

Sección Técnica

*Este artículo fue publicado en el número 4-1999, páginas 19 a 24.
Siguiendo la línea de la página Web del INSHT se incluirán los textos íntegros de los artículos
prescindiendo de imágenes y gráficos no significativos.*

Alergia a enzimas, una consecuencia del uso industrial de alergen

La alergia a enzimas constituye un capítulo importante de la patología ocupacional por hipersensibilidad. A pesar de que son alergen conocidos desde hace muchos años, se han realizado pocos esfuerzos para su control y menos aún para su posible tratamiento. Esta revisión pretende discutir algunos de los aspectos más importantes que podrían contribuir a hacer descender la prevalencia de la sensibilización a este grupo de alergen.

Enrique Alday*,
Ignacio Moneo**,
María Gómez*,
Pedro Ojeda*,
Alfredo Bootello***

Unidad de Inmunoalergia Laboral:

* Centro Nacional de Nuevas Tecnologías. Madrid. INSHT

** Centro de Investigación Clínica Carlos III. Madrid

*** Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Las enzimas como alternativas industriales

Desde la antigüedad el hombre ha estado manejando consciente o inconscientemente **procesos enzimáticos**, habiendo llegado a altas cotas de perfeccionamiento en su uso sin saber incluso dónde residían su efectos concretos. **Basten como ejemplos la producción de pan, vino, cerveza, queso, etc.** Muy recientemente en la historia comienza a conocerse el mecanismo de actuación de las enzimas y se van aplicando en diferentes procesos con beneficios industriales indudables. Disponer de enzimas permite en muchos casos abaratar costes de producción, tiempo, incrementar rendimientos, mejorar el producto, etc. Este aspecto economicista del empleo de enzimas debe complementarse actualmente con la mejora de nuestro medio ambiente que se consigue por el empleo de estas proteínas en sustitución de procesos industriales, algunos de ellos altamente dañinos para el medio ambiente. Por todo ello no sería posible hoy en día abandonar su uso sin que ello tuviera graves repercusiones en nuestra calidad de vida.

Los especialistas conocen desde hace tiempo que las enzimas son utilizados en procesos industriales, pero quizá no el grado de extensión de su uso y los diferentes campos de interés. La lista siguiente contiene algunas de las principales aplicaciones actuales del uso de enzimas empleadas solas o en combinación:

- Detergentes: eliminación de manchas proteicas, lipídicas y de almidón. Restauración de fibras de almidón.
- Textil: descolado, acabado de tela vaquera, biopulido, lavado después del blanqueo.
- Pasta de papel: modificación del almidón, aumento del efecto blanqueante, control de resinas de depósito.
- Cuero: rendido, remojo, depilado, desengrase.
- Panificación complemento de harina, mejora del color de la corteza, refrigeración y congelación de masas, antiendurecimiento, mejora de las masas, debilitación del gluten, fortalecimiento del gluten.
- Producción de almidón y azúcar: licuefacción del almidón, sacarificación, isomerización y producción de azúcar.
- Productos lácteos y derivados: coagulación de leche, hidrólisis de lactosa, modificación de proteínas, desarrollo del sabor en quesos, producción de quesos modificados, eliminación de peróxido de hidrógeno.
- Vinos y zumos de fruta: hidrólisis de pectinas, eliminación de almidón, producción de licores y procesado de azúcar, elaboración de vinos.
- Cerveza: sustitución de malta por cebada, uso de cereales no malteados, licuefacción de granos cocidos, aumento de la fermentabilidad, control de nitrógeno, producción de cervezas hipocalóricas.
- Producción de alcohol: licuefacción de almidón, sacarificación, crecimiento mejorado de levadura.
- Aceites y grasas: interesterificación, síntesis de ésteres, producción de isolecitina, extracción de aceite de oliva vinos.
- Piensos: elaboración de piensos especiales para aves de corral y cerdos, conservación de ensilaje.
- Productos farmacéuticos: conversión de penicilina V en 6-APA, enzimas sustitutivas para medicación oral, tratamiento de inflamaciones, enzimas para cultivos de tejidos y de empleo en diagnóstico.
- Otros usos: hidrólisis de proteínas, degradación de polisacáridos, etc.

Las enzimas como alergen

Desde los años 60, quizá antes, se tiene noticia de la capacidad sensibilizante de las enzimas para el ser humano (1). La lista de enzimas responsables de patología por hipersensibilidad continúa en aumento. En los casos descritos se demuestra la producción de IgE específica por métodos "in vivo y/o in vitro" con lo que parece disponerse de métodos fiables para su diagnóstico, aunque la realidad es bien distinta. Por otro lado se han descrito sensibilizaciones tipo IV productoras de inmunidad celular que se manifiestan como dermatitis de contacto (2, 3), por lo que no cabe descartar este tipo de patología en cualquier enfermo sospechoso.

Sorprendentemente, los casos publicados abarcan enzimas derivadas tanto de mamíferos (tripsina, enzimas pancreáticas) como de aquellas obtenidas de organismos filogenéticamente mucho más distantes (bacterias, hongos, plantas). Por lo tanto cabe esperar que, cualquiera que sea su origen, las enzimas poseen una característica común: su capacidad de sensibilizar. Este hecho debería realizarse con altas medidas de seguridad, algo bien alejado de la realidad presente.

Para complicar más la situación al médico que se enfrenta a los problemas derivados de estas sensibilizaciones (usualmente el médico de empresa o el alergólogo) la información de que se dispone es usualmente escasa o nula. Como ejemplo de expuesto vamos a detallar lo que está sucediendo en la industria panificadora.

Empleo de α -amilasa en la industria de panificación

La fermentación de la masa de pan por la levadura conduce a la producción de etanol y anhídrido carbónico con lo que se consigue su hinchado. Sin embargo, la levadura es incapaz de degradar almidón, por lo que precisa que enzimas endógenas del trigo (amilasas) realicen esta función. No todas las clases de trigos contienen cantidad suficiente de amilasas, por lo que la fermentación natural es un proceso artesanal que además exige una cuidadosa selección de las harinas. La solución obvia consiste en la adición de amilasa exógena, de origen fúngico que consigue una actividad amilásica óptima y uniforme, con lo que los procesos industriales se llevan a cabo sin complicaciones. El inconveniente es la aparición de sensibilizaciones en los sujetos expuestos (2, 4, 5, 8).

Otras enzimas utilizadas en la industria de panificación

El médico bien informado conoce el empleo de α -amilasa en este tipo de actividad y no le resultaría extraño descubrir casos de trabajadores expuestos sensibilizados que intentaría diagnosticar mediante una historia clínica exhaustiva y la realización de tests in vivo y/o in vitro que demostrarán la existencia de IgE específica contra este agente. Sin embargo, la realidad podría ser muy distinta si se estuvieran empleando otro tipo de enzimas potencialmente sensibilizantes (4, 10, 11, 12, 13).

A continuación se exponen las principales enzimas usadas en este tipo de industria:

1. Hemicelulasas o pentosanasas: Las hemicelulasas juegan un papel importante como reguladoras de la hidratación de las masas, en su consistencia y en la retrogradación del almidón. En masas con alto contenido de fibra el uso de pentosanasas mejora la estructura de la corteza y aumenta el volumen del pan.
2. Fitasa: durante la fermentación la fitasa endógena del trigo hidroliza el ácido Mico que es un quelante de calcio, hierro y zinc. Normalmente no es adición fitasá pura, pero existen en el mercado mezclas conteniendo esta enzima.
3. Lipasa: cataliza la hidrólisis de los triglicéridos. Algunos preparados comerciales de α -amilasas contienen también actividad lipasa.
4. Lipooxigenasa: su efecto produce un blanqueamiento del pan al oxidar los carotenoides de la harina y mejora las propiedades reológicas de la harina. Habitualmente se obtiene esta actividad por adición de harina de soja o de habas enzimáticamente activas.
5. Glucosa-oxidasa: se emplea para reemplazar agentes oxidantes inorgánicos, no permitidos legalmente.
6. Proteasas: no muy extendida en nuestro país por el tipo de trigos, pero se emplean en la producción de galletas y panes especiales. Son habitualmente de origen fúngico, aunque se emplean también de origen bacteriano.
7. Lactasas: se utiliza en los procesos de panificación que implican la adición de lactosueros o leche en polvo (algunos panes de molde, panes especiales), siendo habitualmente de origen fúngico.

8. Isoamilasas: hidrolizan los enlaces α -1,6 de la amilopectina. Especialmente usada para masas que van a ser sometidas a congelación o refrigeración.

Similares grados de complejidad podrían estar ocurriendo en el resto de campos de uso de enzimas (13, 14, 15, 16). Este hecho equivale reconocer que la aplicación industrial de enzimas va muy por delante del conocimiento que poseemos, entre otros, los médicos sobre sus posibles usos y combinaciones en mezclas más o menos abiertamente declaradas.

Grado de pureza

Nuestro concepto de enzimas como alérgenos debe además adecuarse a la realidad industrial. Es habitual leer en los trabajos médicos como se elaboran extractos diagnósticos con el material manejado por los sujetos sensibilizados, considerando que un extracto enzimático es una única molécula que es empleada sin más para tests cutáneos, de provocación o métodos *in vitro*. Cualquier resultado positivo obtenido equivale a la presencia de IgE específica contra la enzima vez que se realizan los controles adecuados en poblaciones de referencia (atópicos no expuestos, o atópicos etc.). Sin embargo, las enzimas de uso industrial y aún las de laboratorio no son proteínas purificadas, sino habitualmente mezclas impuras que usualmente contienen otros componentes e incluso macromoléculas derivadas del medio de cultivo donde se crecen los microorganismos. Recientemente hemos podido demostrar por **immunoblotting** la existencia de sensibilización contra este tipo de contaminantes (8, 9).

Supongamos por un momento que un extracto enzimático contenga una alta cantidad de una enzima (por ejemplo una proteasa) mientras que además entran en su composición pequeñas (o no tan pequeñas) concentraciones de otra enzima (por ejemplo una amilasa) así como de proteínas derivadas del medio de cultivo. Imaginemos que un autor describe la sensibilización a esta enzima, mientras que otro encuentra que existe una reacción cruzada contra la enzima minoritaria y un tercero encuentra sensibilización en sujetos aparentemente no expuestos. Como resultado obtendremos una auténtica confusión, teniendo todos los autores razón y habiendo sido todos sus datos parcialmente correctos. Desgraciadamente es nuestra situación actual, debida a una falta de rigor en el estudio inmunoquímico de los teóricos antígenos. De este hecho se deduce la urgente necesidad de disponer de enzimas cromatográficamente purificadas como reactivos de diagnóstico.

Implicaciones en diagnóstico y su prevención

La existencia de contaminantes de medios de cultivo y de otras proteínas procedentes del microorganismo productor de enzimas podrían falsear cualquier método de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* actualmente existente al asumir que la positividad obtenida en el test es debida a la existencia de IgE específica contra la enzima. Únicamente métodos como el **immunoblotting** demostrarían que la IgE de la muestra va dirigida contra componentes de distinto peso molecular al descrito para la enzima. Sin embargo, no resulta fácil ajustar las condiciones técnicas para que este procedimiento resulte aplicable al diagnóstico sistemático en alergia a enzimas. Una de las explicaciones más atractivas sería que las enzimas en general son proteínas altamente sensibles a la denaturación que implica la separación por SDS-PSGE, por lo que se pueden requerir

procedimientos especiales de renaturación (4, 8 ver otros). En condiciones apropiadas este método ha demostrado ser altamente sensible y específico.

Alternativas para un uso correcto de enzimas

Ante un panorama tan confuso como el descrito **parece una aberración que se autorice el uso indiscriminado e incontrolado de enzimas para cualquier uso sin el menor control**. Sin mayor esfuerzo podrían adoptarse ciertas medidas no empleadas actualmente con carácter inmediato que indudablemente repercutirían positivamente en la disminución de la prevalencia de sensibilización:

1. Advertencia por parte de la empresa suministradora de enzimas de la potencial capacidad sensibilizante del producto empleado e instrucciones de manejo del producto.
2. Medidas de control ambiental en los puestos de trabajo con el fin de conseguir contaminaciones ambientales no sensibilizantes.
3. Si se demuestra la existencia de relación entre sensibilización y hábito tabáquico, las empresas deberían invertir recursos en programas de deshabitación.
4. Empleo sistemático de enzimas granuladas o microencapsuladas que reduzcan la contaminación ambiental que inducen las enzimas usadas en forma de polvo. En muchos casos existen este tipo de enzimas actualmente en el mercado, por lo que parece un contrasentido no utilizarlas por norma.

Otras aproximaciones como el estudio de los candidatos al puesto de trabajo con el fin de excluir atópicos no parecen haber solucionado el problema de una manera definitiva. La posible asociación de respuesta inmune y fenotipos de HLA que haría posible la exclusión de sujetos en riesgo o la definición de sujetos no respondedores parece una hipótesis atractiva. En nuestra experiencia del modelo α -amilasa esta aproximación teórica no ha resultado útil (datos no publicados).

Medidas preventivas sanitarias

Respecto al estudio de candidatos a un puesto de trabajo, si bien, no soluciona el problema al 100%, sí por lo menos, disminuye la incidencia de patología profesional, para lo cual se deben tener en cuenta en los reconocimientos Médicos previos (18):

1. Medidas preocupacionales

- 1.1. Historia Clínico-Laboral detallada, haciendo hincapié en la Historia tanto familiar como personal de atopia.
- 1.2. Tests de Hiperreactividad Bronquial, con el fin de desenmascarar cuadros de Asma y/o de Obstrucción Crónica al Flujo Aéreo (O.C.EA.) previos.
- 1.3. Test cutáneos a inhalantes habituales, para descartar patología alérgica común.
- 1.4. Estudio inmunológico, mínimo IgE total, para descartar atopia, y según nuestra experiencia importante la realización de IgE específica contra la/las enzimas que se van a manejar (19).

Estos pacientes atópicos tienen 9 posibilidades más de riesgo de padecer patología laboral por inhalación de estas sustancias de alto peso molecular, que los no atópicos (20), por lo que se debería restringir la inclusión en puestos de trabajo en los que manejen dichos productos enzimáticos.

2. Medidas ocupacionales

Una vez incluido en su puesto de trabajo, y ante un posible fallo de las Medidas preventivas higiénico-industriales, se deben realizar seguimientos periódicos de control:

- 2.1. Seguimiento de su historia clínico-laboral, respecto a la posible aparición de síntomas clínicos en relación con su puesto de trabajo.
- 2.2. Valoración inmunológica anual de IgE específicas, respecto a los productos que maneja el trabajador en su puesto de trabajo.
- 2.3. Test cutáneos anuales (Prick tests), respecto a los productos que maneja el trabajador en su puesto de trabajo.
- 2.4. Seguimiento anual de Exploración Funcional Respiratoria (Espirometría y Curva Flujo-Volumen), y Test de Hiperreactividad bronquial en el caso de considerarlos necesarios.

3. Medidas paraocupacionales

Control de MEDIDAS PARAOCUPACIONALES, no estrictamente necesarias desde el punto de vista Médico, ya que en el momento actual y con los sistemas de Prevención Higiénico-Industrial (limpieza, cambio de ropa etc.) es prácticamente imposible el transporte "airbone" de antígenos industriales a domicilio.

Otras aproximaciones novedosas

La necesidad de incorporar enzimas a procesos productivos por deficiencias intrínsecas podría tener soluciones inesperadas hace unos años. Tenemos el ejemplo del uso de α -amilasa fúngica que como hemos visto anteriormente se usa para equilibrar el contenido intrínseco de la actividad de la propia harina ante la incapacidad de la levadura de aprovechar el almidón para el proceso de fermentación. Una solución reciente ha sido la incorporación mediante ingeniería genética del gen productor de α -amilasa a la levadura, convirtiéndola así en un nuevo microorganismo que ya no precisa de la adición de enzima exógena al secretarla al medio de cultivo (6). Nuestros estudios iniciales sugieren que la sensibilización a esta enzima podría desaparecer en breve plazo si se utilizara industrialmente esta cepa de levadura. Quizá este modelo pueda ser aplicable a otros campos de la sensibilización a enzimas.

El último aspecto de interés sería el tratamiento específico de los sujetos sensibilizados. Aproximaciones recientes en otros modelos sugieren que la administración de péptidos derivados de alérgenos, libres de epitopos reconocidos por IgE, podrían ser administrados con seguridad y constituirían una alternativa válida para conseguir la tolerancia inmunológica frente a este tipo de alérgenos (21).

Conclusiones

La solución a un problema de tanta repercusión social como el descrito comienza por una correcta información y por la sensibilización de todos los estamentos responsables de intentar buscar soluciones. Si, como parece aparente, nuestro estilo de vida hace imposible prescindir del uso de tan potentes alergenicos, deberemos por lo menos aprender a convivir con ellos. Este hecho implica el cambio de mentalidad de nuestra sociedad para no crear alarma social, pero empezar a adoptar medidas sensatas que reduzcan el problema al mínimo. Varias de las medidas propuestas podrían adoptarse con rapidez y obtendríamos resultados en corto plazo. Con independencia de este aspecto, deberíamos estar preparados para descubrir nuevas sensibilizaciones hasta ahora poco o nunca descritas en procesos industriales que manejaran estos componentes.

Agradecimientos

Este trabajo preliminar se ha realizado gracias a la Beca de la Fundación MAPFRE MEDICINA (Enzimas en la Industria Textil) con la colaboración del CNNT (Proyecto 129) del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Bibliografía

1. FINDT, M.L.H.: "Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of bacillus subtilis containing proteolytic enzyme". Lancet 1969; 1: 1177-84.
2. SCHIRMER, R.H.; KALVERAM, K.J.; KALAVERA, C.M.; SIEBERT, J.; UNZE, J.: "Chronisch lichenoid Dermatitis bei Sensibilisierung gegen Alpha-Amylase bei einem Bäcker". Z. Hautkr 1987; 62: 792-97.
3. MORREN, M.A.; JANSSENS, V; DOOMS-GGGSSE A.D. et al: "a-Amylase, a flour additive: an important cause of protein contact dermatitis in bakers". J Am. Acad. Dermatol. 1993; 29: 723-28.
4. LOSADA, E.; HINOJOSA, M.; MONEO, L; DOMÍNGUEZ, J.; DÍEZ-GÓMEZ, M.L.; IBÁÑEZ, M.D.: "Occupational asthma caused by cellulase". Allergy. Clin. Immunol. 1986; 77: 635-39.
5. ALDAY, E.; MONEO, L; LUCENA, R.; CURIEL, G.: Alpha amylase hypersensitivity. Diagnostic Methods. Madrid Spain. P-0023. Allergy supplement N1 26 Vol 56. pag 88. XVI EUROPEAN CONGRESS OF ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY 1995.
6. MONEO, L; SALAZ, P; ALDAY, E.: Allergenicity of a new recombinant strain of baker's yeast which secretes alphaamylase from aspergillus oryzae. Madrid/Valencia Spain OC-088, Allergy supplement nl 26 vol 56. pag. 37. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology. 1995.
7. BENEDITO, C.: Utilización de los enzimas combinados de acción secundaria en panificación. VI Jornadas Técnicas sobre la calidad de los trigos españoles. Asociación Española de Técnicos Cerealistas. Sevilla 1994.
8. MONEO, L; ALDAY, E.; SÁNCHEZ AGUDO, L.; CURIEL, G.; LUCENA, R.;

- CALATRAVA, J.M.: "Skin Prick test for Hypersensitivity to alfa amilase preparations". *Occup. Med.* 1995; Vol 45: 151-155.
9. MONEO, L.; ALDAY, E.; CURIEL, G.; LUCENA, R.; GONZÁLEZ, M.: "Detección de anticuerpos contra alfa amilasa por 'Immunoblotting'". *Reu Esp. Alergol. Inmunol. Clin.* Vol. 7 supl. 2. Septiembre 1992.
 10. GALLEGUILLOs, E; RODRÍGUEZ, J.C.: "Asthma caused by bromelin inhalation". *Clin. Allergy.* 1978; 8: 21-24.
 11. NOVEY, H.S.; KEENAN, R.; FAIRSHTER, R.D.; WELLS, I.D.; WSON, A.F.; CULVER, B.D.: "Pulmonary disease in workes exposed tod papain: clinicophysiological and immunological stuies". *Clin. Allergy.* 1982; 12: 9-17.
 12. CARTIER, A.; MALO, J.L.; PENAU, L.; DOLOVICH, J.: "OCCUpational astha due to pepsin". *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1984; 73: 74-77.
 13. FLINDT, M.L.H.: Allergy to a-amylase and papain. 1979; 1: 1407-08.
 14. TARVAINEN, K.; KANERVA, L.; TUPASELA, O. et al: "Allergy from cellulase and xylanase enzymes". *Clin. Exp. Allergy.* 1991; 21: 609-15.
 15. HARTMANN, A.L.; WALTER, H.; WUTRICH. B.: "Occupatual allergic asthma due to pectinase, a proteolytic enzyme". *Schweiz Med Wochenschr* 1983; 113: 265-67.
 16. COLTEN, H.R.; POLAKOFF, PL.; WEINSTEIN, S.F.; STRIEDER. D.: "Immediate hypersensitivity to hog trypsin resulting from industrial exposur". *N. Engl. J. Med.* 1975; 292: 1050-53.
 17. BELIN, L.; HOBORN, J.; FALSEN, E.; ANDRE, J.: "Erizyme sensitisation in consumers of enzyme-containing washig powder". *Lancet* 19702: 1153-57.
 18. ALDAY, E.; GÓMEZ, M.; MONEO, L.; BOOTELLO, A.: Valoración del menoscabo permanente: Tomo II (Yaloracion de la Incapacidad Laboral en Neumologia): *Patologia respiratoria Laboral "Sensibilizan te"*. 20 Ed. Tomo II, pag. 5593.
 19. MONEO, L.; ALDAY, E.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.; MAQUEDA, J.; CURIEL, G. and LUCENA, R.: "Alpha-amylase hypersensitivity in non-exposed millers". *Occup. Med.* 1994, 44: 91-94.
 20. LUCENA, R.; MONEO, L.; ESPINOSA, R.; ALDAY, E.; SÁNCHEZ AGUDO, L.; CURIEL, G.: "Prevalencia de sensibilizacion laboral en pacientes atopicos frente a los no atópicos". *Rev. Med. del Trabajo Resumen comunicaciones. I Congreso Nacional de Especialistas en Medicina del Trabajo* 1994.
 21. WALLNER, B.P; GEFTER, M.L.: "Immunotherapy with T cell-reactive peptides derived from allergens". *Allergy* 1994; 49: 302-08