

Importancia de los Epítopes de Carbohidratos en los Alergenos

Leonar Arroyo¹, Leonardo Puerta²

Los carbohidratos presentes en alergenios derivados de plantas e invertebrados, en algunos casos, contienen epítopes que reaccionan con anticuerpos tipo IgE. Esta reactividad es mediada por la presencia de los residuos de a) (1,3)-fucosa y b) (1,2)-xilosa unidos al núcleo de manosa, los cuales están ampliamente distribuidos en plantas e invertebrados, pero no se encuentran en los mamíferos. La exposición al polen y a la picadura de abejas, inducen la producción de anticuerpos IgE contra epítopes de carbohidratos. Estos anticuerpos presentan reactividad cruzada con carbohidratos de estructura similar presentes en pólenes, en alimentos de origen vegetal y en invertebrados. Muchos casos de reactividad cruzada en los que están involucrados los epítopes de carbohidratos no están acompañados de síntomas clínicos, sugiriendo que los anticuerpos IgE dirigidos contra estos epítopes no tienen relevancia clínica. Estos anticuerpos producen resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico para alergia al polen y a los alimentos. Sin embargo, los alergenios Cup a 1, Lyc e 2 y Api g 5 poseen epítopes de carbohidratos, los cuales parecen ser importantes en casos de alergia al cedro, al tomate y al apio, respectivamente. Dichos epítopes inducen la degranulación de basófilos, por lo que podrían jugar papel en la inducción de síntomas clínicos. Los alergenios recombinantes producidos en sistemas de expresión procariotas carecen de los epítopes de carbohidratos, por lo que no serían los reactivos apropiados para el diagnóstico de alergia a los alergenios mencionados. Se necesitan más estudios para establecer la verdadera importancia de los epítopes de carbohidratos en las manifestaciones clínicas de las alergias. *Salud UIS 2003;35:71-79*

Palabras Clave: Alergenios, Alergia, Alergenios recombinantes, CCDs, Epítopes, IgE

The carbohydrates in allergens from plants and invertebrates may contain epitopes that bind to IgE. This binding involves the presence of glycans carrying a (1,3)-fucosyl and b(1,2)-xiloyl residues, which are distributed in plants and invertebrates but mammals. The exposure to pollen and the bee stings induce the production of specific IgE antibodies against carbohydrate epitopes, these antibodies show cross-reactivity with carbohydrates of similar structure present in pollen, vegetable foods and invertebrates. Many cases of cross-reactivity that involve carbohydrate epitopes did not show clinical symptoms, suggesting that IgE antibodies to these epitopes are not of clinical relevance. IgE antibodies to carbohydrate epitopes produce false-positive test results for pollen and food allergy. However, Cup a 1, Lyc e 2 and Api g 5 allergens have carbohydrate epitopes, which seem to be important in cases of allergy to cedar, tomato and celery, respectively, because they induce basophil degranulation, having probably a role in the manifestation of clinical symptoms. Recombinant allergens obtained in prokaryotic expression systems lack carbohydrate epitopes; therefore, they are not appropriate for diagnosis of allergy due to the mentioned allergens. Further studies are needed to establish the real importance of the carbohydrate epitopes in the clinical manifestation of allergy diseases. *Salud UIS 2003;35:71-79*

Key words: Allergens, Allergy, CCDs, Epitopes, IgE, Recombinant allergens

INTRODUCCIÓN

La presencia de carbohidratos es común en proteínas alérgicas y no alérgicas. La naturaleza de los carbohidratos que son incorporados a la molécula del alérgeno, durante el proceso de glicosilación de la proteína, ha despertado

especial interés desde que a principios de los años 80 se reportó por primera vez, la presencia en el suero de pacientes alérgicos, de unos anticuerpos tipo IgE dirigidos contra epítopes de carbohidratos.¹

Los anticuerpos mediadores de las reacciones alérgicas son de tipo IgE y están dirigidos fundamentalmente a epítopes de naturaleza proteica, los cuales tienen como sitio de contacto con el anticuerpo unos pocos aminoácidos. Por otro lado, los anticuerpos IgE que se unen a los epítopes de carbohidratos presentes en los alergenios establecen contacto con residuos de azúcares bastante comunes y presentes en estructuras muy similares en las diferentes proteínas, lo cual origina

¹Estudiante de Biología. Universidad de Sucre. Sincelejo. Colombia

²Profesor Titular. Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena. Bolívar. Colombia

Correspondencia: E-mail: lpuerta@enred.com

Recibido Febrero 23 de 2003/Marzo 10 de 2003

con frecuencia reacciones cruzadas inesperadas entre alérgenos distintos. En consecuencia, se han denominado determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada ("Crossreactivity Carbohydrates Determinants" - CCDs). Estos epítopes parecen ser los responsables de resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico de alergias, basadas en la cuantificación de los anticuerpos IgE en el suero (RAST y ELISA), que se presentan en ausencia de manifestaciones clínicas. Por lo cual, el diagnóstico de las alergias puede afectarse de manera significativa cuando intervienen alérgenos que contienen CCDs.^{2,3}

Los linfocitos B y los anticuerpos tienen la capacidad de reaccionar directamente con epítopes proteicos, como también con epítopes de carbohidratos. Por otra parte, los linfocitos T reaccionan sólo con péptidos derivados de proteínas procesadas por células presentadoras de antígeno que muestran el péptido acompañado de una molécula del sistema HLA (antígeno leucocitario humano) anclada sobre la superficie celular. Por lo anterior se considera que la respuesta inmune a carbohidratos puros, es independiente de las células T y parece ser la razón de porque los anticuerpos dirigidos contra carbohidratos tiene un patrón de isotipo restringido (mayoritariamente IgM y a veces IgG1 o IgG2). La producción de anticuerpos IgE e IgG4 hace parte de una respuesta inmune adaptativa y es el resultado de un cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, que presupone una activación de los linfocitos T.

Entonces ¿cómo es que se producen anticuerpos IgE específicos para moléculas de carbohidratos presentes en los alérgenos?. En el alérgeno glicosilado se presenta una situación similar al mecanismo de inmunización clásico hapteno-transportador, donde la molécula de carbohidrato funciona como hapteno, mientras que la parte peptídica actúa como transportador inmunogénico, activando a los linfocitos T.⁴ Por lo tanto, los anticuerpos IgE producidos contra el carbohidrato son generalmente el resultado de una respuesta policlonal al alérgeno junto con una amplia variedad de anticuerpos IgE contra epítopes proteicos.

El conocimiento de los epítopes de carbohidratos en los alérgenos y los anticuerpos dirigidos contra ellos reviste hoy gran importancia especialmente cuando se proponen novedosos esquemas de inmunoterapia y técnicas de diagnóstico para las alergias. Los alérgenos recombinantes se proponen actualmente como alternativa al uso de extractos alérgicos naturales en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas. Muchos de los alérgenos recombinantes se han obtenido

utilizando sistemas de expresión en procariotas, como la *Escherichia coli*, estos sistemas no realizan la glicosilación de aquellas proteínas que en su forma natural se encuentran glicosiladas. De tal manera que si existen epítopes que comprometen o están constituidos por carbohidratos, la utilidad de los recombinantes obtenidos en procariotas pudiera afectarse de manera importante. Por lo anterior, un mejor entendimiento de la naturaleza de estos epítopes, así como su impacto sobre el grado de alérgenicidad de moléculas nativas y recombinantes, reviste especial interés en el campo de la alergología y la biotecnología de alérgenos. Esta revisión es dirigida a ofrecer un panorama sobre la naturaleza de los epítopes de carbohidratos y los recientes hallazgos relacionados con la participación de dichos epítopes en la reactividad de los alérgenos como también sus implicaciones prácticas y clínicas.

NATURALEZA DE LOS EPÍTOPES DE CARBOHIDRATOS

La mayoría de las proteínas producidas por eucariotas, a diferencia de las proteínas producidas por los procariotas, están glicosiladas como resultado de las modificaciones de postraducción realizadas durante su paso a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Los residuos de carbohidratos se clasifican en dos grupos: a) ligados a oxígeno (O-glicosilación), cuando la unión del carbohidrato se produce en el oxígeno del grupo hidroxilo de serina, treonina o hidroxiprolina y b) ligados a nitrógeno (N-glicosilación) cuando la unión se da en el átomo de nitrógeno del grupo amino de la asparagina, siendo este grupo el más común.⁵ La N-glicosilación de la mayoría de las proteínas se inicia por la transferencia de un precursor del oligosacárido $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, constituido por tres glucosas, nueve manosas y dos moléculas de N-acetilglucosamina, en el retículo endoplásmico, el cual es posteriormente modificado durante el transporte de la glicoproteína a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, por enzimas como glicosilasas y glicosiltransferasas, entre otras.⁵ Las glicoproteínas de origen vegetal, tienen carbohidratos complejos que presentan residuos del tipo a(1,3)-fucosa unidos al residuo de glucosamina más próximo y/o residuos b(1,2)-xilosa unidos a la b-manosa. Estos residuos de fucosa y xilosa son típicos en carbohidratos complejos de plantas e invertebrados y no se encuentran en mamíferos, por lo que son altamente inmunogénicos.

La producción de anticuerpos contra los residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa ha sido demostrada en cabras inmunizadas con la peroxidasa del rábano (HRP).⁶

Anticuerpos tipo IgG e IgM producidos en ratas y ratones inmunizados con HPR, reaccionan de manera cruzada con la fosfolipasa A2 del veneno de la abeja (PLA2) y la hemocianina debido a la presencia de los residuos a (1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa, respectivamente. En personas no alérgicas se demostró la presencia de anticuerpos tipo IgG e IgM específicos para estos residuos, probablemente debido a inmunización con antígenos ambientales.⁷

La estructura del epítipo de carbohidrato de PLA2 está conformado por un núcleo con dos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y una manosa, aunque puede ramificarse por la adición de dos residuos de manosa. El núcleo también posee un residuo de a (1,3)-fucosa unida al residuo GlcNAc más interno, el cual participa directamente en la unión a los anticuerpos IgE.^{8,9} Esta estructura también se ha encontrado en glicoproteínas de otros insectos y parásitos.¹⁰

La estructura primaria de los N-carbohidratos presentes en los alérgenos mayores del polen del olivo (Ole e 1), del loliun (Lol p 11) contienen los residuos a(1,3) fucosa y b(1,2) xilosa, y el alérgeno mayor del maní (Ara h 1) contiene solo el residuo b(1,2) xilosa. Estos residuos participan en la unión a la IgE y se ha sugerido que otros factores podrían también estar involucrados en dicha unión. El alérgeno mayor del polen *Cupressus arizonica*, Cup a 1, contiene un epítipo de carbohidrato con reactividad IgE constituido por los residuos b(1,2) - xilosa y a(1,3)-fucosa.^{12,13} En el alérgeno mayor del polen *Plantago lanceolata* (Pla l 1), se ha identificado que el residuo a(1,3)-fucosa tiene capacidad de unirse a la IgE pero se pierde después de la eliminación de los carbohidratos del alérgeno sugiriendo que en este alérgeno, dicha estructura no parece ser relevante desde el punto de vista alérgico.¹⁴

La estructura del carbohidrato presente en el alérgeno del tomate, Lyc e 2, posee los residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa constituyendo un epítipo alérgico, en el cual dichos residuos son importantes para que se realice la reacción con la IgE.¹⁵ (En la tabla se registran los alérgenos en que se ha demostrado epítipes de carbohidratos con capacidad de unión a la IgE.

El epítipo de Lewis^a, Galb(1,3)Fucosaa(1,4)GlcNac, también se ha encontrado en alérgenos de origen vegetal¹³, sin embargo no ha sido asociado a la reactividad con los anticuerpos IgE. En estudios en que se ha usado un conjugado de BSA con los motivos de Lewis^a en ensayos de RAST se muestra que este epítipo no participa en la reactividad con la IgE.¹¹

Tabla 1. Alérgenos con epítipes de carbohidrato de unión a IgE

Alérgeno	fuente del alérgeno	Residuos en el N-carbohidrato		referencia
		α (1,3)- -fucosa	β (1,2)- -xilosa	
PLA2	<i>Apis mellifera</i>	+	-	9
Ole e 1	<i>Olea europea</i>	+	+	11
Lol p 11	<i>Lolium Perenne</i>	+	+	11
Ara h 1	<i>Arachis hipogaea</i>	-	+	11
Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>	+	+	13
Pla l 1	<i>Plantago lanceolata</i>	+	¿	14
Lyc e 2	<i>Lycopersicum esculentum</i>	+	+	15
Api g 5	<i>Apium graveolens</i>	+	+	31

MÉTODOS USADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS ÉPITOPES DE CARBOHIDRATOS

La contribución de los residuos de carbohidratos en la actividad antigénica de una proteína se puede determinar mediante la comparación de la actividad o propiedades inmunogénicas de la proteína glicosilada con la actividad de la proteína parcial o totalmente desglicosilada. La desglicosilación se puede lograr utilizando reactivos químicos o utilizando enzimas específicas. Entre los reactivos químicos son bastante usados el tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico y el ácido peryódico, los cuales eliminan la molécula de carbohidrato del alérgeno. Sin embargo, en algunas ocasiones la utilización de estos reactivos puede afectar bastante la estructura de la proteína. Los métodos enzimáticos, permiten la desglicosilación delicada y eficaz de las proteínas. Existen en el comercio glicosidasas que cortan específicamente el enlace N-glicosídico entre la cadena polipeptídica y el carbohidrato. Entre ellas se encuentran la endoglicosidasa H que actúa principalmente cuando el carbohidrato es rico en manosas;¹⁶ la glicosidasa PNGasa F, que elimina N-carbohidratos de tipo rico en manosas y de tipo complejo, siempre y cuando no posea un residuo a(1,3)-fucosa unido a la N-acetilglucosamina más próxima a la cadena polipeptídica¹⁴ y la glicosidasa PNGasa A, la cual corta cualquier tipo de N-carbohidrato presente en la cadena polipeptídica.¹⁴ Una vez eliminado el carbohidrato se puede analizar la actividad antigénica o alérgica de la proteína remanente y compararla con la de la proteína nativa.

Alternativamente a la desglicosilación de la proteína, se puede utilizar el tratamiento con proteasas específicas como la proteinasa K, la cual produce la degradación casi completa de la fracción polipeptídica, quedando el

azúcar anclado a una mínima secuencia de aminoácidos (glicopéptido). El glicopéptido puede ser fijado a una fase sólida y posteriormente analizarse la actividad antigénica.^{11,15} Por otra parte, el carbohidrato, después de ser aislado por técnicas cromatográficas, puede ser analizado utilizando técnicas como: resonancia magnética nuclear^{9,13} y espectrometría de masa (MALDI-TOF)^{7,11,13,15} para determinar la estructura completa de la molécula de carbohidrato presente en el alérgeno.

Los anticuerpos específicos contra los residuos a (1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa de la HRP se han usado para detectar la presencia de estos residuos en la molécula del alérgeno. Además al poner a reaccionar previamente estos anticuerpos con el alérgeno y posteriormente incubarlos con el suero de alérgicos, (inhibición de la unión de la IgE), se ha podido determinar la capacidad de unión de los epítopes de carbohidratos a la IgE.^{14,17} Por otra parte, mediante la eliminación de los anteriores residuos de azúcares del alérgeno y posterior reacción de éste con sueros de alérgicos se ha podido establecer la participación de estos residuos de azúcares en la unión a los anticuerpos tipo IgE.^{8,11}

IMPLICACIONES SOBRE LA REACTIVIDAD CRUZADA

La reactividad cruzada está dada por la presencia de epítopes antigénicos comunes o estructuras similares en las proteínas comprometidas en dicha reactividad. Proteínas que cumplen una misma función biológica

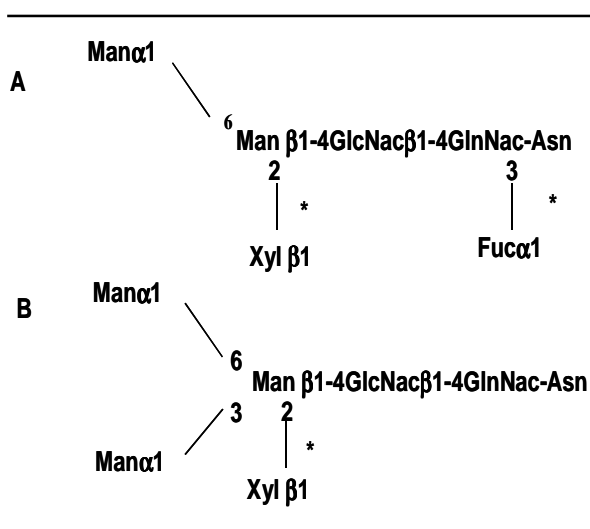


Figura 1. Estructura de N-carbohidratos aisladas de los alérgenos Lol p 11 (A) y Ara h 1 (B). * Residuos b(1,2) - xilosa y a (1,3) – fucosa, epítopes de unión a la IgE.

en diferentes especies y con una estructura molecular bastante conservada, contribuyen a la producción de reacciones cruzadas entre especies filogenéticamente distantes.¹⁸ Ejemplos: los pacientes sensibilizados a profilinas de pólenes (una proteína alérgica que hace parte del citoesqueleto de la mayoría de los eucarióticas) generalmente reaccionan con un amplio rango de profilinas originadas en pólenes de diferentes plantas o alimentos vegetales:¹⁹ el alérgeno mayor del abedul, Bet v 1,¹⁷ es homólogo a miembros de la familia de proteínas relacionadas con la defensa de las plantas (PR-10) y causa reacciones cruzadas con alérgenos derivados de manzana, cereza, pera, albaricoque, apio y zanahoria;¹⁹ la tropomiosina, una proteína alérgica que participa en la actividad contráctil de las células y ampliamente distribuida entre los organismos, participa en las reacciones cruzadas entre especies de invertebrados no relacionados como los ácaros, los camarones y los insectos.²⁰ Por otra parte, proteínas con funciones biológicas diferentes pero con homología estructural en los sitios de unión al calcio parecen estar involucradas en la alergenicidad cruzada entre diferentes especies de vegetales e incluso entre algunas no relacionadas filogenéticamente como oleáceas, gramíneas, betuláceas, pináceas y cupresáceas.²¹

Los epítopes de carbohidratos se han señalado como responsables de reactividad cruzada; los residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa están ampliamente distribuidos en glicoproteínas de origen vegetal y en invertebrados. Como resultado de esto los anticuerpos IgE producidos contra éstas estructuras pueden reaccionar con diferentes fuentes alérgicas que contengan dichos residuos, generando reacciones cruzadas entre alérgenos de fuentes poco o nada relacionadas.^{1-3,10,12,17,22-25} En el primer reporte sobre la participación de los carbohidratos en casos de alergenicidad cruzada,¹ se atribuyó la reactividad de anticuerpos IgE e el suero de alérgicos, con un número de alimentos no relacionados (papa, espinaca, trigo, maní, miel entre otros), con pólenes y con el veneno de la abeja a la presencia de los CCDs.

Batanero y col¹⁷ demostraron que el antisuero de conejo contra Ole e 1 y la IgE de pacientes alérgicos al polen de olivo reaccionaban con la bromelaína y la HRP, glicoproteínas no relacionadas que contienen los residuos a(1-3)-fucosa y/o b(1,2)-xilosa. Petersen y col,²² hallaron que el suero de pacientes alérgicos al polen del pasto *Timothy grass*, era capaz de reaccionar con un amplio rango de proteínas en el extracto de tomate y demostraron que la causa de dicha reactividad cruzada era la presencia de glicoproteínas con los residuos de fucosa.

A pesar de la amplia reactividad cruzada de los anticuerpos IgE contra CCDs, la presencia de un epítoto de carbohidratos similar compartido entre alérgenos no garantiza que siempre se presente la alergenicidad cruzada entre ellos. Por ejemplo los alérgenos Lol p 11, Ara h 1 y Ole e 1, poseen un epítoto b(1,2)-xilosa. Sin embargo, los anticuerpos IgE que se unen al epítoto b(1,2)-xilosa de Lol p11 no son capaces de reaccionar con el epítoto b(1,2)-xilosa presente en Ara ha y en Ole e1. Esto se debe a que el núcleo del carbohidrato en el alérgeno Lol p 11 tiene solamente un residuo a(1,6)-manosa, mientras que el núcleo del carbohidrato en los alérgenos Ara h 1 y en Ole e 1 posee un residuo adicional de a(1,3)-manosa que impide la unión a la IgE.¹¹

IMPACTO CLÍNICO DE LOS CCDs

La relevancia clínica de los anticuerpos IgE contra carbohidratos es hasta el momento, un asunto de bastante controversia. Debido a que los anticuerpos IgE contra carbohidratos están naturalmente mezclados con anticuerpos IgE contra epítotos proteicos, ha sido difícil determinar su papel en la inducción de síntomas en alergia a los pólenes y a los alimentos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que estos epítotos parecen no tener mayor relevancia clínica dado que los hallazgos de alergenicidad cruzada en ensayos *in vitro*, no están acompañados de manifestaciones clínicas de alergia. En 1997 se reportó que un grupo de pacientes alérgicos al polen del *Lolium perenne*, también presentó IgE al maní debido a anticuerpos IgE dirigidos contra CCDs.²

Los pacientes no presentaron alergia al maní y los anticuerpos anti CCDs fueron incapaces de causar liberación de histaminas en pruebas cutáneas y en ensayos de liberación de histamina *in vitro*. La valencia limitada de los epítotos de los alérgenos, que impide realizar un eficiente entrecruzamiento de los receptores FcεRI localizados en la superficie de las células efectoras y la baja afinidad de la IgE por los CCDs, se señalan como la causa de la pobre o nula capacidad de inducir la degranulación de los mastocitos.^{3,23,24,26}

En los últimos años se han conocido varios estudios que describen que los anticuerpos IgE contra CCDs tienen capacidad de inducir la degranulación de los mastocitos y eosinófilos en ensayos de liberación de histamina *in vitro*.^{15,27-29} Batanero y col²⁷ demostraron que el N-carbohidrato purificado del alérgeno mayor del polen de olivo (Ole e 1) indujo la liberación de histamina en basófilos humanos sensibilizados con anticuerpos IgE contra carbohidratos. Foetisch y col²⁸

demostraron que un residuo de carbohidrato conteniendo un epítoto IgE compuesto de a(1-3)-fucosa produjo una fuerte liberación de histamina en basófilos de un alérgico al apio sugiriendo que este epítoto puede ser biológicamente activo en pacientes sensibilizados a CCD.

La posible participación de los anticuerpos IgE específicos contra CCDs en la alergia al cedro. *Cupressus arizónica* ha sido apoyada por un estudio en el cual el alérgeno nativo del polen de cedro, nCup a 1, fue capaz de inducir una fuerte liberación de histamina *in vitro* sólo en aquellos basófilos sensibilizados con suero de alérgicos al polen de cedro que poseían IgE contra CCDs presentes en nCup a 1.²⁹ Otros estudios han demostrado que la forma glicosilada del alérgeno del tomate Lyc e 2 es capaz de inducir la liberación de histamina de basófilos sensibilizados con anticuerpos IgE específicos para CCDs presentes en el suero de algunos alérgicos al tomate, efecto que no se observó cuando se usó el alérgeno carente de los residuos de carbohidratos.^{15,30} También en el alérgeno del apio, Api g 5, se identificaron los epítotos de carbohidratos de unión a IgE constituidos por residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa con capacidad de inducir la liberación de histamina en basófilos de alérgicos.³¹ Estos resultados indican que los anticuerpos IgE contra CCDs podrían estar causando sensibilizaciones con relevancia clínica y señalan la necesidad de realizar investigaciones detalladas sobre casos individuales.

Los anteriores estudios sugieren que glicoproteínas multivalentes que poseen más de un N-carbohidrato en su estructura proteica como Lyc e 2, Cup a 1 o HRP, las cuales son capaces de entrecruzar eficientemente los receptores unidos a la IgE en las células efectoras, a diferencia de glicoproteínas monovalentes (como la bromelaína o la PLA2), podrían estar involucradas en el desarrollo de síntomas alérgicos. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer la verdadera importancia de estos epítotos de carbohidratos en la inducción de síntomas alérgicos.

IMPLICACION DE LOS CCDs EN EL DIAGNOSTICO DE ALERGIAS

Con frecuencia se observan resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico de alergia al polen y a los alimentos, generalmente debido a la presencia de anticuerpos IgE contra CCDs. La presencia de anticuerpos IgE contra CCDs, se ha hallado responsable de los resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico para alergia al maní *in vitro* en el 20 % de

alérgicos a los pólenes del pasto.² Mari y col,³ hallaron niveles significativos de IgE contra bromelaína, ascorbato oxidasa y polen de olivo en el suero de un paciente alérgico al polen, sin embargo la prueba cutánea resultó negativa. Se demostró que la discrepancia en estos resultados se debió a la participación de IgE contra CCDs. En el mismo estudio se halló que de 428 pacientes con polinosis el 41.7% presentó anticuerpos IgE contra la bromelaína pero al mismo tiempo prueba cutánea negativa a ésta.

En un estudio sobre la participación de los CCDs en la reactividad *in vitro* e *in vivo* de los extractos alérgicos: abedul, grama timotea, avellana, enebro, mugwort, olivo, parietaria, pino, ragweed, mosquito, veneno de avispa, cucaracha, látex, maní, goma arábiga, ácaro, *Aspergillus* y camarón, se halló que la mayoría de los extractos que provocaron prueba cutánea negativa, provocaron prueba IgE positiva *in vitro*. Solamente la HRP produjo prueba cutánea positiva en el 21% de los sujetos con IgE a los CCDs. Se concluyó que los anticuerpos IgE contra los CCDs son comunes en la población alérgica y que los resultados negativos en las pruebas cutáneas sugieren una pobre actividad alérgica de los CCDs en la población estudiada.²⁵

Los hallazgos anteriores demuestran que las reacciones cruzadas provocadas por IgE contra carbohidratos constituyen un factor importante para la producción de falsos positivos en pruebas de diagnóstico para las alergias al polen y los alimentos. También explica en gran medida la poca eficacia del diagnóstico *in vitro* en estos casos.

Con el fin de evitar los inconvenientes ocasionados por los anticuerpos IgE dirigidos contra CCDs en el diagnóstico *in vitro* de alergia a alimentos, se han propuesto algunas alternativas.²⁶ Por ejemplo, cuando se realicen ensayos de RAST se debe mezclar el suero con un inhibidor soluble como extracto de polen tratado con proteasas, lo cual evitaría la unión de la IgE a los carbohidratos del extracto alérgico unido a la fase sólida. La utilización de esta estrategia sería beneficiosa sólo cuando no exista una sensibilización importante a los anticuerpos IgE contra carbohidratos. En los casos en que estos anticuerpos IgE pudieran estar implicados en el desarrollo de síntomas alérgicos esta estrategia no sería útil.^{23,24} En estos casos, la comparación entre el alérgico glicosilado y purificado con su equivalente recombinante no glicosilado, en ensayos *in vivo* e *in vitro*, sería la alternativa efectiva para mejorar el diagnóstico en estos tipos de alergias.³

EFEECTO DE LOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN SOBRE LA PRESENCIA DE EPÍTOPES DE CARBOHIDRATOS EN LOS ALERGENOS RECOMBINANTES

El interés en evaluar la importancia de los epítopes de carbohidratos sobre la actividad de los alérgenos también se debe al creciente número de alérgenos recombinantes obtenidos en sistemas de expresión basado en *E. coli*, que produce un alérgico sin dichos epítopes. Los alérgenos recombinantes se han señalado como un reemplazo ventajoso de los extractos alérgicos nativos para el diagnóstico y tratamiento de las alergias.^{32,33} Para la obtención de los recombinantes se han utilizado sistemas procarióticos, principalmente la bacteria *E. coli*, y sistemas eucarióticos como las levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), células de insecto y plantas. Dependiendo del sistema escogido los alérgenos pueden presentar modificaciones postraducción como: glicosilación, formación de puentes disulfuro y adición de lípidos.³⁴

El sistema de expresión basado en la bacteria *E. coli* es de fácil manipulación y de alta producción de proteínas recombinantes, razones por las que se ha usado con frecuencia para la expresión de alérgenos recombinantes. Como este sistema no realiza la glicosilación, las proteínas obtenidas sirven para evaluar la ausencia de dichos epítopes en la reactividad de los alérgenos. Generalmente las modificaciones postraducción, entre ellas la glicosilación, son necesarias para el plegamiento correcto de la proteína, la conservación de la función biológica y la capacidad alérgica de las proteínas. Por ejemplo; el alérgico recombinante Art v 1, expresado en *E. coli* presentó menor respuesta cutánea y de provocación nasal que el equivalente nativo, diferencia aducida a la ausencia de carbohidratos en el recombinante.¹⁶

El sistema de expresión eucariótico por su parte, garantiza la producción de las modificaciones postraducción,³⁵ por lo que puede ser utilizada para la expresión de aquellos alérgenos en los que el plegamiento de la proteína es necesario para la reactividad con la IgE. Por ejemplo, el alérgico recombinante Cyn d 1 expresado en la levadura *Pichia pastoris* y el alérgico recombinante del Dermatophagoides pteronyssinus, Der p 1, expresado en *S. cerevisiae* presentaron mayor alergenidad que los recombinantes expresados en *E. coli*.^{36,37}

Usando sistemas de expresión basados en plantas y células de insecto, se han obtenido alérgenos recombinantes con un correcto plegamiento, con una

actividad biológica normal y con capacidad de unión a IgE. Por ejemplo, cuando la hialuronidasa (Api m2), un importante alérgeno del veneno de abeja, fue expresado en células de insecto produjo una proteína con actividad enzimática y con capacidad de unión a la IgE similar a la proteína nativa y superior a la del recombinante expresado en *E. coli*.³⁸ El alérgeno del veneno de la hormiga (Sol I 2), expresado en células de insecto presentó una reactividad IgE y plegamiento similar al de la proteína nativa, en contraste al alérgeno expresado en *E. coli*, que mostró poca reactividad IgE.³⁹ El alérgeno Bet v 1 producido en un sistema de expresión basado en planta (*Nicotiana bentamiana*), mostró una actividad inmunológica, *in vitro* e *in vivo*, similar a la de la proteína nativa.⁴⁰ El sistema de expresión en células de insecto y el sistema de expresión vegetal, son los sistemas más indicados para expresar alérgenos que en su estructura nativa contengan carbohidratos con los residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa debido a que estos son capaces de adicionar carbohidratos con estos residuos.^{7,41}

Mediante ensayos de liberación de histamina de basófilos y pruebas cutáneas se ha demostrado que la proteína nativa, nPLA2, y la proteína expresada en *E. coli* tienen una reactividad similar,^{42,43} hallazgos que indican que los epítopes de carbohidratos en este alérgeno son de poca relevancia para su actividad inmunológica. De otra parte, al compararse la reactividad entre el alérgeno recombinante rCup a 1 y el nativo nCup a 1 en alérgicos al cedro de Arizona, se halló que 14 de 30 sueros reaccionaron solamente con epítopes de carbohidratos y que la IgE proveniente de esos sueros fue capaz de inducir la liberación de histamina de los basófilos.²⁹ Estos resultados sugirieron que dichos anticuerpos pueden tener importancia en la inducción de los síntomas clínicos de alergia.

Foetisch y col,³⁰ hallaron que el alérgeno recombinante del tomate rLyc e 2 expresado en *E. coli* y por lo tanto carente de los residuos de azúcares, no reaccionó con sueros de algunos alérgicos al tomate en pruebas de ELISA ni provocó la liberación de histamina de los basófilos, mientras que el alérgeno nativo nLyc e 2 si reaccionó con todos los sueros de alérgicos al tomate e indujo la liberación de histamina de los basófilos. Este estudio resalta la importancia de escoger un sistema de expresión adecuado para la obtención del recombinante según la naturaleza del alérgeno y que los epítopes de carbohidratos, en algunos pacientes, si parecen tener una relevancia clínica.

Por otra parte, La capacidad de unión de la IgE y otros isotipos de anticuerpos, a los determinantes de carbohidratos con residuos de a(1,3)-fucosa y/o b(1,2)-

xilosa, puede tener un impacto desfavorable cuando se pretenda la aplicación en humanos de proteínas recombinantes obtenidas en sistemas de expresión que preservan dichos residuos. Por ejemplo, el uso de sistemas de expresión basados en insectos y en plantas, que adicionan dichos residuos a los recombinantes ha planteado serios interrogantes sobre la utilidad de éstos como preparados biofarmacéuticos para inmunoterapia u otros esquemas de tratamientos farmacológicos.⁷ Aunque para conocer el verdadero significado inmunogénico de los anticuerpos dirigidos contra los residuos a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa, se requieren mayores estudios, ya existe el interrogante de si la administración de glicoproteínas terapéuticas con dichos residuos en poblaciones alérgicas pudiera tener algún efecto inesperado.

CONCLUSIONES

- Los carbohidratos en algunos alérgenos representan sitios para la unión de los anticuerpos tipo IgE. Los residuos de a(1,3)-fucosa y b(1,2)-xilosa en estos carbohidratos constituyen los epítopes a través de los cuales se realiza la unión de dichos anticuerpos presentes en el suero de pacientes alérgicos.
- Los anticuerpos IgE contra los CCDs ampliamente distribuidos en glicoproteínas de plantas e invertebrados, origina reacciones cruzadas entre fuentes de alérgenos relacionadas y no relacionadas, principalmente entre pólenes y alimentos. Estas reacciones producen falsos positivos en pruebas *in vitro* para el diagnóstico de alergia a alimentos y a pólenes las cuales no siempre están acompañadas de manifestaciones clínicas.
- Hay estudios *in vitro* que muestran que los CCDs de algunos alérgenos son capaces de inducir la degranulación de basófilos sensibilizados pasivamente con sueros de pacientes alérgicos al polen o a ciertos alimentos. Por lo tanto, se sugiere que estos epítopes pudieran tener relevancia clínica en estos casos y sería importante tenerlos en cuenta para el diagnóstico de ciertos tipos de alergias.
- En algunos alérgicos los anticuerpos IgE dirigidos contra epítopes de carbohidratos en ciertos alérgenos parecen mediar manifestaciones clínicas. En estos casos los alérgenos recombinantes se deben obtener en un sistema de expresión que garantice su adecuada glicosilación. Por otro lado, para evitar falsos positivos en el diagnóstico de las alergias con alérgenos en los cuales los epítopes de carbohidratos no son relevantes, el reemplazo de los alérgenos nativos por recombinantes no glicosilados parece ser lo indicado.

REFERENCIAS

1. Aalberse R. C, Koshte V, Clemens J. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol.* 1981;68:356-364
2. Van der Veen M, Van Ree R, Aalberse R.C, Akkerdaas J, Koppelman S, Jansen H, et al. Poor biologic activity of cross-reactive directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:327-34
3. Mari A, Iacovacci P, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G, et al. Specific to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:1005-1011
4. Aalberse RC. Clinical relevance of carbohydrate allergen epitopes. *Allergy.* 1998;53:54-57
5. Helenius A, Aebi M. Intracellular of N-linked Glycans. *Sciences* 2001;291:2364-3369
6. Kurosaka A, Yano A, Itho N, Kuroba Y, Nakagawa T, Kawasaji T. The structure of neutral specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by antihorseradish peroxidase antiserum. *J Biol Chem* 1991;166:4168-72
7. Bardor M, Faveeuw C, Fitchette A-C, Gilbert D, Galas L, Trottein F, et al. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glico-epitopes, core a (1,3)-fucosa and core b(1,2)-xilosa. *Glicobiology.* 2003;13:427-434
8. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, Marz L, and Becker WM. Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arc Allergy immunol.* 1993;102:259-66
9. Kubelka V, Altman F, Staudacher E, Tretter V, Marz L, Hard K, et al. Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from Honey bee Venom phospholipase A2. *Eur Biochem.* 1993;213:1193-1204
10. Faye L, Chrispeed MJ. Common antigenic determinants in the glycoproteins of plants, molluscs and insects. *Glicocon J* 1988;5:245-256
11. Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akerdas JP, Milazzo J-P, Looutelier-bourhis C, Rayon C, et al. b(1,2)-xylose and a(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000;275:11451-8
12. Iacovacci P, Pini C, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Schinia E, et al. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant Shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. *Clin Exp Allergy* 2001;31:458-465
13. Alissi C, Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Tinghino R, Butteroni C, et al. Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of arizona Cypres (*Cupressus arizonica*) polen. *Allergy* 2001;56:978-984
14. Calabozo B, Barber D, Polo F. studies on the carbohydrate moiety of Pla l 1 allergen. Identification of a major N-glycan and significance for the immuglobulin IgE-binding activity. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1628
15. Westphal S, Kolarich D, Föetisch K, Lauer I, Altmann F, Conti A, et al. Molecular Characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (b-fructofuranoside), a glycosilated allergen of tomato. *Eur J Biochem.*2003;270:1327-1337
16. Schmid-Grendelmeier P, Holzman D, Himly M, Weichel M, Tresch Sandra, Ruckert B, et al. Native Art v1 and recombinant Art v1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1328-1336
17. Batanero E, Villalba M, Monsalve R and Rodriguez R. Cross-reactivity between the mayor allergen from olive pollen and unrelated glicoprotein: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:1264-71
18. Aalberse R.C, Akkerdaas, Van Ree R. Cross-reactivity of the antibodies to allergens. *Allergy.* 2001;56:478-490
19. Breiteneder H and Edner Christof. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:27-36
20. Reese G, Ayuso R, Lehrer S.B. Tropomiosin: An invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Clin Immunol.* 1999;119:247-258
21. Valenta E, Hayek B, Seiberler S, Bugajaska-Scherterer A, Neiderberger V, Twardosz A, et al. Calcium-binding allergens: from plant to man. *Int Arch Allergy Immunol* 1988;117:160-166
22. Petersen A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak K M, and Becker W-M, Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:805-15
23. Aalberse R.C and Van Ree R. Cross-reactive carbohydrate determinants. *Clin Rev Allergy Immunol.* 1997;15:375-387
24. Van Ree R. Carbohydrate and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129:189-197
25. Mari A. IgE to Cross-reactive carbohydrate determinants analysis of distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129:286-295

26. Van Ree R and Aalberse: Specific IgE without clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1000-1001
27. Batanero E, Crepo JF, Monsalve RI, Martin E, Villalva M, Rodriguez R. IgE binding And histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J Allergy Clin Immunol.*1999;120:30-42
28. Föetisch K, Altman F, Haustein D, Vieths S. Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy immunol.*1999;120:30-42
29. Iacovacci P, Afferni, C. Butteroni C, Pironi L, Pugggioni E.M, Orlandi A, et al. Comparison between the native Glycosylated and the recombinant Cup a 1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1620-1627
30. Föetisch K, Westpal S, Laurier I, Mechthild R, Altmann F, Kolarich D, et al. . Biological activity of the IgE specific for cross- reactive carbohydrate determinant. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:889-96
31. Bublin M, Radauer C, Wilson IB, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H. et al. Crooss-reactive N-glycan of Api g 5, a high molecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients *FASEB J.* 2003;17:1697-1699
32. Valenta R, Lidhol J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostic and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy.* 1999;29:896-904
33. Chapman M, Smith A, Vailes L, Arruda L, Dhanaraj V, Pomes A, Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:409-418
34. Schmidt M, Hoffman D. Expression systems for production of Recombinants Allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;28:264-270
35. Cregg JM. Expresion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in: Fernandez JM, Hoefler JP, eds. Gene expression system. 1st ed. San Diego California Academic Press 1999:158-191
36. Smith P, Suphioglu C, Griffith I. J, Theriault K, Knox R.B, Singh M. B. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98:331-343
37. Chua KY, Kchal PK, Thomas WR, Vaughan PR; Macreadie IG. High-frecuency binding of IgE to Der P1 allergen expressed in yeast. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89:95-102
38. Soldatova L, Crameri R, Gmachl M, Kemeny D, Shmidt WM, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:691-698
39. Schmidt M, McConnell T, Hoffman R. Production of a recombinant imported fire ant venom allergen, Sol i 2, in native and immunoreactive form. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:82-88
40. Krebitz M, Wiedermann U, Essl D, Steinkellner H, Wagner B, Turpen T, et al. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological *in vitro* and *in vivo* characterization. *FASEB J.* 2000;14:1279-1288
41. Altman F, Staudacher E, Wilson IBH, März L. Insect cells for the expression of recombinants glicoproteins. *Glycoconj J.* 1999;16:109-123
42. Müller UR, Dudler T, Schneider T, et al. Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A₂ from Honeybee Venom is similar. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:395-402
43. Müller U, Fricker M, Wymann D, Blaser K, Crameri R. Increased specificity of diagnostics test with the recombinant major bee venon allergen phospholipase A₂. *Clin Exp Allergy* 1997;27:915-20