüències de l'antigen 5 dels verins de vèspids, incloent-ne un de la *Vespula vulgaris* (Ves v 5). El Ves v 5 està constituït per una única cadena polipeptídica de 204 aminoàcids (23 kDa) i pertany a una superfamília en què hi ha incloses proteïnes extracel·lulars de diverses espècies de plantes, fongs, rèptils, mamífers i insectes. El Ves v 5 és un al·lergen major del verí de vespula però la seva funció biològica no es coneix.²³⁰ Amb aquest sistema bioinformàtic que analitza el perfil d'aminoàcids de la seqüència de l'antigen 5 dels vèspids per trobar possibles proteïnes que tinguin reactivitat encreuada, en les bases de dades s'ha vist que hi ha 3 proteïnes del semen humà pertanyents a la família CRISP que expressen aquesta reactivitat encreuada amb Ves v 5. Per analitzar aquesta reactivitat encreuada es va agafar Ves v 5, CRISP-2 i CRISP-3 i es van produir com a recombinants en *E. Coli*. S'ha trobat una correlació entre la presència d'anticossos davant de rVes v 5 i rhCRISP-2, -3 en una petita població, cosa que indica la presència d'anticossos de reactivitat encreuada en el sèrum. Amb immunoglobulines endovenoses, procedents d'una preparació terapèutica d'IgG de donants, s'han trobat anticossos que reaccionen tant a rVes v5 com a hCRISP-2 i -3, resultats que suggereixen la presència d'epítops comuns entre Ves v 5 i hCRISPs. El grup de Muller et al. ha estudiat si aquesta reactivitat encreuada té o no un paper en la infertilitat immunològica. No s'ha trobat relació entre nivells alts d'IgE en verí de vespula i IgG antiesperma i hCRISPs, per tant, aquest estudi suggereix que una alta sensibilització al verí de vespula no indueix més anticossos davant d'autoantígens i pot no representar un major risc d'autoanticossos que induixin infertilitat.²³¹

En el nostre treball, en cap cas s'ha trobat sensibilització al líquid seminal i la sensibilització a la caspa i epiteli de gos detectades en aquesta població són inferiors a les trobades en població general. Per tant, podem inferir que l'HSPA no seria una condició causal en pacients amb esterilitat per causa desconeguda.

Fins a l'actualitat no hi ha cap referència publicada que associï l'HSPA i la infertilitat, més enllà del problema que presenten aquestes pacients per concebre a causa de la seva impossibilitat de mantenir relacions sexuals desprotegides.

Miscel·lània

Inseminació artificial com a mètode de fertilització en pacients afectades d'HSPA

Aquest objectiu queda estudiat en el primer article de la tesi. L'ús de mètodes barrera, com els preservatius, havien abolit completament la clínica en la pacient, però aquests mètodes no eren útils en el supòsit que la parella volgués tenir descendència, com era el cas.

Es va identificar l'al·lergen responsable com un al·lergen de 28 kDa de pm i es va usar un centrifugat d'esperma (lliure d'aquesta proteïna) per a la inseminació artificial, cosa que va permetre l'assoliment de la gestació i va evitar la reacció al·lèrgica. Van caldre 4 cicles d'inseminació artificial per assolir la gestació.

Segons el nostre criteri, la IUI seria un mètode efectiu per assolir la gestació en les pacients amb HSPA.

Tots els sèmens són igualment al·lèrgics?

Aquest objectiu es desenvolupa en el tercer apèndix de la tesi.

Un punt obscur del trastorn és si les manifestacions clíniques ocorren només amb una sola parella sexual o si, al contrari, les dones afectades presentarien problemes clínicament rellevants amb el contacte amb semen d'homes diferents. Ambdues situacions han estat descrites però en molts casos clínics publicats aquesta informació no consta.

Segons Mikkelsen et al.²³² l'HSPA no està limitada a una sola parella sexual. Per tant, per a ells, l'al·lergen no és específic d'un individu. En canvi, Franfland i Parish²³³ descriuen el cas d'una dona que mantenia relacions sexuals sense protecció amb el seu ex-marit, amb el qual va tenir 3 fills sense manifestar cap símptoma d'HSPA, però que presentava reaccions sistèmiques amb el contacte amb el semen del seu segon marit. Com que els autors no varen fer proves cutànies amb el semen d'altres homes, no es pot descartar que la dona es sensibilitzés després del contacte amb el semen del seu segon marit.

Una altra casuística descriu reaccions només després del contacte amb l'ejaculació d'una única parella sexual.²³⁴ Després del coit, una dona de 21 anys d'edat presentava pruija

vulvovaginal i edema i exantema generalitzat. Durant l'estudi immunoal·lèrgic, es varen observar *prick tests* positius amb el semen de la seva parella, en canvi, els *prick tests* amb semen de donant van resultar negatius. També va resultar negatiu el *prick test* amb el semen del seu marit en una voluntària sana.

Una altra sèrie reporta casos de reaccions al·lèrgiques amb el contacte amb 4 i fins i tot més parelles sexuals.²³⁵

Un exemple típic i ben estudiat de reacció d'IgE vehiculada davant de líquid seminal és el cas descrit per Halpern et al.¹⁰¹ d'una dona de 29 anys d'edat que presenta símptomes al·lèrgics entre 15 i 30 minuts després del coit amb el seu marit. Es varen realitzar *prick tests* amb diferents dilucions del semen del seu marit amb resultat positiu, en canvi, s'obtenen resultats negatius de *prick test* amb el semen de toro, cavall, conill, conill porquí i també amb el rentat del semen del marit. L'al·lèrgen sembla no estar només en el semen del marit sinó també en el sèmens d'altres homes, perquè la pacient té respostes positives també davant de semen de donants sans. Diferents dilucions del semen del marit varen produir respostes negatives en *prick tests* en dones voluntàries sanes.

Levine et al.²³⁶ va realitzar *prick tests* amb semen de 15 donants sans en una pacient sensibilitzada al líquid seminal, i van obtenir una resposta positiva amb tots ells. Això fa pensar que l'al·lèrgen (o al·lèrgens) implicat és espècie-específic i no individual.

En aquestes pacients amb HSPA s'observen resultats positius en *prick tests* amb el líquid seminal però no amb el sèrum o saliva de la parella.^{221, 224} D'altra banda, Freeman reporta el cas d'una dona que presenta reaccions positives tant amb el semen com amb la suor de la seva parella.²³⁷ Una altra casuística indica una associació temporal entre l'ejaculació i l'aparició de l'antigen en el semen de la parella masculina, resultant a un creixent alliberament d'histamina per part dels leucòcits de la pacient afectada.²³⁸

Atenent els resultats del nostre treball, podem concloure que una pacient al·lèrgica al líquid seminal de la seva parella podria ser-ho també al d'altres homes perquè l'al·lèrgen en principi és espècie-específic però no individu-específic, encara que la resposta diferencial (Figura 6) davant de sèmens de diferents donants pot justificar tolerància en certs casos que no hem comprovat per raons ètiques evidents.

Les dues possibilitats més plausibles per explicar aquests resultats són que, o bé existeixen diferents "polimorfismes" de PSA en diferents donants, o bé la concentració de PSA varia segons el temps d'abstinència sexual del donant (fet no recollit en les mostres estudiades). El grup de Végvári ha demostrat que el PSA es pot trobar en el

líquid seminal en diferents isoformes, no totes detectables pel mètode rutinari de detecció d'anticossos, i conclouen que l'heterogeneïtat d'expressió del PSA pot ser de rellevància clínica.^{239, 240} No s'ha estudiat l'heterogeneïtat del PSA en malalties al·lèrgiques. La darrera hipòtesi (concentració del PSA en funció del temps d'abstinència) ja havia estat plantejada per un altre grup prèviament, i sí que havia estat comprovada en pacients al·lèrgiques.²³⁸

En el segon article publicat s'observa que, d'entre els deu pacients que reconeixen la proteïna, sis són dones i totes elles tenen IgE específica davant de líquid seminal mesurat per ImmunoCAP (Pharmacia, Upssala, Suècia) però només una presenta al·lèrgia al líquid seminal.

Les concentracions d'IgE total i específica, l'afinitat de la IgE i la clonalitat de la IgE són propietats diferents del repertori de la IgE d'un pacient al·lèrgic i es relacionen tant amb diferències en la resposta al *prick test* (diagnòstic) com amb diferències en la severitat de la reacció al·lèrgica.^{241, 242, 243, 244, 245} En aquest sentit, el grup de Christensen^{246, 247} demostra, en diferents treballs sobre un panell d'IgE recombinant específica davant de l'al·lèrgen major d'àcars *Der p 2*, diferències importants de respostes al·lèrgiques entre subjectes distints amb els mateixos títols d'IgE. Amb mateix model i seguint aquest raonament podríem explicar perquè dones amb alts títols d'anticossos anticarpa de gos (Can f 5) i positivitat del CAP davant de líquid seminal no presenten problemes en el contacte amb el líquid seminal de la seva parella.

CONCLUSIONS

1. Hem identificat i caracteritzat l'antigen prostàtic específic (PSA) com l'al·lergen causal en un cas d'al·lèrgia al líquid seminal humà.
2. Hem demostrat la presència de reactivitat encreuada entre el PSA i una proteïna de la caspa de gos.
3. Hem identificat i caracteritzat la proteïna de la caspa de gos amb reactivitat encreuada amb el PSA com a Can f 5, cal·licreïna prostàtica de gos.
4. Suggestim que la sensibilització a la caspa de gos pot ser rellevant en determinats casos per desenvolupar al·lèrgia al líquid seminal humà.
5. Hem demostrat que el Can f 5 és un al·lergen major de gos en la nostra població, essent reconegut per un 67% dels nostres malalts al·lèrgics al gos.
6. El 37% del nostres pacients al·lèrgics al gos estan monosensibilitzats a Can f 5.
7. L'al·lèrgia al líquid seminal no és una condició causal en pacients amb esterilitat per causa desconeguda; per tant, podem dir que no trobem relació entre al·lèrgia al líquid seminal i esterilitat.
8. Hem demostrat que la inseminació artificial amb semen centrifugat és un mètode efectiu per assolir la gestació en les pacients amb al·lèrgia al líquid seminal.

REFERÈNCIES

-
- ¹ Mario Rojido, G. "Cien años de anafilaxia". *Alergol Immunol Clin*. 2001; 16: 364-68.
- ² Mario Rojido, G. "Cien años de anafilaxia". *Alergol Immunol Clin*. 2001; 16: 364-68.
- ³ Coca AF, Cooke RA. "On the classification of the phenomena of hypersensitiveness". *J Immunol*. 1923; 8: 163-82.
- ⁴ Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Lacy M, Skinner FA. "Farmers lung; chemophilic actenomyels as a source of farmers lung hay antigen". *Lancet*. 1936; 2: 607-11.
- ⁵ Coombs RRA, Gell PGH. "Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease". A: Coombs RRA, ed. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Science Publishers, London, 1968: 575-96.
- ⁶ Becker EL. "Elements of the history of our present concepts of anaphylaxis, hay fever and asthma". *Clin Exp Allergy*. 1999; 29(7): 875-95.
- ⁷ Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. "A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force". *Allergy*. 2001; 56(9): 813-24.
- ⁸ Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization", October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(5): 832-6.
- ⁹ Brostoff J, Hall T. "Hipersensibilidad de tipo I". A: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. *Inmunología*, 5ª edición. Madrid, Ediciones Harcourt. 2000; 302-17.
- ¹⁰ Mackay I, Rosen FS. "Allergy and allergic diseases. First of two parts". *N Engl J Med*. 2001; 344(1): 30-7.
- ¹¹ Aalberse RC. "Structural biology of allergens". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106(2): 228-38.
- ¹² Dreborg S, Bousquet J, Lowenstein H, Frew AJ. "Response to what is a major allergen". *Clin Exp Allergy*. 1994; 24(7): 610-11.
- ¹³ Berrens L. "What is a 'major' allergen". *Clin Exp Allergy*. 1994; 24(7): 606-609.
- ¹⁴ Blumenthal MN, Rosenberg A. "Definition of an allergen (immunobiology)". A: Lockley RF, Bukantz SC and Bousquet J (editors) *Allergens and Allergen Immunotherapy*, 3rd ed. New York, Marcel Dekker, Inc. 2004: 37-50.
- ¹⁵ Aalberse RC. "Structural features of allergenic molecules". *Chem Immunol Allergy*. 2006; 91: 134-46.
- ¹⁶ Radauer C, Breiteneder H. "Evolutionary biology of plant food allergens". *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 518-25.
- ¹⁷ Radauer C, Breiteneder H. "Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution". *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1): 141-7.

-
- ¹⁸ Pomés A, Villalba M. "Alérgenos". A: Peláez A, Dávila I (editors) *Tratado de Alergología*. Sociedad Española de Alergología. Madrid, Ergon editorial. 2007: 3-26.
- ¹⁹ Radauer C, Breiteneder H. "Structure, Allergenicity and Cross-reactivity of Plant Allergens. EAACI Allergy School on Recombinant Allergens". September 21-24, 2007. Bischoffseim, France.
- ²⁰ Pomes A. "Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity". *Allergy*. 2002; 57(8): 673-9.
- ²¹ Sehgal N, Custovic A, Woodcock A. "Potential roles in rhinitis for protease and other enzymatic activities of allergens". *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 May; 5(3): 221-6.
- ²² Spitzauer S. "Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self?" *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 120(4): 259-69.
- ²³ Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. "Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens". *Allergy*. 2001; 56(6): 478-90.
- ²⁴ Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. "Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis". *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(1): 163-70.
- ²⁵ Weber R. "Patterns of pollen cross-allergenicity". *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 229-39
- ²⁶ Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. "Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going". *J. Urol*. 1999; 162: 293-306.
- ²⁷ Mari A. "Importance of databases in experimental and clinical allergology". *Int Arch Allergy Immunol*. 2005; 138: 88-96.
- ²⁸ Rawlings ND, Barrett AJ. *Families of serine peptidases*. *Methods Enzymol*. 1994; 244: 19-61.
- ²⁹ Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. "Characterization and immunobiology of house dust mite allergens". *Int Arch Allergy Immunol*. 2002; 129: 1-18.
- ³⁰ Ock MS, Kim BJ, Kim SM, Byun KH. "Cloning and expression of trypsin-encoding cDNA from *Blattella germanica* and its possibility as an allergen". *Korean J Parasitol*. 2005; 43: 101-10.
- ³¹ Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. "Hymenoptera venom protease allergens". *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114: 928-33.
- ³² Wai Y, Tsui V, Peng Z, Richardson R, Oreopoulos D, Tarlo SM. "Anaphylaxis from topical bovine thrombin (Thrombostat) during haemodialysis and evaluation of sensitization among a dialysis population". *Clin Exp Allergy*. 2003; 33: 1730-4.
- ³³ Virtanen T, Zeiler T, Mantyjärvi R. "Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic?" *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 120: 247-58.
- ³⁴ Virtanen T, Zailer T, Rautanien J, Martyjärvi R. "Allergy to lipocalins: a consequence of misdisguised T Cell recognition of self and nonself?" *Immunol Today*. 1999; 20: 398-400.

-
- ³⁵ Spitzauer S. "Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self?" *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 120: 259-269.
- ³⁶ Cruz AA, Popov T, Pawankar R, Annesi-Maesano, Fokkens W, Kemp J, Otha K, Price D, Bousquet J on behalf of ARIA Initiative Scientific Committee. "Common characteristics of upper and lower airway rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA2LEN". *Allergy.* 2007; 62(suppl 84): 1-41.
- ³⁷ Bauchau V, Durham SR. "Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis". *Allergy.* 2005; 60(3): 350-3.
- ³⁸ Van Hoecke H, Vastesaegeer N, Dewulf L, Sys L, van Cauwenberge P. "Classification and management of allergic rhinitis patients in general practice during pollen season". *Allergy.* 2006; 61(6): 705-11.
- ³⁹ Bauchau V, Durham SR. "Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe". *Eur Respir J.* 2004; 24(5): 758-64.
- ⁴⁰ Maurer M, Zuberbier T. "Undertreatment of rhinitis symptoms in Europe: findings from a crosssectional questionnaire survey". *Allergy.* 2007; 62(9): 1057-63.
- ⁴¹ Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. ARIA Workshop Group; World Health Organization. "Allergic rhinitis and its impact on asthma". *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: S147-334.
- ⁴² Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM, Monclus L, Marti-Guadano E, et al. "A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items". *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(2): 359-65.
- ⁴³ Navarro AM. "Rinitis". A: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, Schering-Plough (eds). Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos *de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. Madrid: SEAIC. Schering-Plough; 2006. pp. 107-32.
- ⁴⁴ Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'byrne P, Sheffer A. "GINA guidelines on asthma and beyond". *Allergy.* 2007 Feb; 62(2): 102-12.
- ⁴⁵ Nacional Institutes of Health (NIH), Nacional Heart, Lung and Blood institute. *Global initiative for asthma: global strategy for asthma management and prevention*, NIH pub N° 02-3659, Bethesda, Md, 2002, NIH.
- ⁴⁶ Beasley R, Keil U, von Mutius E, Pearce N. "World wide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC". *Lancet.* 1998; 351: 1225-32.
- ⁴⁷ Janson C, Anto J, Burney P, Chinn S, de Marco R, Heinrich J, et al. "The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results is far?" *Eur Respir J.* 2001; 18: 598-611.
- ⁴⁸ Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forster J, Bauer CP, et al. "Predictability of early atopy by cord blood IgE and parental history". *Clin Exp Allergy.* 1997; 27: 752-60.
- ⁴⁹ Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forster J, Bauer CP, et al. "Predictability of early atopy by cord blood IgE and parental history". *Clin Exp Allergy.* 1997; 27: 752-60.

-
- ⁵⁰ Arshad S, Matthews, Gant C, Hide D. "Effect of allergen avoidance on development of allergic disorders in infancy". *Lancet*. 1992; 339: 1493-97.
- ⁵¹ Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, et al. "Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life". *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 763-69.
- ⁵² Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Forster J, Schraub S, et al. "Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization". *J Allergy Clin Immunol*. 1994; 94: 44-52.
- ⁵³ von Mutius E, Sears MR.; "Chapter 3: Risk factors for development of asthma". A: *Asthma European Respiratory Monograph 2003*. pp 57-73.
- ⁵⁴ Kihlstrom A, Lijia G, Pershagen G, Hedlin G. "Exposure to birch pollen in infancy and the development of atopic disease in childhood". *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110: 78-84.
- ⁵⁵ Linneberg A, Henrik Nielsen N, Frølund L, Madsen F, Dirksen A, Jørgensen T; Copenhagen Allergy Study. "The Link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population based study. The Copenhagen Allergy Study". *Allergy*. 2002; 57: 1048-52.
- ⁵⁶ Casasnovas P, Ruano F, Cárdenas R, Feliu A, Hidalgo P, Daroca P, et al. "Historia natural de la rinitis polínica II: desarrollo de otras enfermedades alérgicas. Abstract". *Alergol Immunol Clin*. 2003; 18 (E3): 160.
- ⁵⁷ López Campos C, Rincón Castañeda CB, Borja Aburto V, Gómez Muñoz A, Tellez Valdes O, Martínez Ordaz V, et al. "Respiratory function in allergic asthmatic children and its relation to the environmental pollen concentration". *Rev Alerg Mex*. 2003; 50: 129-34.
- ⁵⁸ Bousquet J, Boushey HA, Busse W, Canonica GW, Durham SR, Irvin CG, et al. "Characteristics of patients with seasonal allergic rhinitis and concomitant asthma". *Clin Exp Allergy*. 2004; 34: 897-903.
- ⁵⁹ Leynaert B, Neukirch F, Demoly P, Bousquet J. "Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 201-5.
- ⁶⁰ Beasley R, Keil U, von Mutius E, Pearce N. "World wide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC". *Lancet*. 1998; 351: 1225-32.
- ⁶¹ Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris N, Kosmas E, Fragakis S, et al. "Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis". *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 663-9.
- ⁶² Bousquet J. et al. "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)". *Allergy*. 2008 Apr; 63 Suppl 86: 8-160.
- ⁶³ Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA; Branum A et al. "Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/ Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium". *J Allergy Clin Immunol*. 2006, 117: 391-7.
- ⁶⁴ Johansson SGO, Bieber T, Dahl R et al. "A revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of World Allergy Organization". *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 832-836.

-
- ⁶⁵ Cardona Dahl V; Grupo de trabajo de la Guía GALAXIA de actuación en anafilaxia. ["Guideline for the management of anaphylaxis"]. *Med Clin (Barc)*. 2011 Mar 26; 136(8): 349-55.
- ⁶⁶ Marques L, Baltasar MA, Granel C, Guspí R. Anafilaxia. En Pelaez A, Dávila I, (editors). *Tratado de Alergología SEAIC*. Madrid: Ergon, 2007: 1633-55.
- ⁶⁷ Clark S, Camargo CA Jr. "Epidemiology of anaphylaxis". *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007; 27: 145-63.
- ⁶⁸ Kemp SF, Jockey RF. "Anaphylaxis: A review of causes of mechanisms". *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110: 341-8.
- ⁶⁹ Golden D. "What is anaphylaxis?" *Curr Opinion Allergy Clin Immunol*. 2007; 7: 331-6.
- ⁷⁰ Peng MM, Jink H. "A population-based study of the incidence, cause and severity of anaphylaxis in the United Kingdom". *Arch Intern Med*. 2004; 164: 317-9
- ⁷¹ Currie M, Kerridge RK, Bacon AK, Williamson JA. "Crisis management during anaesthesia: anaphylaxis and allergy". *Qual Saf Health Care*. 2005; 115: 584-91.
- ⁷² Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA et al. "Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report". *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 584-91.
- ⁷³ Brown AFT, MCKinnon D, Chu K. "Emergency department anaphylaxis: A review 142 patients in a single year". *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108: 861-6.
- ⁷⁴ Acero S, Tabar AI, Garcia BE, Echepeía S, Olaguibel JM. "Anafilaxia: diagnóstico etiológico". *Alergol Immunol Clin*. 1999; 14: 133-7.
- ⁷⁵ Cosmes PM, Moreno Ancillo A. "Anafilaxia en el norte de Extremadura". *Alergol Immunol Clin*. 2002; 17: 8-12.
- ⁷⁶ Fernandez Rivas M. "Food Allergy in Alergológica 2005". *J Investig Alergol Clin Immunol*. 2009; 19 Supl 2: 37-44.
- ⁷⁷ Lieberman PL. "Anaphylaxis and anaphylactoid reactions". A: Adkinson NF, Brochner BS, Buse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simon FER eds. *Middleton's Allergy Principles and Practice*, 7th Edition. Philadelphia: Mosby Elsevier. 2009: 1027-49.
- ⁷⁸ Brown SGA. "Clinical features and severity grading of anaphylaxis". *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114: 371-6.
- ⁷⁹ Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. "Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents". *N Engl J Med*. 1992; 327: 380-4.
- ⁸⁰ Tunon de Lara JM, Villanueva P, Marcos M, Taytard A. "ACE inhibitors and anaphylactoid reactions during venom immunotherapy". *Lancet*. 1992; 340: 908.
- ⁸¹ Toogood JH. "Risk of anaphylaxis in patients receiving beta-blocker drugs". *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 81: 1-5.
- ⁸² Pumphrey RS. "Lessons of management of anaphylaxis from a study of fatal reactions". *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 1144-50.

-
- ⁸³ Summers CW, Pumphrey RS, Woods CN, McDowell G, Pemberton PW, Arkwright PD. "Factors predicting anaphylaxis to peanut and tree nuts in patients referred to a specialist centre". *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 632-8.
- ⁸⁴ Working Group of Resuscitation Council (UK). "Emergency treatment of anaphylactic reactions". Resuscitation Council (UK). 2008. ([http://resus-irh.org/Documents/Anaphylaxis Guidelines-Update Jan 2008.pdf](http://resus-irh.org/Documents/Anaphylaxis%20Guidelines-Update%20Jan%202008.pdf)).
- ⁸⁵ Simons FE. "Anaphylaxis". *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121 (2 Suppl): S402-7.
- ⁸⁶ Lin RY, Schwartz LB, Curry A, Pesola GR, Knight RJ, Lee H-S, et al. "Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 65-71.
- ⁸⁷ Brown SG, Blackman KE, Heddle RJ. "Can serum mast cell tryptase help diagnose anaphylaxis?" *Emerg Med Australas*. 2004; 16: 120-4.
- ⁸⁸ Enrique E, García-Oterga P, O Sotorra, Gaig P, Richart C. "Usefulness of UniCAP-Tryptase fluoroimmunoassay in the diagnosis of anaphylaxis". *Allergy*. 1999; 54: 602-6.
- ⁸⁹ Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CL, Schwartz LB, et al. "Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal". *Leuk Res*. 2001; 25: 603-25.
- ⁹⁰ Schwartz LB. "Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis". *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; 26: 451-63.
- ⁹¹ Ono E, Taniguchi M, Mita H et al. "Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis". *Clin Exp Allergy*. 2009; 39: 72-80.
- ⁹² Simons FER, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Finkelman F, Golden DBK, et al. "Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches". *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: S2-24.
- ⁹³ Shah A, Panjabi C. "Human seminal plasma allergy: a review of a rare phenomenon". *Clin Exp Allergy*. 2004; 34: 827-38.
- ⁹⁴ Sublett JW, Bernstein JA. "Seminal plasma hypersensitivity reactions: an updated review". *Mt Sinai J Med*. 2011 Sep-Oct; 78 (5): 803-9.
- ⁹⁵ Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. "The diagnosis and management of anaphylaxis: an update practice parameter". *J Allergy and Clin Immunol*. 2005; 115 (3 suppl 2): S483-S523.
- ⁹⁶ Bernstein IL, Englander BE, Gallagher JS, et al. "Localized and systemic hypersensitivity reactions to human seminal fluid". *Ann Intern Med*. 1981; 94: 495-65.
- ⁹⁷ Bernstein JA, Herd ZA, Bernstein DI, et al. "Evaluation and treatment of localized vaginal immunoglobulin E mediated hypersensitivity to human seminal plasma". *Obstet Gynecol*. 1993; 82: 667-73.

-
- ⁹⁸ Bernestein JA, Sugumaran R, Bernstein DI, Bernstein IL. "Prevalence of human seminal plasma hypersensitivity among symptomatic women". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1997; 78 (1): 54-58.
- ⁹⁹ Weidinger S, Ring J, Kohn FM. "IgE-mediated allergy against human seminal plasma". *Chem Immunol Allergy*. 2005; 88: 128-38.
- ¹⁰⁰ Weidinger S, Mayerhofer A, Raemsch R, Ring J, Kohn FM. "Prostate-specific antigen as allergen in human seminal plasma allergy". *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 213-5.
- ¹⁰¹ Fung K, Glode LM, Green S. "A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid". *Prostate*. 2004; 61: 171-81.
- ¹⁰² Halpern BN, Ky T, Robert B. "Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitization to human seminal fluid". *Immunol*. 1967; 12: 247-59.
- ¹⁰³ Bernstein JA. "Human Seminal Plasma Hypersensitivity: an under-recognized women's health issue". *Postgrad Med*. 2011 Jan; 123 (1): 120-5.
- ¹⁰⁴ Shapiro SS, Kooistra JB, Schwartz D, Yunginger JW, Haning RV. "Induction of pregnancy in a woman with seminal plasma allergy". *Fertil Steril*. 1981; 36: 405-7.
- ¹⁰⁵ Iwahashi K, Myyazaki T, Kuji N, Yoshimura Y. "Successful pregnancy in a woman with a human seminal plasma allergy. A case report". *J Reprod Med*. 1999; 44 (4): 391-3.
- ¹⁰⁶ Ohman JL, Malkiel S, Lewis S, Lorusso JR. "Allergy to human seminal fluid: Characterization of the allergen and experience with immunotherapy". *J Allergy Clin Immunol*. 1990; 85: 103-107.
- ¹⁰⁷ Drouet M, Sabbah A, Hassoun S. "Thirteen cases of allergy to human seminal plasma". *Allergy*. 1997; 52 (1): 112-114.
- ¹⁰⁸ Park JW, KO SH, KIm CW, Bae SW, Hong C. "Seminal plasma anaphylaxis: successful pregnancy after intravaginal desensitization and immunodetection of allergens". *Allergy*. 1999; 54: 990-3.
- ¹⁰⁹ De Cuiper C, Bogaerts Y, Vanderkerchhove F, Gunst J. "Intravaginal desensitization and successful pregnancy in a woman with seminal fluid allergy". *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 97(6): 1427-8.
- ¹¹⁰ Nusam D, Geva a, Kalderon I, Cohen S. "Intravaginal desensitization to seminal fluid". *Allergy*. 1999; 54: 765.
- ¹¹¹ Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. "Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss". *Fertil Steril*. 2008; 90: 560.
- ¹¹² Guttmacher AF. "Factors affecting normal expectancy of conception". *J Am Med Assoc*. 1956; 161(9): 855.
- ¹¹³ Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. "Estimates of human fertility and pregnancy loss". *Fertil Steril*. 1996; 65(3): 503.
- ¹¹⁴ Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. "Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study". *Fertil Steril*. 2003; 79(3): 577.

-
- ¹¹⁵ Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. "Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility". *Hum Reprod*. 2003; 18(9): 1959.
- ¹¹⁶ Zinaman, MJ, Clegg, ED, Brown, CC, et al. "Estimates of human fertility and pregnancy loss". *Fertil Steril*. 1996; 65: 503.
- ¹¹⁷ Stephen EH, Chandra A. "Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002". *Fertil Steril*. 2006; 86(3): 516.
- ¹¹⁸ www.cdc.gov/nchs/products/pubs/pubd/series/sr23/pre-1/pre-1.htm (visitada el 5 d'octubre de 2006).
- ¹¹⁹ Wellons MF, Lewis CE, Schwartz SM, Gunderson EP, Schreiner PJ, Sternfeld B, Richman J, Sites CK, Siscovick DS. "Racial differences in self-reported infertility and risk factors for infertility in a cohort of black and white women: the CARDIA Women's Study". *Fertil Steril*. 2008; 90(5): 1640.
- ¹²⁰ Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. "Population study of causes, treatment, and outcome of infertility". *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985; 291(6510): 1693.
- ¹²¹ Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. "Optimal evaluation of the infertile female". *Fertil Steril*. 2006; 86 (5 Suppl 1): S264.
- ¹²² Moghissi KS, Wallach EE. "Unexplained infertility". *Fertil Steril*. 1983; 39(1): 5.
- ¹²³ Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. "Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss". *Fertil Steril*. 2008; 90: 560.
- ¹²⁴ Blacker CM, Ginsburg KA, Leach RE, Randolph J, Moghissi KS. "Unexplained infertility: evaluation of the luteal phase; results of the National Center for Infertility Research at Michigan". *Fertil Steril*. 1997; 67(3): 437.
- ¹²⁵ Blacker CM, Ginsburg KA, Leach RE, Randolph J, Moghissi KS. "Unexplained infertility: evaluation of the luteal phase; results of the National Center for Infertility Research at Michigan". *Fertil Steril*. 1997; 67(3): 437.
- ¹²⁶ Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, Hill JA, Mastroianni L, Buster JE, Nakajima ST, Vogel DL, Canfield RE. "Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network". *N Engl J Med*. 1999; 340(3): 177.
- ¹²⁷ Chamley, LW, Clarke, GN. "Antisperm antibodies and conception". *Semin Immunopathol*. 2007; 29: 169-184
- ¹²⁸ Menge AC, Medley NE, Mangione CM and Dietrich JW. "The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility". *Fertil Steril*. 1982; 38: 439-446.
- ¹²⁹ Collins JA, Burrows EA, Yeo J and Younglai EV. "Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples". *Human Reprod*. 1993; 8: 592-598.
- ¹³⁰ Steen Y, Forssman L, Lonnerstedt E, Johansson K, Wassen AC, and Lycke E. "Anti-sperm IgA antibodies against the equatorial segment of the human spermatozoon are associated with impaired sperm penetration and subfertility". *Int J Fertil Menopausal Stud*. 1994; 39: 52-56.

-
- ¹³¹ Bronson RA, O'Connor WJ, Wilson TA, Bronson SK, Chasalow FI, and Drosch K. "Correlation between puberty and the development of autoimmunity to spermatozoa in men with cystic fibrosis". *Fertil Steril*. 1992; 58: 1199-1204.
- ¹³² Tung KSK, Unanue ER and Dixon FJ. "Pathogenesis of experimental allergic orchitis. The role of antibody". *J Immunol*. 1971; 106: 1463-1472.
- ¹³³ Witkin SS. "Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa". *Am J Reprodu Immunol Microbiol*. 1998; 17: 61-64.
- ¹³⁴ Lehman D, Siebold K, Emmons LR, Muller H. "Androgens inhibit proliferation of human peripheral blood lymphocytes in vitro". *Clin Immunol Immunopathol*. 1988; 46: 122-128.
- ¹³⁵ Dana A Ohl and rajesh K Naz. "Infertility due to antiesperm antibodies". *Urology*. 1995; 46 (4): 591-601.
- ¹³⁶ Balk SP, Ko Y, Bublely GJ. "Biology of Prostate-Specific Antigen (Abstract)". *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 28 (2): 383-91.
- ¹³⁷ "Chapter 8: What is the prostate and what is its function?" *American Society of Andrology Handbook*.
- ¹³⁸ Naz RK and Bhargava KK. "Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in male genital tract". *Mol Reprod Dev*. 1990; 26: 175-183.
- ¹³⁹ Naz RK. "Involvement of fertilization antigen (FA-1) in involuntary immunoinfertility in humans". *J Clin Invest*. 1987; 80: 1375-1383.
- ¹⁴⁰ Hall JL, Engel D, Naz RK. "Significance of antibodies against FA-1 antigen in immunoinfertility". *Arch Androl*. 1994; 32: 25-30.
- ¹⁴¹ Menge AC, and Naz RK. "Immunoglobulin IgG, IgA and IgA subclass antibodies against fertilization antigen-1 in cervical secretations and sera of women of infertile couples". *Fertil Steril*. 1993; 60: 658-663.
- ¹⁴² Menge AC, and Naz RK. "Immunologic reactions involving sperm cells and preimplantation embryos". *Am J Reproduct Immunol Microbiol*. 1988; 18: 17-20.
- ¹⁴³ Javed AA and Naz RK. "Human cleavage signal-1 protein, cDNA cloning, transcription and immunological analysis". *Gene*. 1992; 112: 205-211.
- ¹⁴⁴ Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huan, Q, Hao Q. „Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold". *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 12405-12412.
- ¹⁴⁵ Eberspaecher U, Roosterman D, Kratzschmar J, Haendler B, Habenicht UF, Becker A, Quensel C, Petri T, Schleuning WD, Donner P. "Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form". *Mol. Reprod. Dev*. 1995; 42: 157-172.
- ¹⁴⁶ Hayashi M, Fujimoto S, Takano H, Ushiki T, Abe K, Ishikura H, Yoshida MC, Kirchhoff C, Ishibashi T, Kasahara M. "Characterization of a human glycoprotein with a potential role in sperm-egg fusion: cDNA

cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1)". *Genomics*. 1996; 32: 367-374.

¹⁴⁷ Klemme LM, Roberts KP, Hoffman LB, Ensrud KM, Siiteri JE, Hamilton DW. "Cloning and characterization of the rat Crisp-1 gene". *Gene*. 1999; 240: 279-288.

¹⁴⁸ Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. "The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3". *Eur. J. Biochem*. 1996; 236: 827-836.

¹⁴⁹ Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall S, Hamil KG, French FS, O'Rand MG. "Cloning and characterization of an androgen-dependent acidic epididymal glycoprotein/CRISP1-like protein from the monkey". *J. Androl*. 1999; 20: 384-393.

¹⁵⁰ Kasahara M, Gutknecht J, Brew K, Spurr N, Goodfellow PN. "Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene". *Genomics*. 1989; 5: 527-534.

¹⁵¹ Maeda T, Nishida J, Nakanishi Y. "Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells". *Dev. Growth Differ*. 1999; 41: 715-722.

¹⁵² Kjeldsen L, Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. "SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein". *FEBS Lett*. 1996; 380: 246-250.

¹⁵³ Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Topfer-Petersen E. "Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract". *Biochim. Biophys*. 1997; Acta 1387: 206-216.

¹⁵⁴ Udby L, Calafat J, Sorensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L. "Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils". *J. Leukoc. Biol*. 2002; 72: 462-469.

¹⁵⁵ Busso D, Cohen DJ, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. "Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction". *Mol. Hum. Reprod*. 2005; 11: 299-305.

¹⁵⁶ Cohen DJ, Da Ros VG, Busso D, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. "Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation". *Asian J. Androl*. 2007; 9: 528-532.

¹⁵⁷ Smith JF, Eisenberg ML, Millstein SG, Nachtigall RD, Sadetsky N, Cedars MI, Katz PP, Infertility Outcomes Program Project Group. "Fertility treatments and outcomes among couples seeking fertility care: data from a prospective fertility cohort in the United States". *Fertil Steril*. 2011; 95(1): 79.

¹⁵⁸ Hull MG. "Effectiveness of infertility treatments: choice and comparative analysis". *Int J Gynaecol Obstet*. 1994; 47(2): 99.

¹⁵⁹ Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP. "Efficacy of treatment for unexplained infertility". *Fertil Steril*. 1998; 70(2): 207.

-
- ¹⁶⁰ Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. "Population study of causes, treatment, and outcome of infertility". *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985; 291(6510): 1693.
- ¹⁶¹ Royère D. "Intrauterine insemination: state-of-the-art in humans". *Gynecol Obstet Fertil*. 2004 Oct; 32(10): 873-9.
- ¹⁶² Abbas, AK, Murphy KM and Sher A. "Functional diversity of helper T lymphocytes". *Nature*. 1996; 383: 787-793.
- ¹⁶³ Allen, JE and Maizels RM. "Immunology of human helminth infection". *Int Arch Allergy Immunol*. 1996; 109, 3-10.
- ¹⁶⁴ Liblau R, Tisch R, Bercovici N and McDevitt HO. "Systemic antigen in the treatment of T Cell-mediated autoimmune diseases". *Immunol. Today*. 1997; 18, 599-604.
- ¹⁶⁵ Romagnani S. "The role of lymphocytes in allergic disease". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 399-408.
- ¹⁶⁶ Mathur S, Williamson HO, Baker ER, Fudenberg HH. "Immunoglobulin E levels and antisperm antibody titers in infertile couples". *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Aug 15; 140(8): 923-30.
- ¹⁶⁷ Harrison RF, Unwin A. "Atopy in couples with unexplained infertility". *Br J Obstet Gynaecol*. 1989 Feb; 96(2): 192-5.
- ¹⁶⁸ Zac RI, Machado VM, Alberti LR, Petroianu A. "Association of allergy, infertility and abortion". *Rev Assoc Med Bras*. 2005 May-Jun; 51(3): 177-80.
- ¹⁶⁹ Hanzlikova J, Ulcova-Gallova Z, Malkusova I, Sefrna F, Panzner P. "TH1-TH2 response and the atopy risk in patients with reproduction failure". *Am J Reprod Immunol*. 2009 Mar; 61(3): 213-20.
- ¹⁷⁰ Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, Beer AE, Gilman-Sachs A. "Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failure after IVF". *Hum Reprod*. 2003; 18: 767-773.
- ¹⁷¹ Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ. "Evidence of TH1 type response associated with recurrent miscarriage". *Fertil Steril*. 2000; 73: 1206-1208.
- ¹⁷² De Groot H, Goei HGH, Van Swieten P, Aalberse R. "Affinity purification of a major and minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f1 and Can f1-depleted extract". *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 87: 1056-65.
- ¹⁷³ Spitzauer s, Pandjaitan B, Muhl S, Ebner C, Kraft D, Valenta R et al. "Major cat and dog allergens share IgE epitopes". *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 100-6.
- ¹⁷⁴ Reminger R, Varga EM, Zach M, Balic N, Lindemeier AD, Swoboda I et al. "Detection of an allergen in dog dander that cross-reacts with the major cat allergen Fel d1". *Clin Exp Allergy*. 2007; 37: 116-24.
- ¹⁷⁵ Woodfolk JA, Platts-Mills TAE. Allergens. A: Austen KF (editor). *Samter's immunologica diseases*. 6th edition. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. pp. 787-810.

-
- ¹⁷⁶ Erwin EA, Woodfolk JA, Custis N, Platts-Mills TA. "Animal dander". *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003 Aug; 23(3): 469-81.
- ¹⁷⁷ Custovic A, Green R, Taggart SCO, Smith A, Pickering CAC, Chapman MD, et al. "Domestic allergens in public places II: dog (Can f 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in dust and mite, cat, dog and cockroach allergens in the air in public buildings". *Clin Exp Allergy*. 1996; 26: 1246-52.
- ¹⁷⁸ Spitzauer S. "Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self?" *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 120: 259-69.
- ¹⁷⁹ Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, et al. "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting". *Int Arch Allergy Immunol*. 1993; 100: 60-7.
- ¹⁸⁰ Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF, et al. "The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms". *Immunology*. 1997; 92: 577-86.
- ¹⁸¹ Boutin Y, Hebert H, Vrancken ER, Mourad W. "Allergenicity and cross-reactivity of cat and dog allergenic extracts". *Clin Allergy*. 1988; 18: 287-93.
- ¹⁸² Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, ebner C, Scheiner O, Kraft D, Rumpold H. "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting". *Int Arch Allergy Immunol*. 1991; 94 (1-4): 346-8.
- ¹⁸³ Spitzauer S, Schweiger C, Sperr WR, Pandjaitan B, Valenta R, Muhl S, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, Rumpold H. "Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen". *J Allergy Clin Immunol*. 1994; 93(3): 614-627.
- ¹⁸⁴ Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky-Pichler F, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. "Escherichia coli expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105(2): 279-285.
- ¹⁸⁵ Bosse D, Praus M, Kiessling P, Nyman L, Andresen C, Waters J, Schindel F. "Phase I comparability of recombinant human albumin and human serum albumina". *J Clin Pharmacol*. 2005; 45(1): 57-67.
- ¹⁸⁶ Saarelainen S, Taivainen A, Rytönen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantyjärvi R, et al. "Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy". *Clin Exp Allergy*. 2004; 34: 1576-82.
- ¹⁸⁷ Cabañas R, López-Serrano MC, Carreira J, Ventas P, Polo F, Caballero MT, et al. "Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens". *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2000; 10: 71-7.
- ¹⁸⁸ L. Mattsson, T. Lundgren, P. Olsson, M. Sundberg and J. Lidholm. "Molecular and immunological characterization of Can f4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander". *Clin Exp Allergy*. 2010 Aug; 40(8): 1276-87.
- ¹⁸⁹ Mattsson L, Lundgren T, Everberg , Lidholm J. "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen". *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(2):362-368.
- ¹⁹⁰ Lilja G, Sundin B, Graff-Lonnevig V, Helsing G, Heilborn H, Norrlind K et al. "Immunotherapy with cat and dog -dander extracts. Effects of two years of treatment". *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 83: 37-44.

-
- ¹⁹¹ Malling HJ. "Allergen standardisation and skin tests. Methods of skin testing". *Allergy*. 1993; 48(suppl 14): 55-6.
- ¹⁹² Marknell DeWitt A, Niederberger V, Lehtonen P, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, et al. "Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11". *Clin Exp Allergy*. 2002; 32: 1329-40.
- ¹⁹³ Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- ¹⁹⁴ Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding". *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- ¹⁹⁵ Towbin H, Staehelin Y, Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 4350-4.
- ¹⁹⁶ Yman L, Ponterius G, Brandt R. "RAST-based allergen assay methods". *Dev Biol Stand*. 1975; 29: 151-65.
- ¹⁹⁷ Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov A, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. "Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 14440-5.
- ¹⁹⁸ Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. "A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS". *Anal Chem*. 2002; 74: 3915-23.
- ¹⁹⁹ Basagaña M, Bartolome B, Pastor C et al. "Allergy to human seminal fluid: Cross-reactivity with dog dander". *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(1): 233-239.
- ²⁰⁰ Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. "Biology of prostate-specific antigen". *J Clin Oncol*. 2003; 21: 383-91.
- ²⁰¹ Levine BB, Siraganian RP, Schenkein I. "Allergy to human seminal plasma". *N Engl J Med*. 1973; 288: 894-6.
- ²⁰² Tomitaka A, Suzuki K, Akamatsu H, Matsunaga K. "Anaphylaxis to human seminal plasma allergy". *Allergy*. 2002; 57: 1081-2.
- ²⁰³ Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. "Prostate specific antigen: a decade of discovery—what we have learned and where we are going". *J Urol*. 1999; 162: 293-306.
- ²⁰⁴ Magklara A, Scorilas A, Lopez-Otin C, Vizoso F, Ruibal A, Diamandis EP. "Human glandular kallikrein in breast milk, amniotic fluid, and breast cystic fluid". *Clin Chem*. 1999; 45(10): 1774-80.
- ²⁰⁵ Storm van Leeuwen W, Bien Z, Varekamp H. „Über die Hautreaktion mit Extrakten menschlicher Kopfhautschuppen bei allergischen Krankheiten". *Klin Wochenschr*. 1926; 5: 1023-1025.
- ²⁰⁶ Keller P. "Beitrag zu den Beziehungen von Asthma und Ekzem". *Arch Derm Syph Berl*. 1924; 148: 82-91.
- ²⁰⁷ Berrens L. "The Chemistry of Atopic Allergens". *Monogr Allergy*. Basel, Karger, 1971, vol 7.

-
- ²⁰⁸ Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sill-aber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O. "Identification of profilin as a novel pollen allergen. IgE autoreactivity in sensitized individuals". *Science*. 1991; 253: 557-560.
- ²⁰⁹ Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. "The molecular basis for allergen cross-reactivity: Crystal structure and IgE epitope zapping of birch pollen profiling". *Structure*. 1999; 7: 943-952.
- ²¹⁰ Cramer R, Faith A, Hemmann S, Jaussi R, Ismail C, Menz G, Blaser K. "Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus Fumigatus*". *J Exp Med*. 1996; 184: 265-270.
- ²¹¹ Zeiler Y, Mantylarvi R, Rautiainen J et al. "T cell epitopes of a lipocalin allergen colocalize with the conserved regions of the molecule". *J. Immunol*. 1999; 162: 1415-1422.
- ²¹² Olajide F and Chard T. "Biological and clinical significance of the endometrial protein PP14 in reproductive endocrinology". *Obstet Gynecol Surv*. 1992; 47: 253-257.
- ²¹³ Van Neerven RJJ, Ebner C, Yssel H, Kapsenberg ML and Lamb JR. "T Cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance". *Immunol. Today*. 1996; 17: 526-532.
- ²¹⁴ Taams LS, van Rensen AJML, Poelen MCM et al. "Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell". *Eur J Immunol*. 1998; 28: 2902-2912.
- ²¹⁵ Basu D, Williams CB and Allen PM. "In vivo antagonism of a T cell response by an endogenously expressed ligand". *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1998; 95: 14332-14336.
- ²¹⁶ Moudgil KD. "Diversification of response to hsp65 during the course of autoimmune arthritis is regulatory rather than pathogenic". *Immunol Rev*. 1998; 164: 175-184.
- ²¹⁷ Sloan-Lancaster J and Allen PM. "Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology". *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 1-27.
- ²¹⁸ Ikagawa S, Matsushita S, Chen YZ, Ishikawa T and Nishimura Y. "Single amino acid substitutions on a Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1)-derived peptide induced alterations in human T cell responses and T cell receptor antagonism". *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 97: 53-64.
- ²¹⁹ Tsitor DC, Verhoef A, Gelder CM, O'Hehir RE and Lamb JR. "Altered T cell ligands derived from a major house dust mite allergen enhance IFN-gamma but not IL-4 production by human CD4+ T cells". *J Immunol*. 1996; 157: 2160-2165.
- ²²⁰ Ausubel LJ, Krieger JI and Hafler DA. "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99". *J Immunol*. 1997; 159: 2502-2512.
- ²²¹ Ravichandran M, Mahanty S, Kumaraswami V, Nutman TB and Jayaraman K. "Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection". *Parasite Immunol*. 1997; 19: 69-77.
- ²²² Schumacher MJ. "Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice". *Mol Immunol*. 1980; 17: 1087-95.

-
- ²²³ Siraganian RP, Sandberg AL. "Characterization of Mouse allergens". *J Allergy Clin Immunol.* 1979; 63: 435-42.
- ²²⁴ Taylor AN, Longbottom JL, Pepys J. "Respiratory allergy to urine proteins of rats and mice". *Lancet.* 1977; 310: 847-9.
- ²²⁵ Hoffman DR. "Dog and cat allergens: urinary proteins or dander proteins?" *Ann Allergy.* 1980; 45: 205-6.
- ²²⁶ Gordon S, Tee RD, Taylor AJN. "Analysis of rat urine proteins and allergens by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting". *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92: 298-305.
- ²²⁷ Chapdelaine P, Potvin C, Ho-Kim MA, Larouche L, Bellamare G, Tremblay RT et al. "Androgen regulation of canine prostatic arginine esterase mRNA using cloned cDNA". *Mol Cell Endocrinol.* 1988; 56: 63-70.
- ²²⁸ Schou C. "Mammalian allergens". A: Lockey RF, Bukant SC (editors). *Allergens and Allergen Immunotherapy.* New York, Dekker, 1999, pp 225-235.
- ²²⁹ Stadler MB, Stadler BM. "Allergenicity prediction by protein sequence". *FASEB J.* 2003; 17: 1141-1143.
- ²³⁰ Hoffman DR. "Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic crossreactivity". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 92: 707-716.
- ²³¹ Müller L, Vogel M, Stadler M, Truffer R, Rohner E, Stadler BM. „Sensitization to wasp venom does not induce autoantibodies leading to infertility". *Mol Immunol.* 2008 Aug; 45(14): 3775-85
- ²³² Mikkelsen EJ, Henderson LL, Leiferman KM, Gleich GJ. "Allergy to human seminal fluid". *Ann Allergy.* 1975; 34: 239-243.
- ²³³ Frankland AW, Parish WE. "Anaphylactic sensitivity to human seminal fluid". *Clin Allergy.* 1974; 4: 249-253.
- ²³⁴ Berger H. "Allergy to human semen". *NY State J Med.* 1975; 75: 1072-1073.
- ²³⁵ Kroon S. "Allergy to human seminal plasma: a presentation of six cases". *Acta Dermatovenerol.* 1980; 60: 436-439.
- ²³⁶ Levine BB, Siraganian RP, Schenkein I. "Allergy to human seminal plasma". *N Engl J Med.* 1973; 288: 894-896.
- ²³⁷ Freeman S. "Woman allergic to husband's sweat and semen". *Contact dermatitis.* 1986; 14: 110-112.
- ²³⁸ Mathias CGT, Frick OL, Caldwell TM, Yunginger JW, Maibach HI. "Immediate hypersensitivity to seminal fluid and atopic dermatitis". *Arch Dermatol.* 1980; 116: 209-212.
- ²³⁹ Végvári A, Rezeli M, Sihlbom C, Häkkinen J, Carlsohn E, Malm J, Lilja H, Laurell T, Marko-Varga G. "Molecular microheterogeneity of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry". *Clin Biochem.* 2011 Dec 16.
- ²⁴⁰ Végvári A, Rezeli M, Welinder C, Malm J, Lilja H, Marko-Varga G, Laurell T. "Identification of prostate-specific antigen (PSA) isoforms in complex biological samples utilizing complementary platforms". *J Proteomics.* 2010 Apr 18; 73(6): 1137-47.

-
- ²⁴¹ Johansson SG, Oman H, Nopp A, Pettersson S. "The importance of IgE antibody levels in anti-IgE treatment". *Allergy*. 2006; 61: 1216-9.57: 611-5.
- ²⁴² Beyer K, Ellman-Grunther L, Jarvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA. "Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts". *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 202-7.
- ²⁴³ Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Chatchatee P, Busse PJ, Sampson HA. "B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy". *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110: 293-7.
- ²⁴⁴ Pierson-Mullany LK, Jackola DR, Blumenthal MN, Rosenberg A. "Evidence of an affinity threshold for IgE-allergen binding in the percutaneous skin test reaction". *Clin Exp Allergy*. 2002; 32: 107-16.
- ²⁴⁵ Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. "Microarray immuno- assay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes". *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 776-82.
- ²⁴⁶ Christensen LH, Holm J, Lund G, Riise E, Lund K. "Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen Challenge". *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122: 298-304.
- ²⁴⁷ Christensen LH, Riise E, Bang L, Zhang Ch, Lund K. "Isoallergen Variations Contribute to the Overall Complexity of Effector Cell Degranulation: Effect Mediated through Differentiated IgE Affinity". *The Journal of Immunology*. 2010, 184: 4966-72