



Tesis Doctoral. Bioquímica Renata Curciarello

# Análisis de la alergenicidad de componentes proteicos de soja que presentan reactividad cruzada con caseínas bovinas



Director: Dr. Guillermo H. Docena  
Co-director: Dra. Silvana Petruccelli

LISIN y CIDCA  
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de La Plata.  
Año 2010

*El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Guillermo H. Docena y la co-dirección de la Dra. Silvana Petruccelli en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) y el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.*

***La Plata, Junio de 2010.***

¶ mis amorcs, Manu y Matzo.

## Agradecimientos

***Este trabajo ha significado mucho para mí, no sólo en el aspecto profesional sino también por el crecimiento personal por el cual he transitado con el mismo. Por ello, no quiero dejar de agradecer a cada una de las personas que han sido parte de estos años, de este trabajo, de mi vida...***

Gracias a mis padres por enseñarme a ser como soy, dejarme ser libre, y acompañarme siempre! A mi hermana, por estar conmigo y enseñarme a compartir! A toda mi familia, por no perder las ganas de estar juntos, a pesar de la distancia.

Gracias a Juan Manuel (Manu, mi amorcís!) por elegir compartir la vida conmigo, por quererme, cuidarme, por tanto amor... y por nuestro hijo! Gracias a mi solcito, Mateo, también por hacerme tan feliz. A los dos... gracias por la paciencia que me tuvieron todo este tiempo!

A todos los que cuidaron a Mateo, sábados, domingos, feriados... mientras su mamá escribía. Gracias a los bisabuelos Vicente (“tente”) y Olga, a los abuelos paternos Juan y Mónica (“aelo Tan” y “aela Nini”), a mis viejos (“aelo Pepe y aela Tati”), y a las Tías Cata, Silvina y Mari.

A mis amigas, que tanto extraño porque la vida nos llevó por distintos caminos... los hijos, los amores a la distancia, nuestros laburos... pero que siempre están presentes, y cuando nos reencontramos el tiempo no nos alcanza! Gracias “Chichis” por la amistad: Fer, Lu, Mica, Marina, Jose, Flor, Cata, Ivana (la Negra), Elisa (la Flaca), Fernandita, María, Dani! Las quiero!

A Jose y Marina, por tantas horas de estudio compartidas, mates, risas. Días y días hasta que finalmente nos recibimos! A pesar de que han migrado a sus “pagos” siempre están conmigo... (por suerte suelen venir a La Plata y nos vemos de a ratitos!)

A mis “amigas del viaje” por la amistad... a las chicas del club, mi cable a tierra...

A Amandis, Nati, Pao y Coqui, mis compas del “ALERGO-Team”: Amanda, gracias por enseñarme a dar mis primeros pasos en el mundo del ELISA, allá lejos en el tiempo... cuando ni imaginaba este momento; por ayudarme siempre, hasta en la experiencia de la maternidad! Nati, gracias por las charlas, con mates o por teléfono larga distancia, y por acostumbrarnos a que “sin cosas ricas, no hay seminario”! Pao y Coqui, qué equipo! Gracias

por ayudarme hasta en el último detalle, sin ustedes el MM21 no hubiera existido! Espero poder ayudarlas tanto o más con sus tesis.

A mis queridos compañeros LISINOS: Martín, Fer, Paula, María, Alberto, Guille, Gri, Ceci, Eze, Dom, Bel, Facu, Vani, Maru, Yessi, Loli, Agus, Yani, Romi, Nico, Juancito, Hemán, David, Rodrigo, Amanda, Pao, Coqui, Nati, Romi A., Costi, Flor, Paula B., Vero, Paula R, Deliana, Agus Z... y... (uffff, no termino más! cuántos somos! Qué lindo! ) con quienes en el día a día hemos compartido nuestras alegrías y nuestras penas, nuestros logros y nuestras frustraciones... a todos, gracias por la ayuda y consejos, experimentales y no experimentales! Por todos los mates que cebaron mientras escribía! Por la paciencia de Nico y su ayuda informática, por la insistencia de Rodri para que el trabajo quede “prolijo”, por los gratos momentos compartidos, mates, almuerzos, after labs, asados, congresos, etc,etc, y etc! Especialmente gracias por soportarme estos últimos meses, por escucharme, ayudarme y alentarme para que no bajara los brazos!

A mis compañeros del CIDCA, especialmente a los chicos de Proteínas: Alejandrita, Paula, Ceci, Gaby, Jorge, Agustín, Francisco, Pablo, Nacho, Sara M, Adriana M, Adriana S, Silvana y Cristina y a los chicos del “box”: Brunis, Cami, Silvina, Coqui (de nuevo!) y Fabricio; con quienes no he compartido todos los días de estos años, pero no menos importantes! Gracias por compartir sus experiencias, ayudame con los clonados y expresión de proteínas, por los geles, las muestras liofilizadas, los mates y las risas.

Gracias a quienes fueron y son mis compañeros en la cátedra de Bioquímica Patológica, por dejarme compartir con ustedes la tarea docente (nada sencillo, por cierto!), por enseñarme a enseñar. A los “patológicos”: Nati, Ceci, Antonio, Nené, Ana, Gustavo, Ana Laura y Juan, gracias!

Al LIPROVE y sus “liproveanos” con quienes compartí la experiencia de trabajar en investigación cuando aún era estudiante, y con quienes elegí seguir este camino, Nora, David, gracias. Y gracias a todos los que hoy me reciben con un mate amable cada vez que este “sapito de otro pozo” les toca el timbre!

***Finalmente, mi más sincero agradecimiento a quienes me han acompañado y guiado en este camino, y de quienes he aprendido mucho...***

Guille, mi director, por haber confiado en mí y proponerme llevar adelante el proyecto que hoy se refleja en esta tesis. Por enseñarme y ayudarme, por su optimismo, su tranquilidad y por su paciencia (sobre todo en estos últimos días!!!).

Silvana, mi co-directora, por enseñarme y ayudarme con la “Biología Molecular”, y también con la redacción de este trabajo. Por su incansable dedicación, sus opiniones y consejos.

al director del LISIN, Dr. Prof. Alberto Fossati, quien fue mi profesor de inmuno en último año de la carrera, por recibirme cálidamente en el laboratorio y permitirme realizar este trabajo. Por sus enseñanzas, consejos, opiniones y anécdotas compartidas.

***No quiero dejar de agradecer a quienes han colaborado desde otras disciplinas u otros ámbitos para enriquecer este trabajo:***

Al Dr. Gustavo Parisi y Virginia González (Vicky), por la “bioinformática”. Vicky, gracias por las charlas, por explicarme todo para que “yo entendiara” y por escucharme! Ya vendrá tu tesis y mi ayuda!

Al Dr. Luis Bruno Blanch y a la Dra Ivana Barrios (Ivana), gracias por los “papelitos”!

***Finalmente, mi reconocimiento hacia...***

el CIDCA y sus autoridades, por brindarme el ámbito para realizar parte de este trabajo,

el CONICET y sus autoridades por otorgarme las becas para el desarrollo de esta tesis doctoral y para la futura formación posdoctoral,

y a la Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la formación de grado y de posgrado, con todas las virtudes y debilidades de una universidad pública y gratuita, de la que orgullosamente formo parte.

## **ABREVIATURAS**

- **Ac:** anticuerpo
- **AFC:** adyuvante de Freund Completo
- **AFI:** adyuvante de Freund Incompleto
- **Ag:** antígeno
- **ALV:** alergia a leche de vaca
- **BCA:** ácido bicinconínico
- **BSA:** Seroalbúmina bovina
- **DO:** densidad óptica
- **E.coli:** *Escherichia coli*
- **EAST:** Enzyme Attached Sorbent Test
- **ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- **FAL:** fosfatasa alcalina
- **FI:** fracción insoluble
- **FS:** fracción soluble
- **HRP:** Horse Radish Peroxidase
- **IPTG:** isopropil-b-D-thiogalactopiranoside
- **LB:** medio de cultivo Luria Bertani
- **mAb:** anticuerpo monoclonal
- **MBP:** Maltosa Binding Protein
- **OPD:** orto-fenilendiamina
- **PBS:** buffer fosfato de sodio
- **TBS:** Tris buffer sodio
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PLV :** proteínas de leche de vaca
- **PNPP:** p-nitrofenilfosfato de sodio
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **SDS–PAGE :** Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- **SE:** suero equino
- **SF:** solución fisiológica

## INDICE

Breve introducción y objetivos generales .....	- 1 -
Introducción .....	- 3 -
<b>1 ENFERMEDADES ALERGICAS. Generalidades.....</b>	<b>- 4 -</b>
1.1 Alergias Alimentarias.....	- 6 -
1.2. Sistema inmune de mucosas y tolerancia oral.....	- 11 -
<b>2. ALERGENOS ALIMENTARIOS.....</b>	<b>- 14 -</b>
2.1 Alergenos de leche de vaca. Generalidades .....	- 15 -
2.2 Alergia a las proteínas de leche de vaca.....	- 17 -
<b>3 ALERGENOS VEGETALES. Generalidades.....</b>	<b>- 21 -</b>
3.1 Alergenos alimentarios pertenecientes a la superfamilia de las cupinas .	- 22 -
3.2 Alergenos alimentarios pertenecientes a la superfamilia de las prolaminas..	- 25 -
3.3 Alergenos de soja .....	- 26 -
3.4 Alergia a las proteínas de soja.....	- 29 -
<b>4 REACTIVIDAD CRUZADA. Generalidades, estudios, implicancias.....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>5 DIAGNOSTICO DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>6 TRATAMIENTOS.....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>1 MATERIALES .....</b>	<b>- 41 -</b>
1.1 Semillas y harina de soja .....	- 41 -
1.2 Proteínas de Leche Bovina .....	- 41 -
1.3 Oligonucleótidos.....	- 41 -
1.4 Vectores empleados .....	- 42 -
1.5 Cepas bacterianas .....	- 42 -
1.6 Sueros específicos.....	- 42 -
1.7 Anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas .....	- 43 -
1.8 Sueros de pacientes.....	- 44 -
1.9 Péptidos sintéticos.....	- 44 -
1.10 Animales .....	- 45 -
<b>2 METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....</b>	<b>- 45 -</b>
2.1 Obtención de construcciones .....	- 45 -
2.2 Obtención de bacterias competentes .....	- 46 -
2.3 Transformación de las bacterias competentes .....	- 47 -
2.4 Amplificación y preparación de los plásmidos.....	- 48 -
2.5 Expresión de los plásmidos .....	- 48 -
2.6 Purificación de las proteínas recombinantes.....	- 49 -
<b>3 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS PROTEICOS .....</b>	<b>- 50 -</b>
3.1 Obtención de extractos proteicos de soja .....	- 50 -
3.2 Obtención de extractos proteicos a partir de leche de vaca.....	- 50 -
3.3 Cuantificación de proteínas.....	- 51 -
3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).....	- 51 -
<b>4 METODOS INMUNOQUIMICOS .....</b>	<b>- 51 -</b>
4.1 Inmunobloting y dot-blot.....	- 51 -
4.2 Inmunoensayos ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) .....	- 53 -
<b>5 METODOS COMPUTACIONALES Y ENSAYOS APLICADOS AL MAPEO DE EPITOPES .....</b>	<b>- 55 -</b>
5.1 Análisis bioinformático para la predicción de epitopes de reactividad cruzada	- 55 -
.....	- 55 -



5.2 Obtención y caracterización de péptidos recombinantes.....	- 55 -
5.3 Ensayos con péptidos sintéticos.....	- 56 -
5.4 Ensayo de scanning de alanina .....	- 56 -
<b>6 ENSAYOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> EMPLEANDO UN MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA, PARA LA CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA REACTIVIDAD CRUZADA</b> -	<b>57</b>
6.1 Plan de sensibilización .....	- 57 -
6.2 Evaluación de la aparición de signos clínicos post-desafío oral .....	- 57 -
6.3 Pruebas <i>in vivo</i> .....	- 58 -
6.4 Ensayos <i>in vitro</i> .....	- 59 -
<b>Capítulo 1</b> .....	
Evaluación de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja .	83
1.1 INTRODUCCION .....	- 64 -
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	- 66 -
1.3 RESULTADOS .....	- 67 -
1.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	- 73 -
<b>Capítulo 2</b> .....	
Identificación de la subunidad $\alpha$ de $\beta$ -Conglicina como un nuevo componente de reactividad cruzada con alérgenos de la leche de vaca.....	76
2.1 INTRODUCCION .....	- 77 -
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	- 79 -
2.3 RESULTADOS .....	- 80 -
2.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	- 87 -
<b>Capítulo 3</b> .....	
Mapeo de epítopes responsables de la reactividad cruzada entre caseínas bovinas y proteínas de soja.....	89
3.1 INTRODUCCION .....	- 90 -
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	- 92 -
3.3 RESULTADOS .....	- 93 -
3.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	- 106 -
<b>Capítulo 4</b> .....	
Estudio <i>in vivo</i> de la reactividad cruzada entre alérgenos de leche de vaca y soja .....	- 111 -
4.1 INTRODUCCION .....	- 112 -
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	- 114 -
4.3 RESULTADOS .....	- 115 -
4.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	- 122 -
<b>Discusión y Conclusiones Finales</b> .....	- 125 -
<b>Bibliografía</b> .....	- 133 -

## **Breve introducción y objetivos generales**

La alergia a la leche de vaca es la causa más común de alergia alimentaria en lactantes y niños, probablemente porque la LV constituye uno de los primeros antígenos alimentarios a los que resultan expuestos los niños en la primera infancia. Si bien generalmente esta situación patológica resulta transitoria, ya que la mayoría de los niños afectados desarrollan tolerancia con el tiempo, los pacientes son sometidos a tratamientos con dietas libres de LV y sus derivados. En pacientes con edades menores a los dos años se emplean sustitutos lácteos, siendo los más empleados los hidrolizados extensivos de proteínas de leche. También suelen incluirse fórmulas alternativas como las formuladas a base de proteínas de soja o sus derivados. Sin embargo, se ha reportado que un cierto porcentaje de pacientes con alergia a leche de vaca muestran una intolerancia clínica a las mismas. Descartando la existencia de proteínas de leche como contaminantes o adulterantes, y considerando que los niños afectados probablemente no han estado en contacto con antígenos de soja, dado que no es un alimento común en la dieta de un lactante, la intolerancia clínica podría explicarse por la presencia de epitopes de **reactividad cruzada** entre proteínas de leche bovina y de soja. Sobre la base de estas observaciones, en el presente trabajo de tesis se planteó dilucidar las bases moleculares de este fenómeno y desarrollar herramientas y conocimientos que permitan en un futuro desarrollar terapias alternativas.

### **Los objetivos generales planteados fueron los siguientes:**

- Caracterizar la inmunorreactividad *in vitro* e *in vivo* de proteínas de soja empleando distintas herramientas inmunológicas.
- Identificar la presencia de epitopes inmunorreactivos presentes en proteínas de soja que compartan homología secuencial o estructural con caseínas bovinas.
- Validar un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche bovina para ser empleado como herramienta biológica para el estudio de la reactividad cruzada entre soja y proteínas de leche de vaca, para analizar la alergenidad de nuevas fórmulas hipoalergénicas y para el desarrollo de nuevas vacunas mucosales a ser empleadas en el tratamiento de la alergia alimentaria.

***Algunos de los resultados que a continuación se presentan han sido publicados o se encuentran en etapa de evaluación para su publicación, como:***

***“Immunochemical characterization of Glycine max. L merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk allergic patients.”*** Renata Curdiarello, Fabricio J. Lareu, Carlos A. Fossati, Guillermo H. Docena, Silvana Petrucelli. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 38:1559-1565.ISSN:0954-7894.

***“Cross reactivity between cow's milk caseins and Gly m 5: identification of a fragment containing the responsible epitopes.”*** Curdiarello R, González V, Barrios I, Bruno Blanch L, Parisi G, Fossati CA, Petrucelli S and Docena G.**2010.**

# Introducción

---



## 1 ENFERMEDADES ALERGICAS. Generalidades

El **sistema inmune** es el responsable de detectar y ejercer protección frente a diferentes microorganismos, de modo tal de permitir la subsistencia en condiciones que de otra manera resultarían desfavorables para la vida del organismo. La primer “línea de defensa” que nos protege está constituida por elementos de la **inmunidad innata**, mientras que el rol crítico en la defensa del huésped frente a infecciones posteriores y el mantenimiento del estado de homeostasis es ejercido por la **inmunidad adaptativa**. Ambas ramas efectoras del sistema inmune son el resultado de un complejo y prolongado proceso de co-evolución que se ha producido en los microorganismos y organismos superiores durante cientos de miles o millones de años. Su versión más compleja podemos observarla actualmente en los mamíferos.

En este contexto las **enfermedades alérgicas** son la manifestación clínica producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Este tipo de respuestas inapropiadas, se denominan **reacciones de hipersensibilidad** y desde que fueron clasificadas por Gell y Coombs en la década del 60 (Gell PGH, Coombs RRA, 1963) se mantienen los cuatro tipos de reacciones descriptos clínicamente: tipo I, II, III y IV. Originalmente fueron descriptos cinco tipos de reacciones de hipersensibilidad, aunque el tipo V luego fue induído en el tipo II. Actualmente se conocen detalladamente los mecanismos moleculares y celulares que las originan y podemos decir que las reacciones tipo I, II y III están mediadas por anticuerpos, mientras que la tipo IV está mediada por células. Sin embargo en todas ellas el mecanismo efector responsable en última instancia de la alteración tisular es la inflamación, proceso en el que pueden estar involucradas distintos tipos de células. Una reacción alérgica puede estar mediada por cualquiera de los cuatro mecanismos, e inclusive es común observar varios de ellos en forma simultánea. En particular nos interesa profundizar el análisis de las reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediatas. Estas se caracterizan por la producción exacerbada de **inmunoglobulinas IgE**, proceso mediado por los **linfocitos T (LT) helper CD4<sup>+</sup> de fenotipo Th2 (LT Th2)** y los **linfocitos B (LB)**. Las citoquinas producidas como consecuencia de la activación de los LT Th2 reclutan **mastocitos, eosinófilos y basófilos**, los cuales unen la IgE, sintetizada y secretada por las células plasmáticas, a través de sus receptores de membrana de alta afinidad y de baja afinidad. Estas células “sensibilizadas” con los anticuerpos IgE, al contactar el alérgeno en exposiciones posteriores se activan y liberan al medio extracelular el contenido de sus

gránulos citoplasmáticos que inician un proceso inflamatorio intenso e inmediato. Paralelamente se induce la síntesis de una serie de mediadores pro-inflamatorios cuya función será sostener el proceso inflamatorio en el tiempo. Cuando estos eventos se producen reiteradamente, el proceso inflamatorio puede llegar a alterar la histología y la fisiología del tejido y del órgano, principalmente si intervienen células como eosinófilos o neutrófilos. En este caso estamos ante una **reacción alérgica**.

A su vez, en las reacciones alérgicas suelen observarse mecanismos tipo III y IV, aunque éstos son más frecuentes en enfermedades autoinmunes, procesos infecciosos crónicos, rechazo de injertos, etc. Sin embargo en reacciones alérgicas crónicas, distintas células son las principales responsables de los mecanismos de daño en el tejido.

Se denomina **atopía** a la tendencia personal o familiar a sintetizar anticuerpos IgE en cantidades anormalmente elevadas y a desarrollar signos clínicos tales como asma, rinoconjuntivitis, eczema/dermatitis en respuesta a la exposición a alérgenos (Johansson et al. 2001). Por lo tanto, una hipersensibilidad inmediata o IgE-mediada puede generar un conjunto heterogéneo de síndromes: rinitis alérgica, asma, alergias alimentarias, dermatitis atópicas, eczema y, en los casos más severos, anafilaxia. En conjunto estas enfermedades constituyen las inmunopatologías que con mayor incidencia y prevalencia se presentan en el mundo, principalmente en países desarrollados o poblaciones con hábitos de vida occidental. Se puede observar en la bibliografía internacional estudios en los que se encuentran valores de prevalencia de un 20-30 % de la población general (Taussig et al. 2003).

Si bien aquí no vamos a ahondar en detalles con respecto a la fisiopatogenia de las enfermedades alérgicas, cabe mencionar que se trata de patologías muy complejas, con una heterogénea y variable presentación clínica. Se ha descrito una **base poligénica de predisposición** (la gran mayoría de los genes polimórficos detectados están relacionados con la activación de los LT) junto a una serie de **factores ambientales disparadores** (cuya acción puede explicarse parcialmente a través de la “Hipótesis de la higiene”). La interacción entre estos distintos factores determina que actualmente en un importante porcentaje de la población, la exposición a alérgenos inocuos determina que se produzca una exacerbada activación de mecanismos inmunes Th2-dependientes, probablemente debido a fallas en la activación o regulación de los mismos (Bousquet and P Burney 1993; Cochrane et al. 2009; Perrigoue et al. 2009).

## 1.1 Alergias Alimentarias

Las reacciones adversas producidas por la ingesta de alimentos datan de miles de años, como aquella descrita por Hipócrates en el siglo I causada por la leche, o las primeras reacciones anafilácticas producidas por huevo y pescado en los siglos XVI y XVII (H A Sampson 1999). Se pueden identificar numerosas causas para reacciones de este tipo y clasificarlas de distinta manera. En el año 2001 han sido definidas las alergias alimentarias como aquellas reacciones adversas a alimentos no tóxicas, en la que el sistema inmune tiene un rol central en su fisiopatogenia (C Bruijnzeel-Koomen et al. 1995; Johansson et al. 2001). La instauración de una alergia alimentaria por lo tanto requiere de un individuo susceptible, el contacto repetitivo con el alérgeno alimentario y, en general, es independiente de la dosis ingerida. Por el contrario, todo otro tipo de reacción adversa originada por alimentos depende de propiedades inherentes al alimento (componentes tóxicos, naturales o contaminantes) o de características del individuo (desórdenes metabólicos o fisiológicos) que no involucren al sistema inmune, y se denominan **intolerancias alimentarias** (Cianferoni and Spergel 2009).

La prevalencia de las alergias alimentarias se ha incrementado en los últimos 10-15 años, principalmente en países desarrollados (Branum and Lukacs 2009; Stefan Vieths et al. 2008). Inclusive se ha observado que hay marcadas variaciones geográficas, principalmente relacionadas a los hábitos alimentarios de cada región (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a). Por ejemplo en Estados Unidos, además de leche bovina (**LV**) y huevo de gallina, que son las principales alergias alimentarias a nivel mundial, es muy importante la alergia al maní, y luego a soja, trigo, nueces, pescados y moluscos. En Europa son importantes las alergias alimentarias a manzana, sésamo, mostaza, lupines, cítricos, chocolates, avellanas, frutillas, kiwi, tomate, entre otros (R Asero et al. 2009; Cochrane et al. 2009; Roux, Teuber, and Sathe 2003; Wangorsch et al. 2007; Oberhuber et al. 2008; Cianferoni and Spergel 2009). Más allá de ser importante la constitución genética del individuo y los hábitos dietarios, es relevante tener en cuenta que cualquier antígeno puede ser potencialmente alergénico, mientras presente propiedades inmunogénicas y antigénicas. Más de 150 alimentos han sido descritos como alergénicos, sin embargo sólo 8 de ellos han sido descritos como los responsables de originar el 70-90 % de las alergias alimentarias y por lo tanto deben ser indicados en la composición de un alimento. Estos son leche (y sus derivados), huevo (y productos a base de huevos), pescados (y productos a base de pescados), crustáceos (langosta, camarón, cangrejo), cereales que contienen gluten (trigo, cebada, centeno, avena)

soja (y productos a base de soja), maní (y productos a base de maní) y frutas secas (nueces, avellanas, castañas y almendras) (Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005). Luego, la Unión Europea a este listado le agregó otros alérgenos que deben ser incluidos en el etiquetado de un alimento (apio, mostaza, sésamo, lupino, moluscos), y aditivos como anhídrido sulfuroso y sulfito.

Los datos de prevalencia para la alergia alimentaria también están relacionados con la edad de la población: las alergias alimentarias afectan entre 6% y 8% de la población pediátrica, siendo la causa más común de anafilaxia, y entre un 1-4% de los adultos (Osterballe et al. 2005; Osterballe et al. 2009). Por lo tanto las alergias alimentarias se presentan principalmente en la población pediátrica. Para ciertos alérgenos, ésta puede ser persistente (se manifiesta desde la niñez y no se autolimita) o manifestarse en la edad adulta. Para la mayoría de los alérgenos la alergia alimentaria se resuelve antes de los 5 años de edad (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009b), aunque el proceso de atopía puede manifestarse en otras mucosas con otros signos clínicos. Este proceso de aparición secuencial de signos clínicos con la edad se denomina “marcha atópica” (U M Saarinen and Kajosaari 1995)

De acuerdo al mecanismo fisiopatogénico involucrado, las alergias alimentarias pueden ser clasificadas como:

a) **Dependientes de IgE:** son aquellas mediadas por anticuerpos IgE, los signos clínicos aparecen rápidamente (en minutos) luego de la exposición al alérgeno. Son las mejor caracterizadas desde el punto de vista de los mecanismos moleculares y celulares involucrados y constituyen más del 60 % de las alergias alimentarias. Los signos clínicos más frecuentes con que se presentan son: diarrea, urticaria, eczema, asma, rinitis, distensión abdominal, el síndrome de alergia oral con manifestaciones peri-orales, esofagitis, anafilaxia, etc.

b) **Mediadas por células:** pueden estar involucrados los eosinófilos, neutrófilos o macrófagos. En general la presentación clínica es tardía (horas o días) luego de la exposición a los alérgenos y suelen manifestarse como enterocolitis, dermatitis de contacto, proctocolitis, etc.

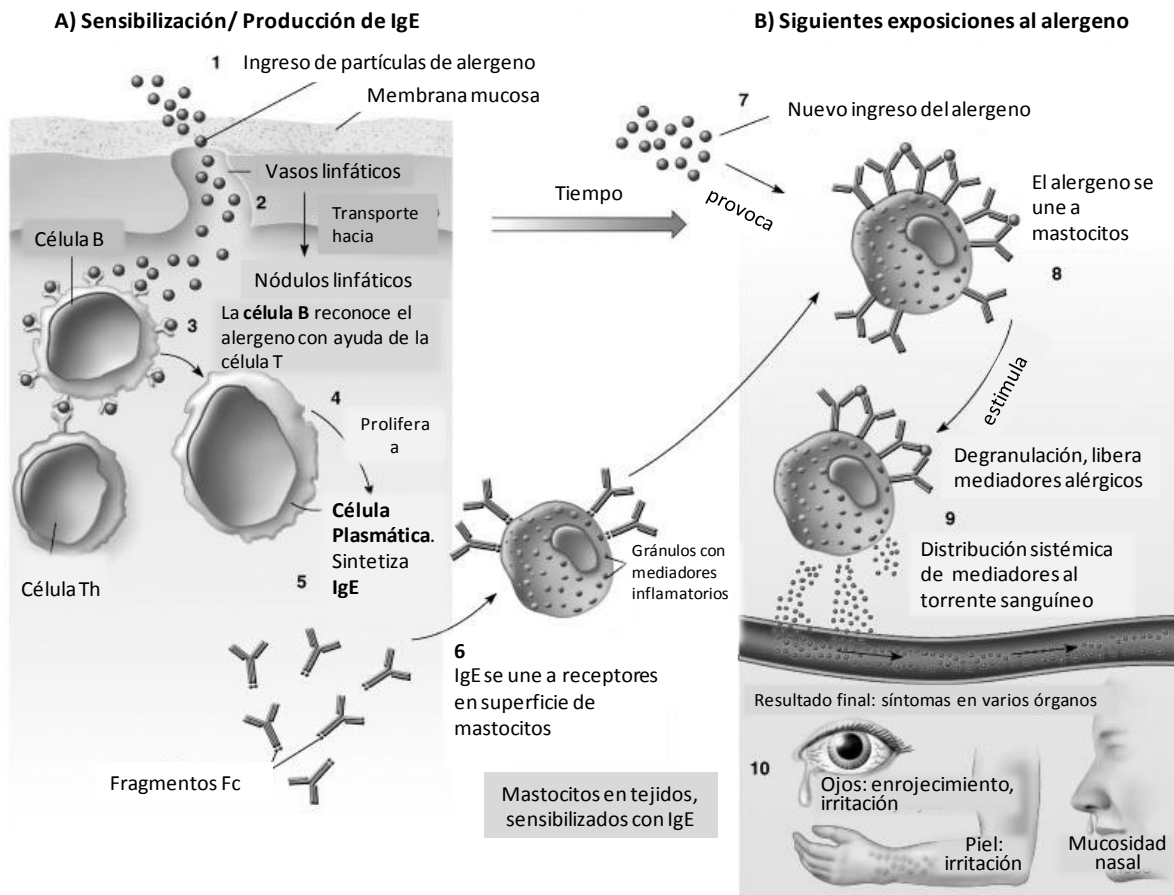
c) **Mixtas o mediadas por IgE y células:** son muy comunes, se detectan anticuerpos IgE específicos del alérgeno, pero además participan células en la instauración del proceso inflamatorio y daño tisular. Suelen presentarse como dermatitis atópica, esofagitis, gastroenteritis o enteritis eosinofílicas.



Como puede observarse, las enfermedades alérgicas engloban un conjunto muy variado de síndromes que suelen presentar se en forma muy heterogénea en la población. Hemos mencionado que resultan de la interacción de factores genéticos y ambientales por lo cual se trata de enfermedades multifactoriales. Entre los factores genéticos predisponentes se han detectado alelos polimórficos para genes que codifican distintos factores relacionados con la activación y regulación de los LT (clúster de citoquinas Th2, CTLA-4, ICOS, CD28, STAT6, GATA-3, etc) y es común observar mayor frecuencia en niños que poseen hermanos alérgicos, en comparación con la población general. En cuanto a los factores ambientales, se ha postulado que la menor exposición a bacterias intracelulares (“hipótesis de la higiene” planteada desde 1999 y actualmente en revisión), cambios en los hábitos dietarios [mayor consumo de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 6$  y menor consumo de  $\omega 3$ , reducción de antioxidantes dietarios y exceso o deficiencia de vitamina D (Lack 2008)], cambios a nivel climático (aumento de periodos de polinización, del contenido de alergeno en los granos de polen y de la cantidad de polen en el aire por aumentos en los niveles de humedad, la mayor exposición al ozono que exacerba la respuesta a los alergenos) o la mayor exposición a alergenos por hábitos de vida intra-domiciliarios, pueden incidir en la instauración de una enfermedad alérgica. En las últimas décadas no sólo la incidencia de la atopía o las enfermedades alérgicas en general se ha incrementado (Upton et al. 2000; William W Busse 2010), sino también la de las alergias alimentarias (Branum and Lukacs 2009). Dado que este incremento no pudo haber sido causado por alteraciones en la base genética, los cambios en los hábitos de vida, factores climáticos, etc, son los responsables de este fenómeno. Estos cambios además han impactado en la forma de presentación clínica de las alergias, considerando los alergenos que las desencadenan y la gravedad de los síntomas con que se manifiestan. Es común por ejemplo observar reacciones de anafilaxia frente a ciertos alergenos que en otros tiempos producían reacciones más leves (Añíbarro, Seoane, and Múgica 2007; Calder et al. 2006; Cochrane et al. 2009). Tampoco se puede dejar de considerar que influyen los métodos de preparación de los alimentos, la pureza de los mismos, la edad de incorporación de ciertos alimentos con la dieta, el incremento en el empleo de antiácidos y la exposición a cremas o medicamentos que contienen alergenos alimentarios en su composición (Lack 2008).

En cuanto a los mecanismos que desencadenan las reacciones alérgicas, se ha dilucidado que deben producirse dos etapas: una primera etapa de **sensibilización**, que consiste en la generación de anticuerpos IgE específicos del alergeno dietario, y luego una etapa **efectora** en la cual el contacto del alergeno con la IgE en la superficie de mastocitos,

basófilos y eosinófilos desencadena la degranulación de los mismos, con la consiguiente instauración de un proceso inflamatorio. En la **figura1** se esquematizan ambas etapas.



**Figura 1. A) Fase de sensibilización y producción de IgE:** el alérgeno ingresa a través de las mucosas (1) y es transportado por los vasos linfáticos a los nódulos linfáticos (2) donde ocurre en reconocimiento por parte de los linfocitos B con ayuda de los linfocitos Thelper (3), luego las células B proliferan a células plasmáticas (4) capaces de sintetizar IgE específica (5), la cual se une a receptores específicos FcεRI en mastocitos y basófilos (6). **B) Fase efectora al contactar nuevamente el alérgeno,** este se une a IgE en la superficie de células sensibilizadas (8) y estimula la degranulación y liberación de mediadores de inflamación al torrente sanguíneo con la consecuente aparición de signos clínicos en diversos órganos (10). *Figura adaptada de Copyright© The Mc-Graw Hill Companies, Inc.*

La mayoría de las reacciones alérgicas agudas se presentan cuando los alérgenos se unen a los anticuerpos específicos IgE previamente unidos a sus receptores de alta afinidad, denominados FcεRI (Barrett K.E 1997), en mastocitos y basófilos. También se expresan receptores de IgE de baja afinidad, o FcεRII o CD23, en macrófagos, monocitos, linfocitos y plaquetas aunque en estos casos la función de los mismos es diferente y no está relacionada con los procesos pro-inflamatorios. Además, recientemente se han identificado receptores FcεRI de alta afinidad en la superficie de enterocitos, lo cual favorecería la presentación de antígenos dietarios y la mediación de enfermedades inflamatorias en el epitelio intestinal (Untersmayr et al. 2010) Cuando un antígeno específico se une a la IgE unida al receptor

FcεRI en mastocitos y basófilos, y determina el entrecruzamiento de los mismos, se induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios en forma rápida como *histamina*, *proteoglicanos*, *enzimas* y *citoquinas*. Además se induce la síntesis de un conjunto de sustancias vaso activas (mediadores lipídicos, citoquinas, kimoquinas, factores de crecimiento) que van a prolongar el efecto pro-inflamatorio, y causar distintos síntomas (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a; Cianferoni and Spergel 2009) (**figura 1**).

La alergia alimentaria se manifiesta preferentemente en la niñez, dado que existe un período de inmadurez inmunológica principalmente debida a una inmadurez histológica de la mucosa gastrointestinal, el establecimiento de la flora comensal intestinal y la incipiente interacción entre ésta y los elementos del sistema inmune que comienzan a poblar la mucosa (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2006). Afecta entre 6-8% de los niños de un año de edad, descendiendo con el tiempo hasta valores de 1-2% en los niños entre 3 y 5 años de edad, dependiendo del individuo y del alimento causante (Cantani and Micera 2004; Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009b). Para el caso particular de alergia a leche de vaca (**ALV**) los datos de prevalencia oscilan entre un 2-5 % de la población pediátrica (Rona et al. 2007; Branum and Lukacs 2009). La mayoría de los niños con ALV no mediada por IgE pierden tal sensibilidad al tercer año de vida, pero entre 10% y 25% de los niños con ALV dependiente de IgE mantienen la reactividad en años subsiguientes, además el 50% de ellos desarrollan sensibilidad hacia otros alimentos (Ame Høst et al. 2002; Kristiina M Saarinen et al. 2005). De manera similar ocurre con los niños alérgicos a huevo de gallina, con la excepción de aquellos con niveles de IgE específica elevados, que no logran desarrollar tolerancia específica. Las alergias a maní y las frutas secas tienen un desarrollo más prolongado, suelen ser persistentes y observarse en adultos (Wood 2003). Las chances de perder sensibilidad a maní y a alergenos de sésamo es de sólo el 20%, y aproximadamente el 10% para frutas secas (Palmer and Wesley Burks 2006; Roux, Teuber, and Sathe 2003).

Sin embargo, mas allá de la instauración de los procesos de tolerancia oral que permiten restituir los mecanismos inmunorregulatorios con la edad, aún en individuos alérgicos o atópicos, en la mucosa gastrointestinal puede recuperarse la capacidad de inhibir las reacciones de hipersensibilidad, pero en las otras mucosas la situación no es la misma y es probable que los alergenos continúen generando reacciones inflamatorias. Tal es así que la sensibilización a LV o huevo en la primera infancia está asociada con mayor riesgo de sensibilización a alergenos ambientales y el desarrollo de asma (Cianferoni and Spergel 2009). Este proceso de aparición de los distintos signos clínicos alérgicos a lo largo del

tiempo es lo que hemos denominado anteriormente como **marcha atópica**. Es decir, una temprana sensibilización del individuo a través del tracto gastrointestinal permite poner en evidencia la condición de alérgico, que se manifestará de distinta manera a lo largo de su vida de no mediar un correcto manejo terapéutico. Por lo tanto, una sintomatología gastrointestinal inicial, que suele presentarse simultáneamente con manifestaciones dermatológicas, va a continuarse con el tiempo en una sensibilización por alérgenos inhalatorios y las consiguientes manifestaciones clínicas del tipo rinitis, asma, etc.

## **1.2. Sistema inmune de mucosas y tolerancia oral**

Las mucosas son la principal vía de entrada de la mayoría de los antígenos que el sistema inmune debe enfrentar. La principal razón que permite explicar este fenómeno es que en estos sitios anatómicos se produce un intenso intercambio de nutrientes o gases. Para maximizar la eficiencia de estos procesos las mucosas tienen un área efectiva que supera holgadamente la superficie corporal. Si consideramos en un adulto que la superficie cubierta por la piel es de aproximadamente  $2 \text{ m}^2$ , la superficie de las mucosas es alrededor de 200 veces mayor. Entre éstas, las mucosas del árbol respiratorio y la del tracto gastrointestinal son las de mayor área efectiva. Además, el intestino humano tiene una longitud de 2-3 metros y la absorción de nutrientes se da principalmente en el primer tramo.

Por otro lado, y aprovechando esta importante propiedad absorbente, la mucosa intestinal representa una puerta de entrada al organismo para numerosos microorganismos patogénicos. Sin embargo en el lumen del intestino grueso existe una importante flora comensal, muy rica tanto en variedad como en cantidad de microorganismos procarióticos, cuya función primordial es degradar componentes de los alimentos que permanecen intactos luego del procesamiento en el intestino delgado, y de esta manera facilitar su absorción. Sorpresivamente estos microorganismos no ingresan a través de la mucosa y permanecen en el lumen, donde encuentran todos los elementos necesarios para su multiplicación. Consecuentemente, la mucosa constituye la barrera que separa el medio interno del organismo con el medio externo donde se encuentran numerosos microorganismos, antígenos del medio ambiente y antígenos de la dieta. Dado que todos estos componentes son antigénicos para el sistema inmune del organismo, es necesario que en las mucosas exista un sistema inmune asociado que controle la composición antigénica del contenido del lumen por un lado, y el pasaje de antígenos a través de la barrera epitelial

por otro. Por lo tanto, debido a tan importante desafío antigénico al que se encuentran sometidas permanentemente las mucosas, es que existe una gran variedad y cantidad de células del sistema inmune, muchas de las cuales presentan características fenotípicas y funcionales que las hace únicas en el organismo. Es importante resaltar que en el intestino se encuentra el 70-80% de los LB y LT del organismo.

En este escenario tan particular, el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal es el encargado de discernir entre inducir mecanismos de tolerancia (frente a antígenos de la dieta que son necesarios absorber, o de la flora comensal que son necesarios preservar en el medio externo) o de activación inmunológica (frente a antígenos o microorganismos patogénicos). La compleja interacción molecular y celular que se establece en las mucosas permite mantener un estado de homeostasis en el cual el sistema inmune es capaz de discernir y “clasificar” a los distintos antígenos y decidir qué tipo de mecanismo efector activar cuando sea necesario. En este proceso es fundamental la participación de las células epiteliales y los distintos elementos de la inmunidad innata, para luego posibilitar la inducción de la inmunidad adaptativa con la participación de los diferentes sitios inductivos de las mucosas, junto a los ganglios regionales (Mowat 2003). Por lo tanto las células del sistema inmune que se encuentran en el epitelio de las mucosas están ubicadas en el sitio donde se produce la exposición temprana a los distintos antígenos. Recientes evidencias experimentales han demostrado que las células epiteliales interactúan con otras células de la inmunidad innata y adaptativa constituyendo un elemento esencial en el inicio de la respuesta inmune (Hongxing Li et al. 2007; Sokol et al. 2008).

Se denomina **tolerancia oral** al conjunto de mecanismos que median la inducción de tolerancia o falta de respuesta frente a antígenos que ingresan por la vía oral, que si ingresaran por otra vía inducirían mecanismos de activación efectores. Por lo tanto en un individuo normal la tolerancia oral es la que posibilita no inducir mecanismos inmunes efectores frente a antígenos de la dieta y de la flora comensal. En individuos alérgicos, y por razones aún no completamente comprendidas, el balance tolerancia vs activación no funciona adecuadamente y existen evidencias experimentales que apoyan tanto la hipótesis de una tolerancia deficiente como de una activación aberrante frente a antígenos de la dieta o alérgenos alimentarios. Lo que si está claro es que los linfocitos Th2 específicos de los alérgenos son centrales en la inmunopatología (Kirsten Beyer et al. 2002). Por lo tanto, en un individuo con alergia alimentaria se producen fallas en el reconocimiento inmune de los alérgenos y en lugar de inducirse mecanismos de tolerancia, se activan mecanismos Th2-

dependientes, responsables de la síntesis exacerbada de anticuerpos IgE específicos. En conclusión, los mecanismos de tolerancia oral son los responsables de la no inducción de los mecanismos de hipersensibilidad frente a antígenos dietarios en individuos no alérgicos.

Con respecto a la inmunidad innata, los alérgenos no son reconocidos por sus células dado que no son componentes procarióticos (no contienen ligandos de receptores de la inmunidad innata), sino que son antígenos inocuos. Por lo tanto, la no activación de la inmunidad innata determina que la respuesta inmune esperable sea la inducción de tolerancia. Sin embargo, se ha encontrado que en algunas reacciones alérgicas, principalmente las dermatitis atópicas, se produce una exacerbada secreción de una kimoquina llamada TSLP por parte de células epiteliales mucosales, lo cual indicaría que la inmunidad innata está involucrada en la respuesta frente a alérgenos. Se ha demostrado que TSLP, citoquina que pertenece a la familia de las citoquinas hematopoyéticas, está involucrada en la cascada de eventos celulares y moleculares que originan una inflamación alérgica (Soumelis et al. 2002; Julie Wang and Hugh A Sampson 2007). Aunque se ha demostrado que la sobre-expresión de TSLP *in vivo* juega un papel importante tanto en el inicio como en el mantenimiento del proceso inflamatorio en dermatitis atópica y asma en humanos y ratones (Taneda et al. 2001; Mark J Osborn et al. 2004; Soumelis et al. 2002; Sun Ying et al. 2005) no existen actualmente evidencias experimentales que indiquen su participación en la inflamación gastrointestinal en humanos (aunque esto puede estar relacionado a problemas experimentales). Los enterocitos expresan TSLP, se sabe que es importante en la defensa frente a helmintos, sin embargo no se ha establecido su importancia en procesos inflamatorios no relacionados con procesos infecciosos (Rimoldi et al. 2005; Betsy C Taylor et al. 2009). Estudios recientes en pacientes asmáticos indican que existe un polimorfismo en el gen de TSLP que podría estar relacionado con mayor o menor susceptibilidad de ciertos individuos al asma atópico y a la instauración de mecanismos IgE-dependientes (Hunninghake et al. 2008; He et al. 2008; C J Corrigan et al. 2009).

Por lo tanto una susceptibilidad genética relacionada con un funcionamiento anómalo de la inmunidad innata o adaptativa puede ser la causa de un mal funcionamiento del sistema inmune de mucosas. La pérdida de la homeostasis frente a antígenos inocuos de la dieta y la generación de LT específicos de los mismos pueden ser los responsables de la inducción de un proceso inflamatorio local, que puede afectar otras mucosas a través del tráfico de células entre las mismas. El mejor conocimiento de estos aspectos moleculares y celulares de los complejos mecanismos que operan en las mucosas puede resultar atractivo

para identificar nuevos blancos terapéuticos a los cuales dirigir novedosas estrategias de inmuno-intervención.

## 2. ALERGENOS ALIMENTARIOS

A pesar de que no se han descrito propiedades intrínsecas en una macromolécula que le confieran características de alérgeno, *a priori* se podría afirmar que cualquier sustancia inmunogénica puede comportarse como un alérgeno en un individuo susceptible. Sin embargo, sólo un número limitado de proteínas alimentarias han sido identificadas como alérgenos alimentarios, dentro del amplísimo espectro de antígenos alimentarios a los que estamos expuestos. Se sabe que a lo largo de la vida ingerimos toneladas de antígenos dietarios, no obstante la respuesta fisiológica más comúnmente observada es la tolerancia, para favorecer su absorción. Pero una pequeña proporción de la población, los individuos alérgicos, responde de una manera anómala y en ellos se han identificado unos pocos alimentos como los responsables de inducir la mayoría de las alergias alimentarias: huevo, leche de vaca, maní, frutas secas, pescados, mariscos, soja y trigo. Los alérgenos presentes en estos alimentos pertenecen a relativamente pocas familias de proteínas, y tienen ciertas características en común que podrían asociarse a una mayor alergenidad: son inmunogénicas, hidrosolubles, relativamente resistentes a la degradación fisiológica (tracto gastrointestinal), o inclusive al procesamiento industrial, son estables al calor, a la acción de ácidos y proteasas, etc. Además, pueden haber factores adicionales que les confieren propiedades alérgicas como la presencia de componentes inmunomodulatorios en el alimento que contribuyan al proceso de sensibilización, tal como se ha observado para el alérgeno mayoritario de maní Ara h 1 que actúa como adyuvante de la respuesta Th2. También se estudió el grado de homología e identidad secuencial entre alérgenos alimentarios de origen animal y sus homólogas humanas. Un grado de homología mayor al 62% excluye la posibilidad de resultar alérgica (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a). Además, es muy importante en la instauración de una reacción alérgica, la exposición a edades tempranas, por lo cual la dieta y la edad constituyen los principales factores predisponentes de la alergia alimentaria. Esta es la razón por la cual las alergias alimentarias se presentan principalmente desde el nacimiento y durante la primera infancia.

Por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos e inmunorregulatorios de la alergia alimentaria requiere profundizar los conocimientos de las

características moleculares de los alérgenos alimentarios, y su interacción con los distintos elementos del sistema inmune.

## 2.1 Alérgenos de leche de vaca. Generalidades

Dado que la leche de vaca es el principal alimento al cual estamos expuestos, sus proteínas constituyen el principal alérgeno alimentario en el mundo (Rona et al. 2007). Además en los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia de la alergia a leche de vaca, por lo cual se ha transformado en un problema sanitario de consideración (Branum and Lukacs 2009).

La LV contiene aproximadamente 30 a 35 g de proteínas/L y pueden ser clasificadas en dos grupos según su solubilidad como se indica en la **tabla 1**: las **caseínas**, que constituyen cerca del 80% de las PLV y las proteínas hidrosolubles del **suero**, el 20% restante.

**Tabla 1.** Proteínas de la leche de vaca.

Proteínas de la LV		Peso Molecular (kDa)	Proporción (%) en la LV
Caseínas	<b>80%</b>		
	$\alpha$ 1-caseína	23,6-25,2	34
	$\alpha$ 2-caseína	23,6-25,2	8
	$\beta$ -caseína	24	25
	K-caseína	19	9
Suero	<b>20%</b>		
	$\alpha$ -lactalbúmina	14,1	4
	$\beta$ -lactoalbúmina	18	9
	Albúmina Sérica Bovina	69	1

La fracción de **caseínas** está constituida por cuatro tipos de proteínas fosforiladas,  **$\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - y  $\kappa$ -**, que forman agregados o miscelas en suspensión y le dan el aspecto turbio a la leche. Poseen características comunes no presentes en otras proteínas de la leche, y en cuanto a su estabilidad no son afectadas de manera importante por el calor, aunque son susceptibles a la acción de las enzimas digestivas y el pH ácido del estómago (J M Wal 2001; L Vila et al. 2001a). Las caseínas constituyen los alérgenos más importantes de la LV. Si bien la LV contiene más de 25 proteínas diferentes, el alérgeno principal es la  **$\alpha$ 1-caseína**, lo cual podría deberse a que esta proteína no es sintetizada por la glándula mamaria humana. Las



distintas caseínas poseen pocas características estructurales o funcionales en común. Constituyen un conjunto heterogéneo de proteínas sintetizadas por la glándula mamaria y se ha observado que existe un polimorfismo genético que da como resultado diversas variantes por mutaciones puntuales, deleciones de fragmentos de distintos tamaños o por modificaciones pos-traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, etc). Todas estas modificaciones pueden afectar la alergenicidad de las distintas caseínas (J M Wal 2001).

El **suero** contiene principalmente proteínas globulares:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina, lactoferrina y albúmina sérica bovina. La  $\beta$ -lactoglobulina posee dos puentes disulfuro que la estabilizan y es importante resaltar su resistencia a la hidrólisis ácida y a las proteasas por lo cual llega en su forma nativa a la mucosa intestinal, es absorbida como tal o degradada por los enterocitos (Heimo Breiteneder and E N Clare Mills 2005). La  $\alpha$ -lactalbúmina es una proteína monomérica que presenta cuatro puentes disulfuro. A pesar de presentar un alta homología de secuencia con la proteína humana (74% de residuos idénticos y 6% de residuos similares) ha sido identificada como un alérgeno en la LV.

Distintos estudios realizados en pacientes con ALV demostraron que pueden sensibilizarse a uno o varios componentes proteicos de la leche dependiendo del paciente (E Savilahti and Kuitunen 1992; Docena et al. 1996). Se ha descrito la presencia de epitopes B y T en las distintas proteínas de la leche bovina (P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, K Beyer, et al. 2001; P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, L Vila, et al. 2001; Renata R Cocco et al. 2003; Cerecedo et al. 2008; Ruitter et al. 2006; Han et al. 2008). En particular en las caseínas, se han descrito epitopes lineales y conformacionales distribuidos a lo largo de toda la secuencia aminoacídica, pudiendo estar localizados en regiones hidrofóbicas a las que los anticuerpos no acceden en la estructura nativa, a menos que se degraden, o en regiones hidrofílicas, accesibles a las inmunoglobulinas. Se han descrito distintos tipos de epitopes (lineales, conformacionales, epitopes IgG, epitopes IgE) e inclusive se ha asociado las características de los epitopes con el fenotipo de la alergia a leche de vaca (Jean-Michel Wal 2004) Estudios en pacientes de distintas edades permitieron inferir sobre la relación entre los epitopes de los distintos alérgenos y la historia natural de alergia (Kirsi-Marjut Järvinen et al. 2002; K M Järvinen et al. 2001; P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, L Vila, et al. 2001).

Estos trabajos han constituido la base experimental para el reciente desarrollo de herramientas biotecnológicas (proteínas y péptidos recombinantes, arrays de péptidos) para

la detección y mapeo de epitopes inmunodominantes en proteínas bovinas (Schulmeister et al. 2009; Naoki Matsumoto et al. 2009), y con fines diagnósticos (Cerecedo et al. 2008).

## **2.2 Alergia a las proteínas de leche de vaca**

La leche de vaca es uno de los primeros alimentos introducidos en la dieta de un recién nacido y la alergia a leche de vaca constituye la alergia alimentaria de mayor prevalencia en el mundo, afectando aproximadamente un 2.5% de los niños (Rona et al. 2007). Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes, en los que se inducen la supresión y desafío controlado (prueba confirmatoria por excelencia), indican que un 1-10% de la población presenta reacciones de hipersensibilidad no tóxicas frente a alimentos. Entre estas reacciones se encuentran aquellas en las que el sistema inmune está involucrado, siendo una de las principales causas de reacciones de anafilaxia durante la primera infancia (Rona et al. 2007). Este hecho junto a que en los últimos años se ha observado un aumento en la prevalencia de alergia a leche bovina (Branum and Lukacs 2009) determinan que se trate de un serio problema sanitario en todo el mundo. Como se ha mencionado, las alergias alimentarias inducen síndromes mediados por IgE y no mediados por IgE (C. T. Ferreira & Seidman 2007; Scott H Sicherer & D. Y. M. Leung 2010; Scott H Sicherer & Hugh A Sampson 2009), considerándose las reacciones IgE-dependientes como las más frecuentes, lo cual puede deberse a que son más fáciles de evidenciar experimentalmente. Los avances realizados en los últimos años en el desarrollo de metodologías adecuadas para el estudio de los mecanismos que operan en las mucosas, han posibilitado profundizar el conocimiento de los procesos moleculares y celulares responsables de desencadenar signos clínicos alérgicos locales y sistémicos (Schade et al. 2000; Kirsten Beyer et al. 2002; Scott H Sicherer et al. 2010).

En nuestro país también se ha observado un notable incremento en la incidencia de la alergia a leche bovina (90% de los pacientes con alergia alimentaria son alérgicos a LV-Dr Bozzola, datos aún no publicados, disponibles en una encuesta realizada a pacientes y padres de niños con alergias alimentarias). Aproximadamente el 50 % de los mismos son IgE-mediados y pueden presentarse con distintos signos clínicos: urticaria, eczema, asma, rinitis, esofagitis, anafilaxia, distensión abdominal, diarrea, síndrome de alergia oral con manifestaciones peri-orales, etc (Benhamou et al. 2009; Kneepkens and Meijer 2009).

En general, la ALV es una condición temporaria y se ha evidenciado que a los 3 años de edad el 85% de los niños afectados revierten su situación (A Høst and S Halken 1990), aunque

estudios más recientes indican que aproximadamente el 80% de los niños con ALV IgE dependiente continúan siendo alérgicos a los 4 años de edad, el 60% a los 8 años y el 20% aún lo es a los 16 años de edad (Skripak et al. 2007). Los mecanismos por los cuales los niños adquieren tolerancia a las PLV han sido motivo de estudio en estos últimos años. En este contexto, se ha descrito la función de las células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> alérgico específicas en la inducción de tolerancia a los alérgenos de LV en niños que revirtieron su ALV (Karlsson, Rugtveit, and Brandtzaeg 2004), la asociación entre la reducción de los niveles de IgE específica para LV y el desarrollo de tolerancia (S H Sicherer and H A Sampson 1999) y la reducción en el reconocimiento de epitopes secuenciales de  $\alpha$ s1- y  $\beta$ -caseínas por anticuerpos IgE en niños tolerantes (L Vila et al. 2001b), entre los hallazgos más relevantes.

Para el **diagnóstico** de ALV es importante contar con una historia clínica que contemple antecedentes personales y familiares relacionados con enfermedades alérgicas y alergia alimentaria en particular (exposición a alérgenos de la dieta o del medio ambiente, tiempo que transcurre desde la incorporación de alérgenos por vía oral y aparición de los síntomas, frecuencia de aparición de signos clínicos, reproducibilidad de los signos clínicos frente a la exposición al mismo alérgeno o alimento sospechoso en reiteradas ocasiones, etc), junto a un examen clínico y físico que incluye peso y talla. Se deben descartar la posibilidad de parasitosis, enfermedad celíaca y otras intolerancias alimentarias. Para el diagnóstico diferencial de una alergia alimentaria a LV u otro alérgeno alimentario es importante tratar de establecer la correlación entre la sintomatología observada, la participación del sistema inmune y la identificación del alérgeno nocivo.

La confección de la historia clínica puede ser conducente en el diagnóstico de una alergia alimentaria a LV (30-60 % de los casos), aunque en general son necesarias pruebas complementarias. No existe un único test (*in vivo* o *in vitro*) que por sí sólo pueda ser de valor diagnóstico para una alergia alimentaria. Está aceptado que el desafío oral doble ciego con placebo (DBPFCFC) es la prueba diagnóstica confirmatoria por excelencia, pero en realidad no discrimina entre una reacción alérgica mediada por el sistema inmune y una intolerancia no mediada por el sistema inmune. Por lo tanto para el diagnóstico diferencial es necesario el empleo de otro tipo de pruebas complementarias:

- Métodos serológicos para la detección y cuantificación de IgE total e IgE específicas séricas.
- Prueba cutánea principalmente por Prick test con extractos alérgicos comerciales, naturales (Prick-to-Prick en casos que los alérgenos de los alimentos se degraden

facilmente) o con proteínas recombinantes, además de los controles negativo (SF) y positivo (histamina).

- Dieta de eliminación por supresión dietaria del alimento sospechoso de la dieta y registro domiciliario de la desaparición de los signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria.

Con los tres tipos de pruebas anteriores se puede llegar al diagnóstico en el 90 % de los casos y de esta manera evitar realizar la supresión y desafío oral bajo la supervisión de un médico alergista (DBPCFC) (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a). De lo contrario se debe realizar la prueba diagnóstica confirmatoria por excelencia:

- Supresión dietaria y desafío oral: en aquellos casos que no existen antecedentes de anafilaxia se realiza esta prueba de provocación doble ciego y con placebo. Brevemente, consiste en eliminar de la dieta el alimento sospechoso durante 1 semana, se registra la desaparición o no de los signos clínicos, y luego el paciente es internado para administrarle por vía oral el alérgeno en cantidades crecientes durante dos horas. Se puede emplear como placebo el vehículo del alérgeno, un alimento no alérgico (almidón de maíz), puré de frutas o verduras dependiendo de la edad del paciente, etc. Luego de la administración del alérgeno/placebo se registra la aparición de signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria durante las siguientes tres horas, y finalmente el paciente se retira y se continúa con un registro domiciliario durante las siguientes 48 horas.

Actualmente existen nuevas metodologías aplicadas al diagnóstico de alergias alimentarias, algunas de las cuales se están aplicando a nivel asistencial, mientras que otras se encuentran en fase de optimización y validación. Dado que no es el objetivo de este trabajo describir detalladamente las técnicas diagnósticas solo serán mencionadas: prueba de degranulación de basófilos, microarrays con péptidos, ensayos de proliferación de LT Ag-específicos (Cerecedo et al. 2008; Naoki Matsumoto et al. 2009), etc.

Para el **tratamiento** de las alergias alimentarias, actualmente lo más efectivo es la eliminación estricta del alérgeno ofensivo de la dieta durante un tiempo mínimo de 6 meses y hasta al menos los 2 años de edad, o hasta que el sistema inmune del tracto gastrointestinal alcance la madurez necesaria para lograr instaurar los mecanismos de tolerancia oral. En el caso de los niños alérgicos, este proceso de maduración suele retrasarse con respecto a un niño no alérgico, por lo cual se deben realizar desafíos antigénicos en el tiempo, con los riesgos que los mismos implican. En el caso de la ALV este

período de restricción dietaria constituye una tarea compleja para el paciente, para los padres y para el médico alergista, ya que no existe un procedimiento aprobado; además los sustitutos lácteos existentes en el mercado no son muy variados y han probado tener una eficacia relativa, todo lo cual redundará en un impacto importante en la calidad de vida del paciente. Si el paciente tiene menos de 2 años de edad se debe reemplazar la LV por un sustituto que asegure un correcto crecimiento pondero-estatural. Esto suele no ser sencillo y existen distintos abordajes para la prevención o tratamiento. La prevención puede iniciarse con una dieta libre de leche en la madre embarazada (contradictorio según algunos trabajos), en casos severos inclusive deben restringirse otros alérgenos alimentarios (huevo, soja) durante el período de lactancia, y continuar con la lactancia más allá de los 6 meses de edad. Para el tratamiento de niños con sospecha o diagnóstico de alergia a leche de vaca se reemplaza la leche por un sustituto (hidrolizados extensivos, leches de otras especies animales, fórmulas de aminoácidos o a base de proteínas de soja o arroz) o se pueden emplear probióticos y prebióticos, aunque con resultados muy dispares en todos los casos. La inducción terapéutica de tolerancia parece ser un procedimiento promisorio aunque estamos todavía muy lejos de su optimización. El empleo de anticuerpos monoclonales anti-IgE, que han resultado efectivos en otras reacciones alérgicas (Chang et al. 2007), requiere profundizar su evaluación para concluir sobre su efectividad en las alergias alimentarias. Sólo han sido evaluados en alergia al maní (Riffelmann 2008).

Los sustitutos con los que se han logrado los mejores resultados son hidrolizados extensivos de caseínas bovinas o de proteínas del suero de LV, (Benhamou et al. 2009; Kneepkens and Meijer 2009), y las fórmulas a base de aminoácidos individuales. Fórmulas a base de proteínas de soja son empleadas en el tratamiento de la alergia a leche de vaca. Sin embargo actualmente se ha desestimado su uso en la prevención en niños con alto riesgo de alergia por la diversidad de efectos adversos que pueden ocasionar (D A Osborn and Sinn 2004; D A Osborn and Sinn 2006). Se ha observado que entre el 15-40% de los pacientes alérgicos a leche de vaca desarrollan una intolerancia a este sustituto sin haber estado previamente sensibilizados a la soja (Zeiger et al. 1999; Zoppi and Guandalini 1999; Klemola et al. 2002; Klemola et al. 2005).

---

### 3 ALERGENOS VEGETALES. Generalidades

Los alérgenos vegetales han sido motivo de un profundo estudio en los últimos años a partir de los hallazgos clínicos de las alergias cruzadas entre vegetales filogenéticamente alejados (frutas y legumbres, pólenes y frutas, etc). La sospecha de la existencia de componentes proteicos con estructura, y por lo tanto funciones, conservadas permite inferir que se tratan de componentes indispensables para la fisiología del vegetal. Por consiguiente, y a pesar de los cambios menores sufridos a lo largo del proceso evolutivo, las regiones que determinan una función biológica se conservan en los distintos vegetales de los cuales forman parte. Esta hipótesis permitiría sugerir que no son las características estructurales las que determinan el comportamiento alérgico de una determinada proteína, sino el impacto de estos cambios menores en su estructura (Radauer and Heimo Breiteneder 2007; Heimo Breiteneder and Clare Mills 2005).

La identificación, aislamiento, caracterización bioquímica e inmunológica, y clonado de los alérgenos de origen vegetal, entre ellos alimentos, pólenes, látex, etc ha permitido realizar importantes avances en diversas áreas de la especialidad: diagnóstico, inmunoterapia, estudios estructurales, mapeo de epitopes, producción de proteínas hipoalérgicas, etc. La información obtenida ha permitido agruparlos en **familias** (proteínas con un 30% o más de identidad de residuos aminoacídicos) y **superfamilias** (familias cuyos miembros tienen escasa identidad secuencial, pero sus características estructurales y funcionales sugieren un origen evolutivo común) de proteínas (Heimo Breiteneder and Radauer 2004). Por otro lado, es importante mencionar que los alérgenos de esta manera agrupados, muestran una amplia distribución en el reino vegetal, hecho que no es menor al momento de analizar los mecanismos de hipersensibilidad que pueden inducir. Esta nueva clasificación de los alérgenos vegetales (**tabla 2**) en función de aspectos evolutivos seguramente reemplazará en un futuro a la clasificación usual de los alérgenos en base a la vía de ingreso al organismo (alimentarios, inhalatorios, inyectables, etc), y tendrá un impacto directo en la caracterización de nuevos alérgenos, en la comprensión de reactividades cruzadas clínicas, en el diagnóstico, en el pronóstico y en el tratamiento de la patología.

**Tabla 2.** Clasificación de alérgenos vegetales en superfamilias y familias

Superfamilia	Familia	Ejemplos de alérgenos
<b>Cupinas</b>	Vicilinas	<i>Ara h1</i> (maní), <i>Jug r2</i> (nuez)
	Leguminas	<i>Ara h3</i> y <i>Ara h4</i> (maní), <i>Cor a 9</i> (avellana)
<b>Prolaminas</b>	2S Albúminas	<i>Ses i2</i> (sésamo), <i>Sin a 1</i> (mostaza)
	nsLTPs	<i>Pru p3</i> (durazno), <i>Cor a8</i> (avellana)
	Inhibidores de $\alpha$ -amilasa /proteasas de cereales	<i>Inhibidor de <math>\alpha</math>-amilasa deimérico de arroz</i>
	Prolaminas de cereal	<i>Tri a19</i> (trigo), <i>Sec c 20</i> (centeno)
<b>Profilinas</b>	Profilinas	<i>Gly m3</i> (soja), <i>Api g4</i> (apio), <i>Pyr c4</i> (pera)
<b>Proteínas de stress o de defensa</b>	PRs (Pathogenesis Related proteins)	<i>Glucanasa de banana</i> , <i>Pru av2</i> (cereza), <i>Mal d 1</i> (manzana)
	Proteasas	<i>Act c1</i> (Kiwi), <i>Gly mBd 30K</i> (soja)
	Inhibidores de Proteasas	Inhibidores tipo Kunitz ( <i>Inhib de tripsina de soja</i> ). <i>Inhibidores de <math>\alpha</math>-amilasa /proteasas de cereales</i>

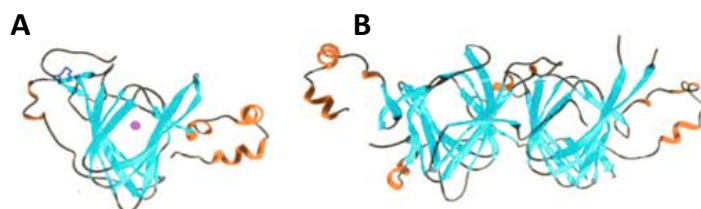
El 60 % de los alérgenos vegetales pertenecen a cuatro superfamilias: **prolaminas**, **cupinas**, **profilinas** y **proteínas de stress o de defensa** (Radauer and Heimo Breiteneder 2007) y casi la totalidad de los alérgenos vegetales alimentarios son proteínas de reserva o relacionadas con el sistema de defensa de las plantas (Heimo Breiteneder and Radauer 2004).

### 3.1 Alérgenos alimentarios pertenecientes a la superfamilia de las cupinas

Las **cupinas** constituyen una superfamilia funcionalmente diversa y ampliamente distribuida en la naturaleza, inclusive se las encuentra en bacterias y en el reino animal. Dentro de esta superfamilia podemos encontrar dos grandes familias: las **vicilinas**, que incluyen por ejemplo a los alérgenos de maní *Ara h 1* o *Jug r 2* de la nuez; y las **leguminas**, donde encontramos otros alérgenos de maní *Ara h 3* y *Ara h 4* y *Cor a 9* de avellanas (Scurlock and A Wesley Burks 2004; Roux, Teuber, and Sathe 2003).

El nombre cupina deriva de la estructura de barril formado por cadenas con plegamiento secundario “beta”, y de acuerdo a la cantidad de dominios conservados, pueden haber cupinas, bicupinas o multímeros de cupinas, cada una de ellas con diferentes

funciones. Los modelos estructurales de una cupina y una bicupina se presentan en la **figura 2**, donde se pueden observar en diferente color las regiones mayoritarias de hojas  $\beta$  plegadas y aquellas minoritarias de  $\alpha$  hélice. Entre las **bicupinas** se encuentran las **globulinas de almacenamiento en semillas**, importantes en la dieta humana y entre las que se encuentran los **alergenos de soja y maní**.



**Figura 2. Estructura de proteínas de la superfamilia de las cupinas. A)** Monómero de germen de cebada de un dominio de **cupina** (1FIZ), **B)** subunidad de  $\beta$ -conglucina de soja, una **bicupina** (1IPK). En celeste se marcan las hojas  $\beta$  y en naranja las  $\alpha$  hélices., en azul los puentes disulfuro y el círculo violeta representa un ión Manganeso. Figura adaptada de “A classification of plant food allergens”, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Breiteneder & Radauer, 2004.

De acuerdo al coeficiente de sedimentación, las globulinas de las cupinas se dividen en dos grupos: **7S o vicilinas** y **11S o leguminas**. Ambas globulinas presentan una baja homología secuencial (35-45 %), sin embargo muestran una alta homología estructural y se supone que han evolucionado a partir de dominios cupinas ancestrales presentes en procariontes (Radauer and Heimo Breiteneder 2007). Algunas de sus características más relevantes se resumen en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Globulinas de almacenamiento en semillas.**

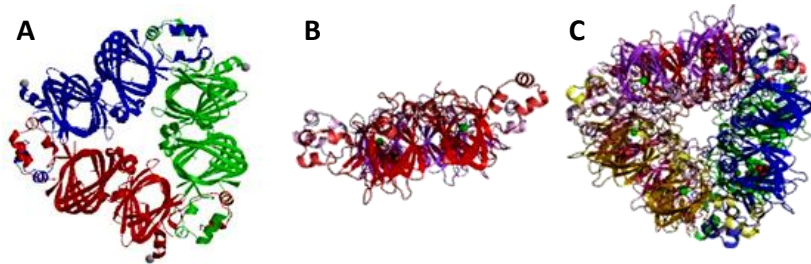
Familia	Vicilinas	Leguminas
Clasificación según coeficiente de sedimentación	7S	11S
Características estructurales	Las SUBUNIDADES tienen estructura de BICUPINAS y en la semilla adoptan una estructura TRIMÉRICA. No poseen puentes disulfuro	Las SUBUNIDADES tienen estructura de BICUPINAS y en la semilla adoptan una estructura HEXAMÉRICA. . Cada subunidad ha sido clivada proteolíticamente para generar polipéptidos ACIDOS y BASICOS que permanecen unidos en la subunidad madura a través de uniones disulfuro.

Las **vicilinas o globulinas 7S maduras** son proteínas **triméricas**, como la que se puede observar en el modelo de la **figura 3A**, de 150 a 190 kDa, constituidas por monómeros entre 40 y 80 kDa. Una característica importante es que poseen una sola **cisteína** y *por ende no*



poseen puentes disulfuro en la estructura de una subunidad. Por cristalografía se ha obtenido la estructura tridimensional de algunas proteínas de esta familia (N Maruyama et al. 2001; Yukie Maruyama et al. 2004; Takako Fukuda et al. 2008).

Las **leguminas o globulinas 11S**, en cambio, son proteínas **hexaméricas (Figura 3C)**. En un principio, los monómeros se ensamblan y transportan como trímeros intermediarios a la vacuola de almacenamiento en la semilla. Allí, cada subunidad del trímero es clivada proteolíticamente para dar polipéptidos ácidos de 30-40 kDa y básicos de aproximadamente 20 kDa que permanecen unidos por uniones disulfuro. Este procesamiento provoca un cambio de conformación que hace que dos trímeros se apilen por interacción de caras equivalentes formando una globulina 11S hexamérica madura (Heimo Breiteneder and Radauer 2004; M Adachi et al. 2001; Motoyasu Adachi, Kanamori, et al. 2003; Motoyasu Adachi, Eiko Okuda, et al. 2003).



**Figura 3. Modelos estructurales de globulinas 7S y 11S. A)** Modelo de trímero de  $\beta$ -conglucina de soja (11UK), una vicilina, formado por monómeros (rojo, verde o azul) con estructura de bicupina. **B)** Trímero de la legumina de soja "glicinina A3B4", cada subunidad con diferente color, posee estructura de hojas  $\beta$  y  $\alpha$  hélices e iones manganeso (verde). **C)** Hexámero formado por tres monómeros de A3B4, forma madura de la glicinina A3B4.

La formación de estas estructuras multiméricas es importante al momento de correlacionar el mapeo de epitopes con la activación de mastocitos y basófilos en forma IgE-dependiente, responsable de la instauración de los procesos inflamatorios.

Se desconoce cuál es la fisiología de la absorción de estos alérgenos a nivel del tracto gastrointestinal y en qué estado llegan cuando son reconocidas por el sistema inmune. Sin embargo, está claro que atraviesan la barrera epitelial, estimulan a las células del sistema inmune, y en algunos casos llegan al torrente sanguíneo para inducir reacciones sistémicas. Las características estructurales de estas proteínas y las interacciones conformacionales contribuyen a su estabilidad. Por lo tanto cuando se analiza la alérgenicidad de las mismas es importante considerar que son componentes abundantes en el vegetal y resistentes a la degradación por procesos térmicos, químicos o a la acción de enzimas digestivas y pH ácido. (Heimo Breiteneder and Clare Mills 2005).

### 3.2 Alergenos alimentarios pertenecientes a la superfamilia de las prolaminas

El nombre de esta superfamilia se debe a las prolaminas de los cereales, principales proteínas de almacenamiento en granos de cereal, excepto en avena y arroz, que se caracterizan por su elevado contenido en los aminoácidos prolina y glutamina. Además se incluye en esta superfamilia a varias familias de alergenos vegetales como las **albúminas 2S de almacenamiento**, las proteínas transportadoras de lípidos no específicos (nsLTPs) y los inhibidores de alfa-amilasa, tripsina o ambos de semillas de cereales (**Tabla 2**). Todas estas proteínas de bajo peso molecular son ricas en cisteína y en azufre, y poseen estructura tridimensional similar, con abundancia de alfa hélices, dominios repetitivos ricos en prolina y glutamina, y dominios no repetitivos con cisteínas conservadas (Breiteneder, Heimo and Christian Radauer 2004).

*En esta superfamilia se encuentra el mayor número de alergenos vegetales descriptos*, siendo los más importantes los que se encuentran en trigo. Las principales homologías estructurales en estos alergenos están localizadas en los dominios con cisteína y en zonas con estructura de  $\alpha$ -hélice. Estas zonas además muestran una alta resistencia a procesos térmicos y proteolíticos, lo que contribuye marcadamente a la alergenicidad de los alimentos procesados (Heimo Breiteneder and Clare Mills 2005).

Varios de los alergenos de nueces y otras semillas son **albúminas 2S**: Ber e1 y 2S de castañas de cajú o “nuez de Brasil”, Jug r1 de la nuez, Ses i2 del sésamo, Bra j1 de la mostaza, etc (Breiteneder, Heimo and Christian Radauer 2004).

Los alergenos **nsLTPs** se encuentran en frutas, frutas secas, semillas y vegetales. Los **inhibidores de proteasas**, como el inhibidor de alfa-amilasa, confieren resistencia a las plantas impidiendo la acción de enzimas digestivas presentes en insectos. Inhibidores de este tipo se encuentran en trigo, cebada, centeno, arroz y maíz: subunidades glicosiladas del tetrámero CM16 de trigo, su homólogo de cebada y Hor v15 de cebada, Sec c1 de centeno, y los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa RDA I-1 y RDAI-3 de arroz (Breiteneder, Heimo and Christian Radauer 2004).

Las **prolaminas** de cereales, denominadas gluteninas y gliadinas en trigo, secalinas en centeno y hordeínas en cebada, son las principales proteínas de almacenamiento en el endosperma del grano de cereal. Son ricas en azufre y en su dominio N-terminal hay

abundancia de prolínas y glutaminas repetitivas, mientras que el dominio no repetitivo C-terminal posee residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro intracatenarios. Las glutelinas de baja masa molecular, y las  $\omega$  gliadinas se han descrito como alérgenos importantes del trigo en la población pediátrica (Battais et al. 2003; Breiteneder, Heimo and Christian Radauer 2004).

Los alérgenos de la **familia de las proteínas de stress o PR** se encuentran en plantas frutales y cereales. Las proteínas de la familia de los inhibidores de tripsina tipo Kunitz pertenecen a este grupo de proteínas. El inhibidor de soja tipo Kunitz constituye un alérgeno minoritario, aunque se ha descrito que es capaz de inducir anafilaxia (Moroz and W H Yang 1980).

### 3.3 Alérgenos de soja

La soja está compuesta por un 37% de proteínas con funciones diversas como se resume en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Proteínas de soja y alérgenos descritos.

Fracción proteica		Alérgenos Descritos
<b>Proteínas de la cáscara</b>	Vinculadas principalmente a <i>alergias respiratorias</i>	<i>Gly m 1a, Gly m1b, Gly m2, Gly m 50kD</i>
<b>Proteínas del Sistema de Defensa/ Proteasas</b>	Vinculadas a <i>alergias alimentarias y síndrome de alergia oral</i>	<i>Gly m3</i> (Profilina), <i>Gly m4, Gly mBd 30K</i> (P34) <i>Gly m CPI</i> (Inhibidor de cistein proteasas) <i>Gly m TI</i> (Inhibidor de tripsina Kunitz de soja)
<b>Proteínas de reserva</b>	70-80% son GLOBULINAS. Vinculadas a <i>alergias alimentarias</i>	<i>Gly m5</i> ( $\beta$ -conglucina): <i>Gly m 5.0101</i> (subunidad $\alpha$ ), <i>Gly m 5.0201</i> (subunidad $\alpha'$ ), <i>Gly m 5.0301</i> (subunidad $\beta$ ) <i>Gly m Bd28K</i> (P28)
		<i>Gly m6</i> (glicinina): <i>Gly m 6.0101</i> (subunidad G1) <i>Gly m 6.0201</i> (subunidad G2) <i>Gly m 6.0301</i> (subunidad G3) <i>Gly m 6.0401</i> (subunidad G4) <i>Gly m 6.0501</i> (subunidad G5)
<b>Otras</b>	En vacuolas de almacenamiento, en lecitinas de soja	<i>Gly mBd 39kD</i> (P39)
	2S	<i>Gly m 2S albumina</i>
	Lectinas	<i>Gly m aglutinina</i>

La mayoría de las proteínas se encuentran en la semilla, y el **70-80%** de las mismas son **globulinas 11S y 7S**. Se han identificado **al menos 21 proteínas alergénicas** en soja ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) capaces de unir anticuerpos IgE y provocar **alergias alimentarias y respiratorias**. Las proteínas de la cáscara tienen mayor relevancia como alérgenos inhalatorios o alérgenos ocupacionales (Codina et al. 2002), mientras que las proteínas de reserva y las proteasas tienen mayor asociación con las alergias alimentarias. **Gly m1** y **Glym2** son dos proteínas de la cáscara reconocidas como alérgenos inhalatorios de soja (Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005; Ballmer-Weber and Stefan Vieths 2008).

Del total de proteínas identificadas, sólo algunas de ellas han sido caracterizadas detalladamente y han sido aceptadas oficialmente como alérgenos, de acuerdo al criterio del Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la IUIS (International Union of the Immunological Societies). Estos son: el **inhibidor de tripsina Kunitz**, una tiol-proteasa **Gly m Bd 30K**, la **subunidad  $\alpha$**  de la principal proteína de reserva  $\beta$ -conglícinina, la **cadena ácida de la subunidad G1** de la glicinina, la **cadena básica de la subunidad G2** de la glicinina y un **precursor de aglutinina/lectina** (Ballmer-Weber and Stefan Vieths 2008).

La tiol-proteasa **Gly m Bd 30k**, también conocida como **P34** por su peso molecular, ha sido descrita por varios grupos como el **alérgeno** principal de la soja (T Ogawa et al. 1991). El 65 % de los pacientes sensibles a soja presenta anticuerpos IgE específicos de este componente. Se trata de una globulina 7S, presente en el cotiledón de la semilla, que luego se convertirá en las hojas de la planta embrionaria. La estructura terciaria de P34 es coincidente con la de la familia de las papaínas, las cuales son cisteín- proteasas. Sin embargo, P34 no tiene actividad enzimática ya que presenta una sustitución de la glicina en posición 38 del sitio activo por una cisteína. Se han mapeado más de 10 epítopes lineales en los cuales el 30% de los aminoácidos son ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y arginina. Además, se cree que la glicosilación y la resistencia a tratamientos químicos (beta-mercaptoetanol y urea 4M) y físicos (altas temperaturas) le confieren propiedades inmunogénicas y antigénicas (T Ogawa et al. 1993; R Helm et al. 1998; Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005).

La **fracción 7S** de globulinas consiste principalmente en  **$\beta$ -conglícinina** o **Gly m5**, y también se encuentra entre estas a la proteína **Gly m Bd 28K**, que no está presente en la totalidad de las variedades de soja, pero se ha demostrado su carácter alergénico en pacientes sensibles a soja (Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005). Gly m Bd 28K es una glicoproteína de 28kDa que en su forma madura en la semilla está formada por dos

---

polipéptidos N y C terminal que contienen los epítopes IgE responsables de la alergenicidad de esta proteína (Tsuji et al. 1997; Hiemori et al. 2000; Xiang et al. 2004).

**$\beta$ -conglucina** es una *glicoproteína* de 180 kDa conformada por tres subunidades:  **$\alpha$**  (~67 kDa),  **$\alpha'$**  (~71 kDa) y  **$\beta$**  (~50 kDa), las cuales pueden formar heterotrímeros y homotrímeros por interacciones conformacionales. La región core de estas subunidades son altamente homólogas y presentan sólo algunas diferencias: las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  poseen una extensión rica en aminoácidos ácidos en la región región N-terminal y dos sitios de glicosilación, mientras que la subunidad  $\beta$  no posee esa zona extra de residuos ácidos y se encuentra glicosilada en un solo sitio (Yukie Maruyama et al. 2004). A pesar de tal similitud, sólo la **subunidad  $\alpha$  o Gly m Bd 60k** ha sido caracterizada como alergénica (T Ogawa et al. 1995). Sin embargo, estudios más recientes describieron la presencia de anticuerpos séricos IgE en niños y adultos alérgicos a soja específicos de las tres subunidades de  $\beta$ -conglucina (Holzhauser et al. 2009; Krishnan et al. 2009). Además la subunidad  $\alpha'$  induce reacciones de hipersensibilidad en un modelo animal de alergia a soja inducido en ratas (Guo et al. 2008).

La fracción de **globulinas 11S** contiene la proteína **glicina** o **Gly m 6**, la cual es sintetizada en la semilla durante la embriogénesis. Es una proteína hexamérica constituida por cinco subunidades distintas, **G1** (A1aB1b, 53 kDa), **G2** (A2B1a, 52,4kDa), **G3** (A1bB2, 52,2kDa), **G4** (A5A4B3, 61,2 kDa) y **G5** (A3B4, 55,4kDa), cada una de las cuales contiene uno o más polipéptidos ácidos "**A**" y básicos "**B**" unidos por puentes disulfuro (Prak et al. 2005). Todas las subunidades demostraron reactividad IgE en humanos y en modelos animales (Hanne R Christensen, Bruun, and Frøkiaer 2003; Holzhauser et al. 2009), pero sólo G1 y G2 han sido caracterizadas como alérgenos de soja, e inclusive se han mapeado sus epítopes IgE (R M Helm, G Cockrell, Connaughton, H A Sampson, G A Bannon, Beilinson, Livingstone, et al. 2000; R M Helm, G Cockrell, Connaughton, H A Sampson, G A Bannon, Beilinson, Nielsen, et al. 2000; T A Beardslee et al. 2000a).

Dado el alto valor biológico de las proteínas de soja y su importancia en la dieta humana, esta leguminosa ha sido ampliamente estudiada en función de su modificación genética para mejorar las condiciones de cultivo. Sin embargo, para el caso de la variante de soja que contiene el gen para la proteína heteróloga CP4 EPSPS, no se ha hallado un incremento en su alergenicidad, ni en la unión a moléculas de IgE (Hoff et al. 2007; Sang-Ha Kim et al. 2006). Trabajos recientes aplicando proteómica han comparado la alergenicidad de variantes de soja transgénicas con sus contrapartidas naturales. A pesar que se han descrito nuevos alérgenos, éstos no serían producto de la modificación genética (Eliot M Herman

2003; Batista et al. 2007; Guo et al. 2008). Se ha demostrado que la modificación génica puede constituirse en una metodología para obtener una soja hipoalergénica, sin embargo se requiere profundizar los estudios para establecer cuáles son los alérgenos mayores y menores, e identificar epítopes B y T (A Ogawa, Samoto, and Takahashi 2000; Eliot M Herman et al. 2003; L'Hocine and Boye 2007; Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005; Samoto et al. 1996).

### **3.4 Alergia a las proteínas de soja**

La soja es considerada a nivel mundial un alérgeno importante. Esto se debe a la gran exposición a este alérgeno no sólo de los trabajadores relacionados con actividades agropecuarias, sino también de la población en general. A la facilidad de cultivo se le suma el alto valor biológico y nutritivo de sus proteínas, su bajo costo como fuente proteica y sus propiedades funcionales, todo lo cual determina que sea ampliamente utilizada por la industria alimenticia. Cabe destacar que luego de Estados Unidos (45% de la producción mundial) y Brasil (28 %), Argentina es el tercer país productor de soja en el mundo (18 %) (Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005; Codina et al. 2002). Se encuentran componentes de soja en diversos alimentos como aceites, harinas, productos fermentados, productos bebibles, alimentos procesados, etc.

Esta gran exposición a la que está expuesta la población se inició en la década del 80. Originalmente se registraron casos de alergia a soja en Asia y Estados Unidos, pero luego se extendió a Europa y actualmente es un problema mundial (Ballmer-Weber and Stefan Vieths 2008; Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005). Afecta aproximadamente entre el 1% y 6% de los niños, mientras que en adultos se han encontrado valores más bajos, aunque la incidencia es creciente (Zuidmeer et al. 2008).

En Argentina, la alergia a proteínas de soja no es un problema menor. En la encuesta mencionada anteriormente realizada por el Dr Bozzola ([www.alergialimentaria.org](http://www.alergialimentaria.org)) se encontró que luego de la LV, principal alérgeno alimentario reportado en la población pediátrica (90% de los casos), la soja ocupa el segundo lugar con el 33% de los casos. Ambos alérgenos fueron indicados como responsables de provocar síntomas gastrointestinales (63%) y cutáneos (70%). Otro dato interesante que se desprende de este trabajo es la importancia del etiquetado de los alimentos. El 93% de los encuestados mencionan que prestan especial atención a los rótulos y que en numerosas ocasiones éstos no son claros, ni

incluyen la indicación de si tienen alérgenos en su composición o no. Cabe aclarar que la presencia de mínimas cantidades de un alérgeno pueden significar un problema serio para un paciente alérgico, por lo cual es importante legislar en este sentido (Añíbarro, Seoane, and Múgica 2007). El etiquetado es un problema a nivel mundial, la FDA sólo ha determinado que cuando uno de los 8 alérgenos alimentarios (leche bovina, huevo de gallina, maní, soja, trigo, nueces, pescados y crustáceos) está presente en la composición de un alérgeno se debe indicar, pero aún no se ha establecido cuál es el umbral de concentración que se debe considerar, ni cómo se debe rotular un alimento alérgico. En nuestro país se ha creado recientemente la **Plataforma de alérgenos en alimentos** que tiene como fin establecer criterios que ayuden a legislar este importante aspecto.

Se han descrito distintos tipos de reacciones alérgicas inducidas por la soja en la población pediátrica: reacciones **mediadas por IgE** que pueden causar síntomas respiratorios, cutáneos, gastrointestinales y hasta anafilácticos, y **reacciones no mediadas por IgE** que generan trastornos gastrointestinales (enterocolitis, vómitos y diarrea) (Ballmer-Weber and Stefan Vieths 2008; Ballmer-Weber et al. 2007; Holzhauser et al. 2009).

En adultos, la soja constituye un importante alérgeno ocupacional como alérgeno inhalatorio para los trabajadores y habitantes de zonas aledañas a los cultivos de soja y plantas de manipulación de sus granos que sufren trastornos respiratorios (Codina et al. 2003; Codina et al. 2002). Asimismo se cree que **reacciones cruzadas** con otros alérgenos a los cuales el paciente se encuentra sensibilizado puede ocasionar problemas respiratorios o gastrointestinales. Tal es el caso del polen de abedul en Europa o maní en Estados Unidos (Jensen et al. 2008; Mittag et al. 2004).

En la población pediátrica puede ser importante la soja como un alérgeno alimentario de reactividad cruzada con caseínas de origen bovino (Docena et al. 2002; Rozenfeld et al. 2002; Curciarello et al. 2008). Como se mencionó anteriormente fórmulas a base de proteínas de soja son empleadas en el tratamiento de la ALV por su menor costo, valor nutritivo, sabor y disponibilidad comercial. Sin embargo, actualmente se ha desestimado su uso en la prevención en niños con alto riesgo de alergia por la diversidad de efectos adversos que puede ocasionar (D A Osborn and Sinn 2004; Turck 2007). Existe actualmente gran interés en la remoción de los alérgenos de la soja y sus productos por medio de mutaciones, procesamiento de alimentos, o a través de plantas modificadas genéticamente (Eliot M Herman et al. 2003; Eliot M Herman 2003; A Ogawa, Samoto, and Takahashi 2000; Samoto et al. 1996).

---

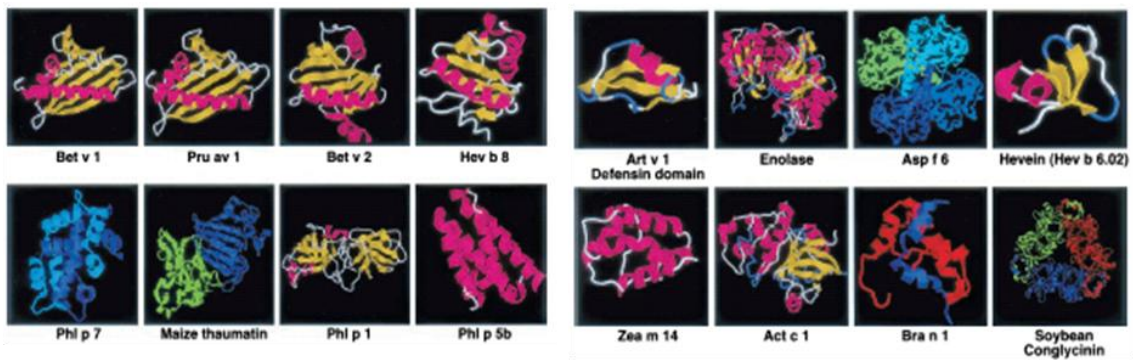
#### 4 REACTIVIDAD CRUZADA. Generalidades, estudios, implicancias.

Las primeras evidencias de la existencia de reactividad cruzada entre alérgenos se originaron a partir de las observaciones clínicas en la década del 70 (Anderson et al. 1970; Hannuksela and Lahti 1977). Se observaba que muchas polinosis estaban acompañadas con alergia alimentaria a ciertas frutas. Recién en la década del 80 con el advenimiento de la clonación, la secuenciación y la identificación de alérgenos mayores y menores se pudo comprender que existen pan-alérgenos vegetales que son los responsables de inducir reacciones alérgicas IgE-dependientes. Luego se extendió este concepto a sistemas no relacionados con pólenes-frutas, y este avance permitió comprender la asociación clínica entre sistemas alérgicos filogenéticamente no relacionados como langostino-dermatofagoides, látex-palta, etc.

Cuando se define una reactividad cruzada es importante distinguir *sensibilización* de la *inducción de signos clínicos*, y en general los anticuerpos IgE están involucrados en la aparición de una reacción alérgica. Por lo tanto, los estudio serológicos suelen brindar información relevante aunque se debe tener en cuenta que la reactividad cruzada serológica puede ser más amplia que la reactividad cruzada clínica, y aquí entran en juego numerosos factores (flora del tracto gastrointestinal, madurez intestinal, grado de procesamiento de los alérgenos en el tracto gastrointestinal, grado de sensibilización de los mastocitos y basófilos, preparación del alimento, etc.), muchos de los cuales tienen que ver con aspectos individuales (van Ree 2004).

Los sistemas mejor descritos de reactividad cruzada clínica son los que dan origen al “Síndrome de alergia oral”. La sensibilización primaria a alérgenos presentes en pólenes (profilinas y principalmente Bet v1-alérgeno principal del polen de abedul), determina la aparición de anticuerpos IgE específicos capaces de unir epitopes en alérgenos de manzana, apio, melón, banana o zanahoria (H Breiteneder et al. 1989; R Valenta et al. 1992). Por lo tanto individuos primariamente sensibilizados al polen, al ingerir estos vegetales sufren reacciones inflamatorias en la mucosa oral. También puede aplicarse el mismo concepto para comprender la reactividad cruzada entre grupos de alérgenos presentes en alimentos: palta-banana-kiwi, leche de cabra-leche de oveja-leche bovina, camarón-cangrejo-langosta, lentejas-arvejas-garbanzos, etc. En prácticamente todos estos casos se han identificado alérgenos con epitopes conservados, lo cual ha permitido, como se mencionó anteriormente, su agrupación en familias y superfamilias de alérgenos. Algunos ejemplos se ilustran en la **figura 2**.





**Figura 2. Familia de alergenios agrupados de acuerdo a su estructura.** Se encuentran diversos tipos de proteínas de origen vegetal y fúngico en esta familia.

Las reacciones de hipersensibilidad a múltiples alimentos pueden ser analizadas aplicando este concepto, principalmente para alergenios de origen vegetal (Jensen et al. 2008; Ibáñez et al. 2003; Xiang et al. 2002a; Peeters et al. 2007; Barre et al. 2008a). En el reino animal se han hallado un menor número de proteínas alérgicas conservadas responsables de este tipo de asociaciones: las tropomiosinas son responsables de la reactividad cruzada entre distintas especies de ácaros (Witte man et al. 1994), o entre ácaros y langostinos, las caseínas responsables de la reactividad cruzada entre leche de distintas especies de mamíferos (Katz et al. 2008) y con carne bovina en niños (Martelli et al. 2002), etc. Incluso se ha caracterizado la reactividad cruzada entre antígenos no relacionados evolutivamente, pero que comparten estructuras y epitopes similares (Heimo Breiteneder and Clare Mills 2006): alergia a cereales en niños con ALV (K-M Järvinen, Turpeinen, and Suomalainen 2003), alergia a proteínas de soja en pacientes con ALV (Klemola et al. 2005; Rozenfeld et al. 2002), etc. Este último caso es relevante en poblaciones expuestas a proteínas de soja, ya sea en forma natural o como consecuencia del empleo de formulaciones a base de proteínas de soja empleadas durante el tratamiento sustitutivo, como se ha mencionado anteriormente.

Este concepto de reactividad cruzada entre alergenios no sólo ha cobrado importancia desde el punto de vista del reconocimiento inmunológico de los alergenios, sino también del diagnóstico y el tratamiento de las alergias alimentarias. De esta manera se ha planteado por ejemplo, tratar la alergia a la manzana a través de la inmunoterapia con alergenios del pólen de abedul. Aquí entra en juego el concepto de los epitopes T de reactividad cruzada. Es decir que no sólo existen epitopes B conservados entre alergenios, sino que además son necesarios los epitopes T para posibilitar la generación de anticuerpos IgE. La disponibilidad de información sobre epitopes T es mucho más restringida en la

actualidad que la de epitopes B, entre otros factores, por limitaciones metodológicas para evidenciar los epitopes T. Sin embargo, los avances logrados en la clonación de linfocitos T específicos de alérgenos ha permitido en muchos sistemas una completa caracterización de epitopes B y T (Beatrice Jahn-Schmid et al. 2005; B Bohle et al. 2005). Esta información es la base teórica que permitirá postular la inducción de linfocitos T regulatorios en la inmunoterapia antígeno-específica, a través de la administración de alérgenos relacionados o modificados por distintas vías mucosales (inmunoterapia sublingual) (Gerstmayr et al. 2007; Knittelfelder, Riemer, and Jensen-Jarolim 2009; Rosa, Ribeiro, and Cunha-Neto 2010; M Yang, C Yang, and Mine 2010).

Nuestro grupo ha planteado la existencia de reactividad cruzada inmunoquímica entre un sistema alérgico animal (caseínas bovinas) y uno vegetal (globulinas de soja). Si bien no disponemos hasta el momento de datos que permitan evidenciar una reactividad cruzada clínica, podemos afirmar que existen epitopes B de reactividad cruzada inmunoquímica que podrían estar involucrados en la inducción de reacciones alérgicas. Por otro lado, consideramos que el empleo de modelos animales de alergia (que serán descritos más adelante) puede brindar importante información sobre la reactividad cruzada alérgica como un paso previo a estudios en pacientes con alergia alimentaria. Sin embargo, sabemos de las limitaciones en la interpretación y extrapolación de estos resultados al humano. Indudablemente se debe recurrir a estudios que involucren pacientes alérgicos.

Se ha descrito que varios alérgenos de la soja (globulinas 7S y 11S) muestran reactividad cruzada con diferentes sistemas proteicos vegetales, generalmente de otras leguminosas, y animales. Sin embargo los mecanismos moleculares no son del todo comprendidos, ya que no siempre se observa que pacientes sensibilizados primariamente a un determinado alérgeno desarrollan signos clínicos al ser expuestos a un alérgeno relacionado. Para el caso de la reactividad cruzada entre alérgenos de soja y maní se ha observado que muchos de los individuos que presentan hipersensibilidad a las proteínas de soja también reaccionan frente a la exposición al maní (Ballmer-Weber and Stefan Vieths 2008; T A Beardslee et al. 2000b; Xiang et al. 2002a). En conjunto estas evidencias experimentales han permitido establecer que proteínas de almacenamiento presentes en las semillas (proteínas 2S, 7S y 11S) constituyen alérgenos mayores en distintas leguminosas (maní, soja, lentejas, nueces, castañas, sésamo, girasol etc) y que podrían ser las responsables de las alergias alimentarias múltiples. En lo que respecta a la soja, se la ha

involucrado en distintos sistemas de reactividad cruzada: soja-maní, soja-abetul y nuestro grupo propone, soja-leche bovina. Lo que es llamativo es que se ha observado que a pesar de evidenciarse experimentalmente esta reactividad cruzada, la ingestión de proteínas de soja suele no producir signos clínicos. A pesar que Gly m 4 de soja presenta reactividad cruzada con Bet v1 de abedul, y aproximadamente el 70 % de los pacientes sensibilizados al abedul también están sensibilizados a Gly m 4, un reducido número de pacientes desarrollan signos clínicos frente a la ingestión de proteínas de soja (Mittag et al. 2004). Asimismo solo en el 15% de los pacientes alérgicos a leche de vaca IgE-mediados la exposición a proteínas de soja induce reacciones alérgicas (Zeiger et al. 1999). Por lo tanto para lograr una mejor comprensión de los alcances de la reactividad cruzada serológica, y el significado clínico de la reactividad cruzada, es necesario continuar con los estudios de la inmunobiología del reconocimiento de los alérgenos y de los mecanismos inmunorregulatorios que gobiernan la inducción de las reacciones alérgicas.

El desarrollo de herramientas de la **bioinformática** ha posibilitado importantes avances en la comprensión de la reactividad cruzada (Gendel and Jenkins 2006; Jaroszewski et al. 2005; Adriano Mari et al. 2006; Saha and Raghava 2006). La identificación *in silico* de epitopes lineales y conformacionales ha permitido asociar familias de alérgenos que hasta el momento no guardaban relación clínica alguna. Esta información es importante desde el punto de vista pronóstico y permite establecer en términos de probabilidad el riesgo de ocurrencia de reactividad cruzada clínica frente a una co-sensibilización (Michael B Stadler and Beda M Stadler 2003; Silvanovich et al. 2006). Por otro lado, la capacidad de modelar la estructura de las proteínas, permite predecir similitudes estructurales entre alérgenos, identificar la presencia de epitopes conformacionales conservados e interpretar reacciones cruzadas serológicas (Barre, Borges, and Rougé 2005; Ivanciuc et al. 2009; Jenkins et al. 2005a; Oezgüen et al. 2008).

Sin embargo, estos estudios *in silico*, requieren ser corroborados mediante ensayos que demuestren la unión de anticuerpos de tipo IgE, para lo cual es fundamental contar con sueros de individuos alérgicos y las proteínas alérgicas a evaluar. Resulta ventajoso el empleo de **proteínas recombinantes** para evaluar la antigenicidad de las mismas, ya que la ingeniería de proteínas permite realizar modificaciones respecto de sus contrapartidas naturales, expresar y evaluar la reactividad de fragmentos más pequeños de las mismas por separado, o bien obtener proteínas quiméricas por fusión a otras proteínas (Xiang et al. 2002b; Xiang et al. 2004; Schulmeister et al. 2009). La reactividad IgE sobre fragmentos

pequeños derivados de la proteína de estudio, se puede realizar también sobre **péptidos sintéticos** (Albrecht et al. 2009).

El fenómeno de reactividad cruzada alérgica involucra reacciones inmunológicas IgE-mediadas, por lo cual anticuerpos IgE que se originan por la sensibilización a un determinado alérgeno luego unen o reconocen otro alérgeno u otra proteína, y son capaces de inducir un proceso inflamatorio. Consideramos que para la comprensión de este proceso es necesario *a priori* estudiar los sistemas alérgicos desde el punto de vista antigénico, y en este sentido la disponibilidad de distintos tipos de anticuerpos es de vital importancia, además de las proteínas o fragmentos de las mismas como se mencionó anteriormente. Una vez identificada la reactividad cruzada serológica es necesario identificar los **epitopes inmunodominantes** para comprender e interpretar desde el punto de vista molecular la relación entre ambos sistemas alérgicos. Pero contar con esta información no es suficiente para interpretar una reactividad cruzada clínica, ya que el simple hecho de la existencia de epitopes conservados o la existencia de IgE de reactividad cruzada, no es suficiente para que se induzca una enfermedad alérgica. Se requieren además, una serie de factores adicionales para que el reconocimiento cruzado de los alérgenos lleve a la instauración de un proceso inflamatorio en un órgano blanco. Por consiguiente, la comprensión de este fenómeno requiere de estudios en pacientes, lo cual muchas veces se ve limitado por cuestiones éticas y de disponibilidad de los mismos. En este sentido contar con **modelos animales** resulta crucial para poder avanzar en la comprensión biológica de la reactividad cruzada, aunque existen limitaciones en la extrapolación de los resultados al humano.

En este trabajo de tesis hemos abordado el estudio de la reactividad cruzada entre proteínas de soja y leche de vaca desde el punto de vista serológico y molecular, y hemos logrado resultados preliminares *in vivo* que permiten confirmar la existencia de una alérgenicidad cruzada. Consideramos que este trabajo aporta información que puede ser relevante para ampliar el alcance del conocimiento de la reactividad cruzada entre sistemas no relacionados filogenéticamente y puede brindar las bases moleculares para el planteo de futuras terapias inmunomodulatorias para la alergia alimentaria a leche de vaca.

## 5 DIAGNOSTICO DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS

El diagnóstico de la alergia alimentaria comienza con la investigación de la **historia** del paciente y el **examen clínico** del mismo. El objetivo en primera instancia es distinguir si la

reacción que presenta el paciente tiene una base inmunológica o no, ya que estas últimas al presentar características clínicas e historia diferentes a las IgE mediadas pueden erróneamente diagnosticarse como alergia alimentaria (Cianferoni and Spergel 2009; Eckman, Saini, and Hamilton 2009).

Si la alergia alimentaria mediada por IgE es diagnosticada/sospechada en base a la historia del paciente, entonces se realizan exámenes en la piel y a partir del suero para confirmar la presencia de anticuerpos IgE específicos para el alimento en cuestión, como se han descrito anteriormente para el diagnóstico de la ALV. En ciertos casos, puede requerirse un desafío o test de provocación, a modo de prueba definitiva o de referencia “gold standard” para la confirmación de las reacciones a alimentos mediadas por IgE.

Las **pruebas cutáneas (PC)** de hipersensibilidad Inmediata o “**skin prick test**” (SPTs) analizan la presencia de anticuerpos IgE específicos para proteínas alimentarias en mastocitos cutáneos. Son fáciles de realizar, seguras y de bajo costo, y sus resultados pueden obtenerse en minutos. Poseen excelente sensibilidad y una precisión predictiva negativa superior al 90%, mientras que son poco específicas y la precisión predictiva positiva es de aproximadamente 50-85% dependiendo del sistema. Es decir, que una PC negativa es un buen método para descartar una alergia alimentaria mediada por IgE, mientras que un resultado positivo no predice la reactividad clínica con precisión (Riccardo Asero et al. 2007).

Otra manera de detectar **anticuerpos IgE específicos** de proteínas alimentarias es por **métodos in vitro**. Existen varios sistemas de ensayo diferentes para medir anticuerpos IgE circulantes en sueros de individuos, que se emplean tanto para el diagnóstico como en investigación clínica de alergias alimentarias. Todos estos ensayos tienen en común un reactivo alergénico para el anticuerpo específico y un reactivo de unión a IgE (anticuerpo secundario conjugado), para la especificidad de isotipo. En el ensayo más frecuentemente empleado, ELISA, la muestra de suero o plasma se incuba con una fase sólida que posee el antígeno inmovilizado, el cual se une a los anticuerpos en forma específica. La IgE unida puede detectarse y cuantificarse con un anticuerpo específico para IgE marcado con una enzima. Se han desarrollado variantes donde los anticuerpos IgE del suero son capturados por otro anticuerpo anti-IgE inmovilizado en fase sólida, y luego la detección y cuantificación se realiza con un reactivo que posee el alérgeno marcado (ELISA de CAPTURA), o bien, los anticuerpos del suero se enfrentan en fase fluida con el alérgeno marcado, y luego se capturan los complejos antígeno-anticuerpo, detectándose la cantidad de complejos inmunes formados mediante un anticuerpo anti-IgE marcado. En todos los sistemas

comerciales comúnmente utilizados, basados en antígenos inmovilizados, se convierte los datos de densidad óptica generados por el ensayo en unidades de masa de IgE alérgeno-específica dada en Unidades Internacionales por ml de suero o plasma (UI/ml). (Riccardo Asero et al. 2007). Tal como ocurre con las PC, los valores predictivos de la cuantificación de IgE específica, varían con el alimento en estudio, la edad de los pacientes o la historia de reacciones previas. Se ha reportado que valores elevados de los niveles de IgE se correlacionan con una mayor probabilidad de manifestar reacciones clínicas, pero generalmente no guardan correlación con la gravedad de la reacción. Por otro lado, una disminución en la concentración de IgE específica se asocia con mayores chances de revertir la alergia (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009b).

Las **pruebas de desafío oral** son claves para confirmar la alergia alimentaria y la identidad del alimento causante de la alergia. Pueden realizarse en forma **abierta** (Open food Challenge), **simple-ciego** o **doble ciego (DBPC)**, en todos los casos controladas con un placebo. Todas estas pruebas de provocación deben realizarse en forma hospitalaria, por los riesgos que implica enfrentar al paciente con el alérgeno nocivo. A pesar de ser el test de referencia, algunas variables del ensayo aún no han sido estandarizadas: estado en que se administra el alimento (líquido o sólido), dosis mínimas y máximas (dependerán del paciente, resultados de la prueba cutánea, etc), matriz en la cual se administra el alimento, etc. Cuando el desafío ciego resulta negativo debe confirmarse administrando en forma abierta una porción de alimento en su forma natural para descartar un resultado falso negativo del desafío, esto ocurre aproximadamente en un 1% á 3% de los casos (Riccardo Asero et al. 2007; Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009b).

Para las **enfermedades no mediadas por IgE** las herramientas diagnósticas de laboratorio son muy limitadas, y en estos casos del desafío oral controlado es necesario para confirmar la alergia y la identidad del alimento alérgico (Cianferoni and Spergel 2009). En aquellos casos en que se justifique realizar biopsias duodenales o colónicas para descartar otras patologías, los análisis histológicos pueden arrojar información muy importante sobre las células presentes en la mucosa gastrointestinal (Mercer et al. 2009).

---

## 6 TRATAMIENTOS

Existen terapias exitosas con drogas antiinflamatorias o inmunoterapia subcutánea para el tratamiento de ciertas enfermedades alérgicas como el asma, rinitis alérgica o anafilaxia por venenos de insectos. Sin embargo en alergias alimentarias la inmunoterapia ha resultado ser poco eficiente. Actualmente, la terapia primaria para las alergias alimentarias consiste en **eliminar de la dieta el/los alimento/s causales**. Para ello, los pacientes y su entorno deben ser educados para evitarlos, prestando cuidadosa atención a los rótulos de los alimentos o a la composición de los alimentos adquiridos comercialmente, y evitando también el contacto con trazas de alimentos presentes en los utensilios empleados durante la preparación. En caso de una ingesta accidental y la anafilaxia, la terapia de emergencia consiste en la administración de epinefrina inyectable. Otros medicamentos pueden aliviar ciertos aspectos de las enfermedades inducidas por alimentos, por ejemplo, los anti-histamínicos que permiten eliminar los síntomas del síndrome de alergia oral y los signos cutáneos mediados por IgE, y las drogas anti-inflamatorias son útiles en la esofagitis eosinofílica o gastroenteritis. (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a; Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009b; Cianferoni and Spergel 2009)

Varias opciones dirigidas hacia el tratamiento de alergias alimentarias específicas **empleando alergen**os se encuentran en etapa de experimentación clínica y pre-clínica. La **inmunoterapia alérgico específica** tiene como objetivo alterar la respuesta alérgica a la proteína/s causal/es, evitando la inducción de una respuesta activa frente al alérgeno administrado. Lo que se busca es generar una respuesta inmune antígeno-específica mediada por linfocitos Treg encargadas de desarrollar **tolerancia**, o la inducción de una respuesta específica Th1, en lugar de una respuesta inmune Th2 (inmunomodulación). Se han estudiado distintas vías de administración, **subcutánea, oral y sublingual**, siendo estas dos últimas las más eficientes y seguras (Fabienne Rancé 2009).

La inmunoterapia subcutánea con alergen<sup>os</sup> se ha probado particularmente con maní y ha demostrado ser parcialmente efectiva y con elevado riesgo de efectos adversos (P A Eigenmann 2003; Fabienne Rancé 2009). La inmunoterapia por vía oral se basa en la exposición gradual a la proteína nativa en forma repetitiva en la mucosa oral y ha resultado efectiva en la no inducción de una respuesta alérgica aguda, simultáneamente con la inducción de los mecanismos de tolerancia oral. La terapia sublingual ha sido mayormente evaluada para el tratamiento de alergias respiratorias y hay pocos estudios en alergias alimentarias, pero con resultados prometedores. En cambio, existe una gran cantidad de

estudios sobre la inmunoterapia oral para alergias alimentarias, donde el alérgeno alimentario es ingerido en cantidades gradualmente crecientes durante meses. A pesar de que se han reportado varios estudios de inmunoterapia oral en pacientes, con resultados variables, claramente se necesita conocer más acerca de la seguridad, eficacia y mecanismos de este tipo de terapias (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a). Una alternativa para evitar los efectos adversos de la inmunoterapia consiste en emplear **proteínas modificadas** o **péptidos** en lugar del alérgeno natural, los cuales poseen la capacidad de estimular células T sin activar mastocitos (Rudolf Valenta and Niederberger 2007; Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a; Tanabe 2007).

Finalmente, se han propuesto vacunas de **DNA plasmídico** donde se inyecta el gen que codifica para el alérgeno, para su producción endógena. Inclusive en el vector de expresión se pueden incluir **secuencias no estimuladoras**, y de esta manera se evita la inducción de mecanismos Th2-dependientes. Estas estrategias sólo se han evaluado en modelos murinos y se encuentran en etapas muy tempranas de validación (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a; P A Eigenmann 2003).

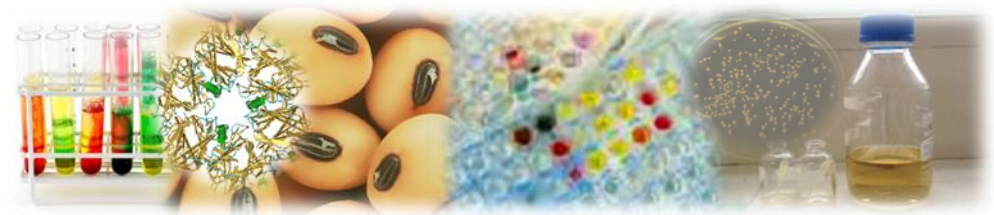
Las terapias que **no son alérgeno específicas** actúan sobre mediadores inmunes, anticuerpos IgE y citoquinas, para modular o interrumpir la respuesta alérgica. Los **anticuerpos anti-IgE**, anteriormente mencionados, se unen a la IgE impidiendo su unión al receptor de alta afinidad. En general las terapias que emplean **citoquinas y anticuerpos humanizados o quiméricos anti-citoquinas** actúan interrumpiendo las señales inflamatorias, y no han mostrado ser eficientes en estas enfermedades dado que modulan mecanismos del sistema inmune necesarios para la defensa frente a microorganismos. Además por las funciones pleiotrópicas de las citoquinas, es complicado evitar reacciones adversas durante el tratamiento. También se han estudiado en modelos animales **hierbas medicinales chinas** anti-alérgicas y distintos **inmunomoduladores** con resultados promisorios en alergia alimentaria a maní y leche de vaca (Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2009a; Cianferoni and Spergel 2009).

El conocimiento alcanzado sobre los mecanismos inmunes implicados en la patogénesis de las enfermedades alérgicas, gracias al desarrollo de nuevas técnicas y modelos animales, ha permitido plantear estas nuevas terapias. Sin embargo, como se ha mencionado, el único tratamiento eficazmente empleado actualmente es la eliminación del estímulo inmunológico, en otras palabras, la eliminación del alérgeno alimentario de la dieta.



# **Materiales y Métodos**

---



## 1 MATERIALES

### 1.1 Semillas y harina de soja

Se emplearon semillas maduras de soja de dos variedades: *Glycine max.* L. Merr variedad Asgrow (porotos de soja comercial) y *Glycine max.* L Merr. variedad Raiden (Dr Glenn R. Buss, Department of Crop and Soil Environmental Sciences, Virginia Tech, Blacksburg) y harina desgrasada comercial de (*Bunge Argentina o Brasil*) como fuentes proteicas de soja.

### 1.2 Proteínas de Leche Bovina

Se utilizó leche bovina descremada en polvo (*Svelty* o *Molico*, de Nestlé) para la preparación de las soluciones de PLV.

### 1.3 Oligonucleótidos

En la **Tabla 1** se presentan las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de globulinas de reserva de soja estudiados en este trabajo, a partir de una biblioteca de cDNA de semillas inmaduras de soja (S. Petruccelli, F.G. Chirido, and M.C. Añón 2005) y los empleados también para construir mutantes codificantes para regiones de interés.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos (primers) empleados para la amplificación de genes de soja a partir de la secuencia indicada, para la obtención de diversas globulinas de soja (Productos)

Primers	Secuencia (5'-3')	Número de acceso Secuencia blanco	Tamaño (bp)	Producto
F-A5A4B3-27	CCCGCTAGCATGAAGCTCAACGAGTGC	X86970 Gli dínina G4	1610	A <sub>5</sub> A <sub>4</sub> B <sub>3</sub> subunidad ma dura
R-A5A4B3	CCTGGATCCTTATGCGACTTTAACACGG			
5'α	CTAGTCTAGAGTATGATGAGAGCACGGTTCCC	X17698 Alfa beta congli dínina	1632	Subunidad α de β- congli dínina ma dura
3'α	CGCGGATCCTCAGTAAAAAGCCCTCAAATTG			
5'α-CT	CTAGTCTAGACATATGTAAACACTCGCATACCCGTT	X17698 Alfa beta congli dínina	728	α-CTD
3'α-CT	CGCGGGATCCTCACATTGTCTTTTCGAACCTGCAAG			
Fpep1y2	<b>CACC</b> CTGTTTAGTAGAGAGGAAG	X17698 Alfa beta congli dínina	436	Pépti dos 123
R pep1-2y3	TCATTGGCTCTATATTTCCGC			
Fpep1y2	<b>CACC</b> CTGTTTAGTAGAGAGGAAG	X17698 Alfa beta congli dínina	193	Pépti dos 1 y 2
Rpep1y2	TCACTTGTGGAGTAGATGGG			
F-pep3	<b>CACCAT</b> CTTCCTCAGTATTGTGG	X17698 Alfa beta congli dínina	193	Pépti do 3
R-pep12y3	TCATTGGCTCTATATTTCCGC			

### 1.4 Vectores empleados

En la **tabla 2** se presenta un listado de los vectores de donado y expresión empleados en este trabajo y se destacan alguna de sus características.

**Tabla 2.** Vectores empleados, aplicación y características.

Vector	Aplicación	Promotor	Tag	Tecnología	Resistencia
pBluescript SK (Stratagene, California, USA)	clonado	lac	ninguno	Selección por color	ampicilina
pCR®2.1-TOPO (Invitrogen Argentina S.A.)	clonado	lac	ninguno	TOPO Selección por color	ampicilina kanamicina
pENTR/D-TOPO (Invitrogen Argentina S.A)	Clonado direccional	-		TOPO Gateway	kanamicina
pENTR/TEV-TOPO (Invitrogen Argentina S.A)	Clonado direccional	-	Sitio de clivaje para la proteasa TEV	TOPO Gateway	kanamicina
pET 28a (Novagen, Wisconsin, USA),	expresión	T7 polimerasa	Tag de histidinas N y C Terminal, Sitio clivaje trombina	Tradicional	kanamicina
pET 200/D TOPO® (Invitrogen)	expresión	T7 polimerasa	Tag His-y sitio enteokinasa Nterminal	TOPO	kanamicina
pDEST-HisMBP (Addgene Inc, Cambridge, USA)	expresión	T7 polimerasa	Tag His-Maltosa binding protein Nterminal	Gateway	ampicilina

### 1.5 Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo y sus principales características se resumen en la **Tabla 3**.

### 1.6 Sueros específicos

Se emplearon antisueros policlonales obtenidos en conejos inmunizados con leche bovina o extracto de soja, obtenidos como se describió previamente por Rozenfeld et al (2002), y antisueros polidonaes obtenidos en cabras inmunizadas con leche bovina o soja. También se dispone de un antisuero policlonal obtenido en ratones, específico de distintas subunidades de  $\beta$ -conglucina (inmunización con fracciones purificadas a partir de un extracto de soja), previamente obtenido por la Dra. Petrucelli (S. Petrucelli, F.G. Chirido, and M.C. Añón 2005). En todos los casos se empleó adyuvante de Freund completo e

incompleto y se siguió el plan de inmunización analizando el título de anticuerpos específicos por ELISA indirecto sobre sangrías parciales.

**Tabla 3.** Cepas de *Escherichia coli* empleadas

Cepas	Genotipo/ Descripción	Aplicación	Promotor/ Inductor	Marcador de resistencia
DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44 λ- thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Clonado general, propagación de plásmido (no expresión)	-	-
DH10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr- hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 Δ(ara leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> <i>nupG λ-</i>	Clonado general, propagación de plásmido (no expresión).	-	-
TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr- hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139 Δ(ara leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Clonado general de plásmidos (No expresión)	-	-
DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1</i> Δ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB mrr</i> <i>hsdS20(rB-, mB-)</i> <i>supE44 ara-14 galK2</i> <i>lacY1 proA2</i> <i>rpsL20(SmR) xyl-5 λ-</i> <i>leu mtl1</i>	Contiene el alelo <i>gyrA462</i> que confiere resistencia al efecto tóxico del gen <i>ccdB</i> . huésped de propagación de vectores GATEWAY (contienen el gen <i>ccdB</i> )	-	cloranfenicol
BL21 (DE3)	deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>	Huésped de expresión general	T7 polimerasa Inducción IPTG	cromosomal
BL21 (DE3) pLysS	deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>	Huésped de expresión con alta represión de T7 polimerasa	Inducción IPTG	cromosomal
BL21 (DE3) CodonPlus	deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> ; contiene plasmidos codificantes para <i>argU, ileY, leuW</i> y <i>proL</i>	Huésped de expresión, permite expresión de genes codificantes para tRNAs de codones raros de arginina (AGA y AGG), isoleucina (AUA) leucina (CUA) y prolina (CCC)	T7 polimerasa Inducción IPTG	tetraciclina
BL21 (DE-) GROEL/ES	Chaperonas <i>groES- groEL</i>	Huésped de expresión con plegamiento mejorado	Inducción IPTG	cloranfenicol

### 1.7 Anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas

Se emplearon anticuerpos monoclonales específicos de α-caseína (1D5), β-caseína (2A1 y 4C3) y κ-caseína (3B5) obtenidos por el Dr Docena en nuestro laboratorio (Docena et

al. 2002) por hibridización de células somáticas de ratón según la técnica desarrollada por Galfrè y Milstein (Galfrè and Milstein 1981)

### 1.8 Sueros de pacientes

Se utilizaron muestras de suero humano de niños atópicos de edades entre 3 meses y 10 años (edad promedio: 4 años y medio), con diagnóstico de ALV basado en una historia clínica personal y familiar, la aparición de signos clínicos posteriores a la ingesta de leche bovina, la desaparición de los mismos frente a la supresión dietaria y pruebas complementarias. Los síntomas compatibles con una alergia alimentaria fueron vómitos, diarrea, dermatitis, broncoespasmo, urticaria, rinitis y anafilaxia. Como prueba complementaria *in vivo* se realizó prueba cutánea empleando lancetas metálicas por la técnica de Prick test, y extractos proteicos comerciales de leche de vaca o soja y otros alérgenos según la historia del paciente (dermatofagoides, lolium, Ambrosia, etc), además de los controles positivo y negativo, histamina y solución fisiológica respectivamente. Asimismo en todos los pacientes se cuantificó los niveles séricos de IgE total por ELISA de captura, e IgE específica para leche de vaca y soja por EAST y ELISA indirecto (ambos métodos desarrollados por el grupo y validados frente al Immuno CAP de GE). El diagnóstico fue realizado por los médicos alergistas e inmunólogos del hospital San Juan de Dios de La Plata (Servicio de Alergia) y Hospital de Niños Dr Ricardo Gutierrez de Capital Federal (Servicio de Inmunología). Además se indujeron muestras de individuos normales, sin historia clínica o reacciones asociadas a la ingesta de leche de vaca. En todos los casos se incluyó en la historia clínica información posible exposición a alimentos que contienen soja.

### 1.9 Péptidos sintéticos

A través de una colaboración con el Dr Luis Bruno Blanch de la la *Cátedra de Química Medicinal* (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), se sintetizaron péptidos con distintas secuencias aminoacídicas mediante síntesis química (*spot synthesis*) utilizando como soporte papel de celulosa (Whatman Chromatography Paper 3MM, Aldrich), aminoácidos (*Novabiochem*), distintos solventes y reactivos de calidad analítica (en el caso que fue necesario se procedió previamente a su purificación por destilación y se conservaron bajo atmósfera de nitrógeno y tamiz molecular previo a su uso). Las reacciones se condujeron de manera de obtener en cada *spot* (mancha) un único péptido. Las etapas sintéticas comunes

para todos los spots se llevaron a cabo empleando sucesivas reacciones de desprotección-acoplamiento según metodología Fmoc (Hilpert, Winkler, and Hancock 2007). Finalmente, el control de pureza y determinación estructural de los péptidos se realizó por HPLC-Masas y UV-MALDI-TOF.

A partir de secuencias aminoacídicas seleccionadas por estudios bioinformáticos se sintetizaron sobre una fase sólida de celulosa (*JPT Peptide Technologies GMBH, Berlín, Alemania*) una serie de péptidos en los que cada aminoácido fue reemplazado por una alanina a la vez ("scanning de alanina"). La longitud de cada péptido fue de 20 ó 21 aminoácidos por lo cual se sintetizaron 20 ó 21 péptidos, y en cada spot se une un único péptido con una determinada secuencia.

### 1.10 Animales

Se emplearon ratones BALB/c machos, de 5 semanas de edad para el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria, los que fueron agrupados en distintos lotes.

## 2 METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.1 Obtención de construcciones

**Subunidad A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>**: el gen de la glicinina A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> (número de acceso en el Gen Bank X86970) se amplificó a partir de una biblioteca de cDNA de semillas inmaduras de soja (*Glycine max* L. Merr.) empleando los oligonucleótidos indicados en la tabla 1, los cuales fueron diseñados para amplificar el gen codificante para A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> sin la secuencia correspondiente al péptido señal (27 aminoácidos), y para fusionarlo a una secuencia de seis residuos de Histidina en el extremo N-terminal. Los productos de PCR fueron cortados con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* en los sitios específicos e insertados en el plásmido de expresión pET 28a (*Novagen, WI, USA*) para obtener el plásmido **pETA<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>**.

**Subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -Conglicinina y fragmento  $\alpha$ -CTD**: ambas construcciones se obtuvieron como se describió previamente (S. Petruccelli, F.G. Chirido, and M.C. Añón 2005) a partir del cDNA completo con la secuencia codificante para la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (número de acceso al Gen Bank X17698) por PCR con oligonucleótidos específicos (indicados en la tabla 1) tales que permitieran obtener la secuencia completa o bien sólo la región entre los nucleótidos 920 y 1648 codificante para el polipéptido que

abarca los residuos 305-539 . Finalmente se introdujeron en vectores de expresión pET28a (Novagen) y se denominaron “pET-m $\alpha$ ” y “pET- $\alpha$ CTD”, respectivamente.

### **Fragmentos de la subunidad alfa de la beta conglucina**

A partir de pSK- $\alpha$  (S. Petruccelli, F.G. Chirido, and M.C. Añón 2005) se amplificaron tres fragmentos de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (Gen Bank X17698) por PCR con oligonucleótidos específicos (indicados en la tabla 1) correspondientes a las regiones denominadas: péptidos 1,2 y 3 (nucleótidos 1068- 1497, residuos de aminoácidos 356-499), péptidos 1 y 2 (nucleótidos 1068- 1254, residuos de aminoácidos 356-418) y péptido 3 (nucleótidos 1311- 1497, residuos de aminoácidos 437-499). Los primers contenían la secuencia CACC para permitir un clonado direccional en pENTR/D-TOPO o pENTR/TEV-TOPO (Invitrogen) y un codón de terminación de la traducción. La amplificación se realizó con Pfx (Invitrogen, Argentina S.A) y los productos de amplificación fueron clonados en pENTR/D-TOPO o pENTR/TEV-TOPO. Para construir los vectores de expresión se realizó la reacción LR empleando los vectores conteniendo estos péptidos y el vector de destino pDEST-HIS-MBP (Addgene Inc) siguiendo las condiciones de reacción recomendadas por *Invitrogen* (Invitrogen, Gateway Technology 2003). De esta manera se obtuvieron los vectores de expresión pDEST-HIS-MBP-Pep123, pDEST-HIS-MBP-Pep12 y pDEST-HIS-MBP-Pep3, que fusionan a los péptidos 1,2 (62 residuos de aminoácidos, 7kDa), 3 (62 residuos de aminoácidos, 7kDa) o pep123 (143 residuos de aminoácidos, 16,5kDa), en su región NH2 un Tag de 6 histidinas y la *Maltosa Binding Protein (MBP)* (43kDa).

## **2.2 Obtención de bacterias competentes**

\***Células competentes químicas empleando cloruro de calcio:** para la preparación de bacterias competentes se partió de un cultivo de bacterias de 2,5 ml en LB, el cual se había hecho crecer durante toda la noche a 37°C y agitación. Se realizó una dilución del mismo 1:200 en medio LB fresco (500 ml) y se incubó a 37°C y agitación aproximadamente 2 hs hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  0,5-0,6. Se centrifugó a 500 rpm por 5 min y se resuspendió en 125 ml de  $MgCl_2$  0,1M (estéril y enfriado a 4°C), dejándolo reposar por 5-10 minutos en baño de hielo. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendió en 100 ml de  $CaCl_2$  0,1M (estéril y enfriado a 4°C), dejándolo luego al menos 1 hora a 4°C. Finalmente, se centrifugó y resuspendió en 5 ml de  $CaCl_2$  0,1M-Glicerol 12%, para luego fraccionar de a 100  $\mu$ l en tubos estériles, emplear inmediatamente ó almacenar a -80°C.

**\* Células competentes químicas empleando cloruro de rubidio**

Se realizó un protocolo similar al anterior con algunas diferencias respecto de los buffers y medio de cultivo. Brevemente, A partir de un cultivo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:100 en medio fresco **PSI** y se creció a 37°C con agitación hasta alcanzar una  $DO_{550nm}$  0,48. Se colocó la suspensión bacteriana en hielo durante 15 minutos y luego de centrifugar, las células se resuspendieron en 0,4 volúmenes de buffer 100 mM en RbCl (**Tfbl**) y se enfriaron nuevamente en hielo (15 min). Se realizó una segunda centrifugación y se resuspendió el precipitado en 0,04 volúmenes de buffer 10 mM en RbCl (**TfbII**). Finalmente se enfrió en hielo (15 minutos), para luego fraccionar de a 100 µl en tubos estériles, emplear inmediatamente ó almacenar a -80°C.

**\* Células electrocompetentes:** a partir de un cultivo fresco en agar LB con el antibiótico correspondiente se inoculó con una colonia en 5 ml de LB bajo en sales (sin cloruro de sodio) y se incubó ON a 37°C. Luego se realizó una dilución 1:100 en LB bajo en sales (200 ml) y se creció a 37°C hasta llegar a DO 0.5 - 0.7. Se centrifugó el cultivo a 4°C, se resuspendió en 0.5 volúmenes de glicerol 10% estéril. Se centrifugó nuevamente a 4 °C y resuspendió en 0.1 Vol de glicerol 10% estéril. Se alicuotó en tubos eppendorf estériles en hielo para congelar de inmediato con nitrógeno líquido y guardar finalmente a -80°C.

**2.3 Transformación de las bacterias competentes**

**\* Transformación en bacterias competentes químicas:** para realizar la transformación por shock térmico en las cepas DH5α, TOP10, DB3.1, BL21 (DE3) y BL21 Codon Plus, se descongelaron lentamente en baño de hielo las células competentes, se adicionaron 25 ng de DNA (o 1 µl de plásmido obtenido por miniprep) a 100 µl de bacterias, y se dejó en hielo por 30 minutos. Luego se calentó durante 2 minutos a 42°C, y rápidamente se pasó al baño de hielo por 2 minutos más. A la mezcla de bacterias con el plásmido se le adicionó 1 ml de LB fresco a temperatura ambiente y se incubó a 37°C y agitación durante 1 hora. Luego se centrifugó el cultivo, se descartó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 100 µl del sobrenadante residual, que fueron seguidamente volcados sobre una placa de Agar-LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, y plaqueados con rastrillo de Drigalsky. Luego de incubar toda la noche a 37°C se pudieron obtener las colonias de bacterias transformadas.



\* ***Transformación en bacterias electrocompetentes:*** las bacterias competentes de las cepas BL21 pLysS y BL21 GROEL/ES se descongelaron lentamente en baño de hielo y se les adicionaron 0,75 -1 µl de DNA por cada 100 µl de bacterias. Se les dio un pulso eléctrico (5 a 5,2 msec, 25 microF, 2,5 kV y 200 ohms) con electroporador (*Bio Rad*) y rápidamente se les agregó 1 ml de LB fresco estéril. Se incubaron por 2 horas a 37°C con agitación y luego se plaqueó en agar LB como se describió previamente.

## 2.4 Amplificación y preparación de los plásmidos

Para la amplificación de todos los plásmidos mencionados, excepto el vector de destino pDEST-HIS-MBP, se emplearon las cepas *E.coli DH5α*, *DH10* o *TOP10*. El vector pDEST-HIS-MBP fue amplificado en la cepa **DB3.1™** que resiste el gen tóxico ccdB. Las cepas llevando los distintos plásmidos se crecieron cultivos líquidos en medio LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, a 37°C en agitación (200 rpm), durante 12 hs. Luego se centrifugaron (14.000 rpm) y del pellet bacteriano se realizó la purificación empleando el método de lisis alcalina (Sambrook et al. 1989) o mediante alguno de los kit comerciales de purificación de plasmidos “QIAprep Spin Plasmid Kit” (*Qiagen*), Promega Wizard Plásmid (Promega) o Illumina (*GE Healthcare*).

## 2.5 Expresión de los plásmidos

\* ***Cinética de expresión a baja escala:*** se realizó una inducción de las cepas transformadas en cultivos de pequeño volumen (10 ml) y a dos temperaturas de incubación diferentes, 26-28°C y 37°C, para determinar aquella condición que permitiera obtener mejores cantidades de proteína recombinante en fase soluble del cultivo. A partir de una colonia obtenida en cultivo fresco en agar- LB, se realizó un repique en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente: Kanamicina (50 µg/ml) en todos los casos por ser la resistencia que presenta pEt28a, para GROEL/ES también en presencia de Cloranfenicol 1X, y con Tetraciclina 1X para las BL21 Codon Plus. Se creció el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm) y luego se realizó una dilución 1:100 a partir del mismo en LB fresco y estéril suplementado con antibióticos. Se incubó a 37°C y agitación hasta alcanzar un valor de  $DO_{600nm}$  de 0,5-0,6, se tomó 1 ml de cultivo como muestra “No Inducida” (NI) y se agregó isopropil b-D-tiogalactopiranosido IPTG (0,2 mg/ml) para inducir la expresión del gen de interés. La incubación luego de agregar el inductor se realizó

paralelamente a dos temperaturas, 26-28°C y 37°C, y se fueron tomando muestras de 1 ml de cada cultivo a distintos tiempos durante dicha incubación: 2, 4, 6 horas, y overnight, cuando se dio por finalizado el cultivo.

EL análisis de las muestras obtenidas se realizó por SDS PAGE, para lo cual cada muestra de cultivo se centrifugó 5 min a 14.000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 200µl de buffer Tris-HCl 20 mM pH=8, con Urea 8M para las muestras de cultivo a 37°C, y se calentó a 90°C por 5 min. Finalmente se centrifugó en idénticas condiciones, y el sobrenadante se mezcló con Buffer Muestra en relación 3:1. Una muestra del cultivo sin inducir (NI) fue inducida como control.

**\*Cultivos en mayor escala:** una vez establecidos la cepa, tiempos y temperaturas óptimos de expresión de las proteínas, se realizaron cultivos de mayor volumen (200, 500 ó 1000 ml) con fines preparativos. Se procedió igual que para la cinética, partiendo de un cultivo fresco en medio sólido, del cual se repicó una colonia en medio líquido que se creció overnight a 37°C y agitación, y a partir del cual se realizó la dilución a un volumen mayor, y se creció a 37°C y agitación hasta la inducción con IPTG. En esta oportunidad, sólo se tomaron muestras NI y al finalizar el cultivo, para ver por SDS PAGE si hubo expresión. Las bacterias se cosecharon centrifugando el total del cultivo a 5000 rpm por 5-10 minutos (*Beckmann rotor JA-10*), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en Buffer de lisis a razón de 20 ml/litro de cultivo (*Buffer Lisis: Tris-HCl 20 mM pH=8, NaCl 500mM, Tritón 0,1%, Lisozima 0,5 mg/ml y urea 6M sólo para los cultivos a 37°C*). Se sonicó (*BRANSON Sonifier 250*) con 3 pulsos de 30 seg cada uno de 40-60 watts de potencia y centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm y 4°C (*Beckmann rotor JA 25.50*), tomando el sobrenadante como "Fracción Soluble (FS)" y el precipitado como "Fracción Insoluble (FI)".

## 2.6 Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las fracciones solubles se realizó en batch empleando una resina de Ni(II) (*Novagen,USA*) o bien en columnas con resina de Co(II) (*Pierce*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la purificación de las fracciones insolubles, se empleó la resina de Ni(II) en batch, pero adicionando a todos los buffers empleados (Binding, wash y elución) urea 6-8M, para solubilizar las proteínas recombinantes. La elución en este caso se realizó por gradiente de pH, es decir, la muestra se incorporó a la resina equilibrada en buffer binding a pH alcalino (pH=8) y fue eluída un pH ácido del buffer elución (pH=4,5). La purificación en columnas de Co(II) se realizó según un gradiente de Imidazol, desde la

resuspensión de la muestra en buffer binding (con Imidazol 20 mM) a la elución con una concentración de imidazol 150mM. Luego de ambas purificaciones las fracciones eluidas se dializaron para eliminar las elevadas concentraciones de urea o imidazol y renaturalizar las proteínas. Se tomaron muestras de cada fracción de la purificación para observar el perfil proteico por SDS PAGE.

### **3 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS PROTEICOS**

#### **3.1 Obtención de extractos proteicos de soja**

Para la preparación de los extractos proteicos crudos se trituraron las semillas con ayuda de un molinillo eléctrico y mortero, y se disolvieron en  $\text{NaHCO}_3$  0,01N a 90 °C (65 g de semillas molidas y 0,5 g de  $\text{NaHCO}_3$  en 365 ml de agua destilada). Luego se homogeneizó (homogeneizador Ultraturax UT 20.000) y al alcanzar la temperatura ambiente se centrifugó durante 20 minutos a 2500 xg a 20°C. Se tomó el sobrenadante y se realizó una nueva centrifugación a 14.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se procedió a la extracción de lípidos con cloroformo durante 8 horas a 4°C, utilizando una relación solución acuosa:cloroformo 2:1. Finalmente los extractos se dializaron contra agua bidestilada durante toda la noche utilizando una membrana de diálisis de 2kDa de punto de corte, y se almacenaron a -20°C.

A partir de la harina desgrasada de soja “convencional” se extrajeron proteínas con agua bidestilada. Se disolvieron 10mg/ml de harina en agua y se agitaron en forma continua a temperatura ambiente durante 4 hs. Luego se centrifugó durante 20 min a 14.000 rpm y se recolectó el sobrenadante que se denomina de aquí en más extracto acuoso de proteínas de soja.

#### **3.2 Obtención de extractos proteicos a partir de leche de vaca**

A partir de leche en polvo comercial desgrasada se preparó una solución 10 mg/ml en agua bidestilada. Se agitó hasta su disolución y luego se filtró. Se cuantificó la cantidad de proteínas totales según se describe más adelante y se prepararon extractos de distinta concentración según el método en que se fuera a emplear.

### 3.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales en los extractos crudos de soja, de leche de vaca y en las fracciones recombinantes purificadas se determinó por micrométodo de Bradford (Bradford 1976) ó mediante el método de ácido Bicinconínico (*Pierce BCA Protein Assay*), empleando seroalbúmina bovina como standard de proteínas para la curva de calibración en ambos casos.

### 3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

Las electroforesis SDS PAGE se realizaron en geles discontinuos de acrilamida según Laemmli (Laemmli 1970) en distintas condiciones según el extracto proteico. Para la caracterización de los extractos proteicos de ambas variedades de soja (C y R) se emplearon geles 12,5% de acrilamida con o sin urea 5M, y las muestras se prepararon en buffer muestra con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, para establecer condiciones reductoras y no reductoras respectivamente. También se analizaron ambos extractos en geles al 10% de acrilamida y sin el agregado de urea. En todos los casos se sembraron entre 10 y 20  $\mu$ g de proteínas por calle. Se emplearon geles 12,5% ó 15% de acrilamida (según el tamaño del producto de expresión) y en condiciones no reductoras para estudiar los extractos bacterianos empleados para la expresión de las proteínas recombinantes, y para estudiar las muestras obtenidas de las etapas de purificación de las distintas proteínas recombinantes.

Para la preparación de los geles y la electroforesis se emplearon los sistemas Miniprotean III® y Tetracell® de Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). Luego de la corrida electroforética (15 min a corriente constante de 30 mA y luego 1 hora a corriente de 50 mA) los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R250 durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. La decoloración se realizó con solución de metanol: ácido acético: agua, y las bandas se caracterizaron por comparación con las obtenidas a partir del patrón de pesos moleculares.

## 4 METODOS INMUNOQUIMICOS

### 4.1 Inmunoblotting y dot-blot

Para la caracterización de la antigenicidad y la alergenicidad *in vitro* de los distintos extractos proteicos y proteínas recombinantes, los componentes proteicos fueron separados

en función de su PM por SDS-PAGE, y luego fueron electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa (*Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH, USA*) según Towbin (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979) mediante el sistema comercial de *Bio-Rad*, o bien mediante un sistema semi-seco (*FAST-BLOT, Biometra Whatman tipo B43*) según las indicaciones del fabricante. Como control de transferencia se realizó una tinción con Rojo Ponceau. Luego se bloqueó con suero equino (SE) al 5% en PBS o con TBST (50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; Tween 0.1% pH 7.4) durante 1 hora a 37°C ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó la membrana bloqueada con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C: anticuerpos monodonaes específicos de caseínas bovinas (1:1.500), antisuero en conejo anti-PLV (1:1000), antisuero en ratón anti- $\alpha'$  de soja (1:1000), o antisuero en ratón anti-His (*Sigma*, 1:1000). Luego del lavado se incubó con el anticuerpo secundario apropiado diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C: suero de cabra biotinilado anti IgG de ratón (*Chemicon Int., Temecula, CA, USA*), anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulinas de conejo conjugado a biotina RG-16 (*Sigma-Aldrich, St Luis, MO, USA*), ambos 1:3000 y luego con avidina conjugada a fosfatasa alcalina (FAL) por 30 min (*Sigma Aldrich*, 1:4000); o bien con antisuero específico de inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa (HRP) (*BioRad*, 1:3000) durante 1 hora a 37°C. El revelado de las bandas en la membrana se realizó empleando distintos sustratos dependiendo de la enzima conjugada al anticuerpo secundario: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitro blue tetrazolium (5-BCIP/NBT) (*Biokit, S.A, Barcelona, España*) para fosfatasa alcalina, o cloronaftol (*ICN Biomedicals Inc.*) para HRP. Para incrementar la sensibilidad de la detección se realizó el revelado también por quimioluminiscencia empleando Luminol para HRP. Se expuso la membrana a placas de rayos X (*Kodak, New Haven, CT, USA*) y posteriormente se realizó el revelado empleando las soluciones comerciales de fijador/desarrollador clásicas.

Los distintos lavados de la membrana durante el inmunoblotting se realizaron con TBST 0,1% con agitación durante 3-5 min. Este procedimiento se repitió 3 veces por lavado.

\* **Inmunoblotting para IgE:** las condiciones para el inmunoblotting en los casos que el anticuerpo primario fueron los sueros de pacientes alérgicos o sueros control, fueron ligeramente diferentes a las anteriores. Las membranas bloqueadas se incubaron con una dilución  $\frac{1}{4}$  del suero humano en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, y luego se empleó como anticuerpo secundario una dilución 1:1000 de un anticuerpo específico de la cadena  $\epsilon$  humana conjugado a HRP (*Sigma-Aldrich*) durante 4 horas a 37°C. Para el revelado por quimioluminiscencia se empleó el sustrato comercial ECL Plus Western Blotting

Detection System (Amersham, General Electric GE). Luego se prosiguió como se describió anteriormente.

Para la técnica de **DOT BLOT**, se aplicó un cierto volumen (variando entre 1 y 10  $\mu$ l) del extracto proteico o de las proteínas purificadas sobre membranas de nitrocelulosa y se bloqueó de la misma manera que para el inmunobloting. El revelado de los dots se realizó según las variantes de combinación de anticuerpos primarios y secundarios como se describió anteriormente.

## 4.2 Inmunoensayos ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

### 4.2.1 ELISA indirecto

Se emplearon placas para microelisa o strips de plástico (*Maxisorp*®, *NUNC, Denmark*) con alta capacidad de pegado de proteínas por adsorción, las cuales fueron sensibilizadas con 1  $\mu$ g/100 $\mu$ l de distintos extractos proteicos (PLV, Soja C, soja R) o proteínas recombinantes purificadas ( $A_5A_4B_3$ , subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina,  $\alpha$ -CTD) en buffer de sensibilización (Carbonato/Bicarbonato pH=9) durante 1 hora a 37°C o toda la noche a 4°C. Luego del lavado se bloquearon con SE 5% v/v en SF durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se incubó durante 1 hora a 37°C con distintas diluciones del anticuerpo primario: antisuero en conejo específico de PLV, Luego se incubó con el anticuerpo secundario: antisuero específico de cadena  $\gamma$  de conejo conjugado a HRP (*Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA*, 1:4000). El revelado se realizó con o-fenilendiamina (OPD) y  $H_2O_2$  30% en buffer citrato-fosfato 0,1M pH=5,0, y luego de detener la reacción colorimétrica con  $H_2SO_4$  a los 15 minutos se midió la densidad óptica a 492 nm ( $DO_{492\text{ nm}}$ ) en un lector de placas de ELISA (*Sirio S SAECS, Radim Company, Italia*).

Al finalizar cada etapa del ELISA las placas fueron lavadas con solución de lavado (PBS - Tween 0,05%) durante 3 min con agitación y se repitió este procedimiento 3 veces por lavado.

### 4.2.2 ELISA indirecto para IgE

Para determinar la reactividad de las proteínas frente a anticuerpos IgE séricos, se realizó un ELISA indirecto sensibilizando las placas de ELISA con 1,25  $\mu$ g/fosa de PLV ó 0,05

$\mu\text{g}$ /fosa de proteínas de Soja (extractos C y R, o las proteínas recombinantes  $A_5A_4B_3$ ,  $\alpha$  o  $\alpha$ -CTD). Luego de bloquear en las mismas condiciones que los otros ELISA, se enfrentaron 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los sueros con cada uno de los antígenos y se incubaron toda la noche a 4°C. Luego se usó como anticuerpo secundario un anticuerpo monoclonal específico de la cadena  $\epsilon$  humana conjugado a FAL (*Sigma-Aldrich*) (diluido 1:2000 para PLV y 1:4000 para proteínas de soja en SE 3% v/v en SF) incubándose por 2 horas a 37°C. La reacción colorimétrica fue desarrollada con p-nitrofenilfosfato de sodio (PNPP) en buffer FAL pH=9,6 y detenida a los 20 minutos con EDTA 0,1M. Se determinó la  $DO_{405\text{nm}}$  en el lector de placas de ELISA. Los valores de corte o cut-off se determinaron estadísticamente analizando sueros control negativos (media  $\pm$  2DS).

#### 4.2.3 ELISA de Inhibición

Se sensibilizaron las placas para microelisa con 1 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{l}$  de PLV ó 0,1 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{l}$  de proteína recombinante pura, en las condiciones antes descriptas. Se bloquearon durante 2 horas en solución de SE 5% v/v en SF a 37°C.

En forma separada, el antisuero polidonal de conejo específico de PLV (diluido 1:200.000 ó 1:7000 en SE 3% v/v en SF) se pre-incubó a 37°C durante 2 horas con distintas diluciones de inhibidores solubles (PLV, Soja C, Soja R,  $A_5A_4B_3$ , subunidad  $\alpha$  recombinante,  $\alpha$ -CTD, BSA).

Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada una de estas pre-mezclas y se incubaron en las fosas sensibilizadas durante 30 min a 37°C. Luego se incubó con el anticuerpo secundario (antisuero específico de cadena  $\gamma$  de conejo conjugado a HRP -*Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA*, 1:4000) durante 1 hora a 37°C. Se reveló con OPD- $\text{H}_2\text{O}_2$  y se midió DO como se describió anteriormente.

Se calcularon los porcentajes de inhibición comparando cada condición de inhibición (concentración del inhibidor soluble) con la condición en la cual no se agrega inhibidor en la pre-mezcla.

## **5 METODOS COMPUTACIONALES Y ENSAYOS APLICADOS AL MAPEO DE EPITOPES**

### **5.1 Análisis bioinformático para la predicción de epitopes de reactividad cruzada**

Las secuencias de las subunidades  $\alpha$  (gi 121281),  $\alpha'$  (gi 15425631) y  $\beta$  (gi 21465631) de  $\beta$ -conglucina y de  $\alpha$ 1- (gi 30794348),  $\alpha$ 2- (gi 27806963),  $\beta$ - (gi 30794310) y  $\kappa$ - (gi 27881412) caseínas fueron obtenidas de la base de datos Genbank, y con ellas se efectuó la búsqueda de similitud secuencial entre las proteínas de ambos sistemas (alineamiento de secuencias por BLASTP- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y la predicción de epitopes utilizando las herramientas disponibles en la base de datos "Immune Epitope Database and Analysis Resource" : IEDB-<http://www.immuneepitope.org/browse.do?dispatch=loadSpeciesBrowser>. A los péptidos obtenidos en las predicciones se agregaron los epitopes, caracterizados experimentalmente y disponibles en la IEDB, y se construyó una base de datos que luego fue empleada para efectuar una simulación de la reactividad cruzada. La misma se llevó a cabo mediante el programa BLASTP, entre la base de péptidos y bases obtenidas a partir de ventanas solapadas con cada una de las secuencias antes mencionadas. Esta estrategia permitió seleccionar 3 péptidos como posibles candidatos a contener los epitopes responsables de la reactividad cruzada determinada experimentalmente. Finalmente, se realizó el modelado estructural de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina, con el programa Modeller en el webserver TITO ([http://bioserv.cbs.cnrs.fr/HTML\\_BIO/frame\\_tito.html](http://bioserv.cbs.cnrs.fr/HTML_BIO/frame_tito.html)), utilizando como molde la estructura cristalina de la subunidad  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina (1UIK). También se modeló el fragmento  $\alpha$ -CTD, y en muchos casos se localizó los péptidos seleccionados en su estructura.

Esta tarea se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Gustavo Parisi y la Lic. Virginia González (Unidad de Físicoquímica, Centro de Estudios e Investigaciones, Universidad Nacional de Quilmes).

### **5.2 Obtención y caracterización de péptidos recombinantes**

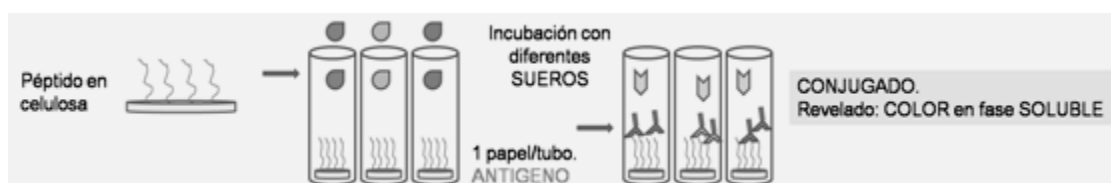
Teniendo en cuenta el reconocimiento de la secuencia de  $\alpha$ -CTD por los sueros y anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas, junto a los resultados computacionales de comparación de secuencia, se seleccionaron 3 péptidos de 20-21 aminoácidos que podrían ser los responsables de la reactividad cruzada observada, y por lo



tanto contener los epitopes inmunodominantes. Como se mencionó anteriormente se siguieron dos estrategias de síntesis de péptidos: la síntesis química sobre papeles de celulosa (punto I.9), y la síntesis como péptidos recombinantes fusionados a MBP (punto II.1). Se emplearon dos estrategias distintas de síntesis de péptidos para favorecer la formación de epitopes lineales (síntesis química en fase sólida) o conformacionales (síntesis en forma recombinante y soluble). La caracterización de ambos tipos de péptidos se realizó empleando las distintos inmunoensayos descriptos

### 5.3 Ensayos con péptidos sintéticos

La antigenicidad de los péptidos acoplados a los papeles de celulosa se evaluó mediante la aplicación de un ensayo EAST, como se indica en la figura 1. Para la optimización del ensayo se evaluaron distintas variables experimentales (solución de bloqueo, diluciones de los anticuerpos, tiempos de incubación, sistemas de revelado, etc). Como anticuerpos primarios se emplearon los antisueros polidionales en conejo específicos de PLV o soja, sueros obtenidos en conejo pre-inmune y solución de bloqueo (suero equino o TTBS), como controles negativos.



**Figura 1** Inmunoensayo con péptidos sintetizados en papel de celulosa.

### 5.4 Ensayo de scanning de alanina

Una vez identificados los péptidos que contienen los epitopes reactivos se procedió a identificar los residuos aminoacídicos críticos para la reactividad inmunoquímica de las proteínas de soja mediante la síntesis de distintos péptidos en los cuales cada aminoácido fue sustituido por una alanina. Cada uno de estos péptidos fue anclado a papeles de celulosa de manera de tener un único tipo de péptido por spot, y varios spots por membrana (21 ó 22 spots según sea P1, P2 o P3) (*JPT Peptide Technologies GMBH, Berlin, Alemania*). Las membranas se revelaron como se mencionó anteriormente con los distintos anticuerpos primarios y en este caso el revelado se realizó por quimioluminiscencia. Brevemente, las membranas se sumergieron en metanol por 5 min y luego se lavaron con TBS (3 lavados de 10 minutos cada uno). Se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación

en SE 3%v/v en TBST, y luego se incubaron con el anticuerpo primario diluido en SE 1%v/v en SF durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario correspondiente se incubó por 2 horas a 37°C, para luego realizar el revelado por quimioluminiscencia. Las membranas utilizadas se lavaron en TBS, luego con agua bi-destilada y se guardaron sumergidas en TBST a 4°C, para su posterior reutilización (o “stripping”).

### **6 ENSAYOS IN VIVO E IN VITRO EMPLEANDO UN MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA, PARA LA CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA REACTIVIDAD CRUZADA**

#### **6.1 Plan de sensibilización**

Se emplearon ratones machos de 5 semanas de edad de la cepa BALB/c para su sensibilización por vía intragástrica (ig). Mediante una sonda metálica se administró la solución del antígeno (PLV) en buffer bicarbonato pH 8 junto a toxina colérica (*Sigma*) como adyuvante mucosal. Dos horas antes de cada administración se les retiró el alimento y 30 minutos antes se les administró 200 µl de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 3 % pH 8 para disminuir la acidez estomacal.

El plan de sensibilización consistió en una administración semanal, durante 4-6 semanas según los niveles séricos de IgE específica a PLV. La semana siguiente se realizó el desafío oral con PLV y la semana posterior, con el extracto proteico de soja.

Los animales se agruparon en 2 lotes: animales sensibilizados (toxina colérica y PLV) y animales control (PLV ó toxina colérica).

#### **6.2 Evaluación de la aparición de signos clínicos post-desafío oral**

Luego del desafío oral con PLV o soja se observó la aparición de signos clínicos compatibles con una reacción alérgica tal como se presenta en humanos. En forma simple ciego y con distintos observadores se evaluó la aparición de signos clínicos en los 60 minutos posteriores a la administración del antígeno. Se asigna un determinado puntaje correspondiente a un score clínico que oscila entre 0 (sin signos clínicos) y 5 (muerte del animal) según la siguiente escala:

**0**= ausencia de signos clínicos

**1**= rascado de nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de la nariz, pabellón auricular y/o mucosa ocular

**2**= edematización alrededor de ojos y boca, pelo erizado, baja actividad general y/o baja actividad con aumento de la frecuencia respiratoria

**3**= respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola

**4**= inactividad posterior a un estímulo, convulsiones

**5**= muerte

Para cada animal y en cada ensayo se calculó un score final sumando los distintos puntos en caso que se observara más de un síntoma en forma simultánea o secuencial. Luego se calculó el valor promedio, y la desviación standard para cada lote de animales.

### **6.3 Pruebas *in vivo***

#### **6.3.1 Prueba de hipersensibilidad cutánea inmediata**

Un día antes de la prueba los ratones fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo. Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea en la zona afeitada, con 50 µl de una solución del antígeno en SF en un lado y control negativo (SF) del otro.

La cantidad de antígeno a utilizar se determinó previamente por titulación, encontrándose que para este modelo 4 mg/ml de PLV es la mínima concentración de antígeno que produce una reacción positiva (extravasación de colorante con edema) en la zona de inoculación en los animales sensibilizados.

Una vez realizada la inoculación por vía subcutánea, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 100 µl de azul de Evans al 0,25 % p/v en solución fisiológica, para visualizar la reacción inflamatoria. La concentración óptima del colorante también fue previamente determinada.

La reacción fue considerada positiva cuando se observó extravasación del colorante azul en la piel a simple vista en la zona de inoculación (mancha con diámetro mayor de 3 mm) Se consideró una reacción positiva y sistémica cuando la extravasación del colorante excedió los sitios donde se inoculó el antígeno.

## 6.4 Ensayos *in vitro*

### 6.4.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Se midieron los niveles séricos de distintos isotipos de anticuerpos específicos para proteínas de leche de vaca (PLV) o de proteínas de soja mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos desarrollados (ELISA indirecto), a partir de muestras de sangre extraídas del plexo retro-orbital de los animales de ambos lotes. Se optimizó la cantidad de antígeno con la que se sensibiliza la fase sólida y la concentración del anticuerpo secundario conjugado. Como controles negativos se emplearon sueros de animales no sensibilizados, o fosas sin sensibilizar, o se omitió el anticuerpo primario (suero de los animales en este caso).

#### \* *Determinación en suero de IgE por EAST*

##### **Activación de papeles con BrCN**

Se activaron papeles de celulosa como fase sólida para lo cual se sumergieron 20 g de discos de papel de filtro (*Whatman*) de 5 mm de diámetro en una solución conteniendo 20 g de BrCN en 500 ml de agua destilada, bajo campana. Se llevó a pH=10,5 con NaOH 1M. Luego se realizaron lavados sucesivos utilizando las siguientes soluciones: NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M, agua destilada, acetona 25 %, acetona 50 %, acetona 75 %, y acetona 100 %. Los discos de papel se secaron a Temperatura ambiente y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

##### **Serología para IgE**

Para la determinación de la IgE específica en el suero de los ratones, se emplearon los discos de papel activados con CNBr, los cuales fueron sensibilizados con los diferentes extractos proteicos a razón de 1,75 mg/ml de PLV o 0,5 mg/ml de proteínas de soja en buffer 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 8.5 según el método de Ceska (Ceska 1981)

Se incubaron los papeles con el extracto proteico durante toda la noche a temperatura ambiente, luego estos fueron lavados con buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 8.5) y bloqueados con una solución 0.05M de etanolamina durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Los papeles sensibilizados y bloqueados se guardaron en la heladera en PBS con azida sódica hasta su utilización.

Luego se incubó cada disco de celulosa sensibilizado y bloqueado, con 50 µl de suero de ratón sin diluir durante 16 hs a 4°C. Luego de realizar los lavados, los papeles se

incubaron con 50 µl del anticuerpo anti-IgE de ratón biotinilado (*BD Pharmigen*), llevado a una concentración de 2 µg/ml con diluyente (SE 3%v/v en SF), durante 5 horas a 4°C. Se lavaron los discos nuevamente y se incubaron con avidina conjugada a fosfatasa alcalina (*SIGMA*, 1:1000 en el mismo diluyente) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se agregó la solución de sustrato PNPP, deteniéndose la reacción 20 minutos más tarde con 100 µl de EDTA 0.1 M. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de placa (*Sirio SAECS, Radim Company, Italia*).

**\* Determinación en suero de IgG1 e, IgG2a por ELISA indirecto**

Se sensibilizaron placas de microelisa de poliestireno (*NUNC, Maxisorp*) con 1 µg/ fosa de PLV o de extracto proteico de soja diluidos en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 8.5), las cuales fueron posteriormente bloqueadas e incubadas con 100 µl de los sueros diluidos 1:200 en diluyente (1 hora a 37°C). Luego se incubó con el anticuerpo secundario obtenido en oveja específico, según el isotipo a determinar (*Dako*, 1:2000), durante 1 hora a 37°C. Finalmente se incubó con un suero obtenido en cabra anti-gammaglobulina de oveja conjugado a peroxidasa (*Jackson*, 1:10000) durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 100 µl de solución de sustrato/cromógeno para peroxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-OPD). Después de 15 minutos la reacción se detuvo con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la densidad óptica a 492 nm.

**6.4.2 Cuantificación de parámetros séricos relacionados con anafilaxia: dosaje de histamina**

Se determinaron los niveles plasmáticos de histamina utilizando un ELISA competitivo directo de origen comercial (*Veratox, de Neogen Corp.*).

Treinta minutos después del desafío oral, se recolectó sangre del plexo retro-orbital en tubos conteniendo 20 µl de heparina sódica (5000 U por ml, *Abbott*) diluida 1/5 en solución fisiológica. Para minimizar la degradación de la histamina las muestras se colocaron en baño de hielo inmediatamente después de la extracción, luego fueron centrifugadas a 850xg durante 10 minutos a 4°C, y luego se separó el plasma. Se conservó a -20°C hasta su análisis.

Se realizó el ensayo según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 100 µl de las muestras de plasma o de los controles (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm de histamina),

con 100  $\mu$ l del conjugado (Histamina conjugada con Horseradish Peroxidase). Se tomaron 100  $\mu$ l de la mezcla y se adicionaron a los pocillos sensibilizados con anticuerpo anti-histamina. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizaron los lavados, y se agregaron 100  $\mu$ l del sustrato/cromógeno ( $H_2O_2$ /TMB), y se detuvo la reacción a los 10 minutos. Se leyó densidad óptica a 620 nm en lector de microelisa. A partir de los valores de DO de los estándares, se construyó una curva de calibración DO<sub>620nm</sub> vs. concentración de histamina (ppm), que permitió calcular la concentración de histamina en las muestras analizadas, mediante la aplicación de la función matemática logit(p).

#### 6.4.3 Evaluación de la respuesta inmune celular: dosaje de citoquinas

Se evaluó la presencia de linfocitos T específicos del antígeno generados durante la sensibilización mediante ensayos de proliferación y secreción de citoquinas a partir de esplenocitos. Para tal fin se extrajo el bazo de los ratones del grupo control y del grupo de animales sensibilizados, el día posterior al desafío oral con PLV. El órgano extraído se colocó sobre una placa de Petri con 12 ml de medio GKN estéril y fue disgregado cuidadosamente con ayuda de una aguja. Se realizó el recuento de células presentes mediante el empleo del colorante vital Tripán blue, se centrifugó (5 min a 500xg) y resuspendió el pellet celular en medio de cultivo RPMI estéril suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y antibióticos (estreptomomicina, penicilina) a razón de  $8 \times 10^6$  células/ml.

El cultivo de esplenocitos se realizó en placas de cultivo celular de 48 fosas (*Cell Star*®, *GBO*), colocando 500  $\mu$ l de la suspensión celular ( $4 \times 10^6$  células/fosa) y 500  $\mu$ l de solución en RPMI de los siguientes estímulos antigénicos: PLV (2000  $\mu$ g/ml), extracto proteico de soja (400  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ -CTD recombinante (176  $\mu$ g/ml), y la subunidad  $\alpha$  recombinante (180  $\mu$ g/ml). Como controles del ensayo se empleó Concanavalina A (5  $\mu$ g/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo.

Luego de 72 hs de incubación a 37°C en atmósfera controlada se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos la presencia de citoquinas mediante el empleo de un ELISA de captura indirecto de origen comercial: interferón gamma (*Mouse IFN- $\gamma$  CytoSet™, BioSource, Invitrogen*) e Interleuquina-5 (*Mouse IL-5 CytoSet™, Invitrogen*). Se introdujeron algunas modificaciones técnicas al protocolo indicado

por el fabricante para optimizar el ensayo en función de las concentraciones de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los esplenocitos. Brevemente, se sensibilizaron las placas de ELISA (*NUNC, MaxiSorp*) con 100  $\mu$ l/fosa de una dilución 1/800 del anticuerpo de captura correspondiente a cada caso en buffer de sensibilización pH=9.0, durante toda la noche a 4°C. Luego se realizó el bloqueo con 300  $\mu$ l/fosa de “Buffer Assay” (pH=7.4) durante 1 hora a 37°C, y luego de los lavados correspondientes, se incubaron 100  $\mu$ l/fosa de sobrenadante de cultivo, además de las soluciones estándar para la curva de calibración (provistos por el kit), junto con 50  $\mu$ l/fosa del “anticuerpo de detección” (anti-ratón IFN- $\gamma$ -biotinilado 1/600 ó anti-ratón IL-5 biotinilado 1/2000), durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se realizó una incubación de 1 hora a 37°C con una dilución 1/1333 del reactivo Streptavidin-HRP (0,2 mg/ml). Se empleó OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y luego de detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N se midió densidad óptica a 492 nm. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se calculó a partir de la curva de calibración construída con los estándares (DO<sub>492nm</sub> vs. Concentración de citoquinas en pg/ml).

## Capítulo 1

# Evaluación de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja

---





## 1.1 INTRODUCCION

La percepción de la ocurrencia de una **alergia a leche de vaca** es mayor que la ALV confirmada. En la literatura pueden hallarse valores para chicos en edad pre-escolar de 1-17.5 %, de 1-13.5 % para edades entre 5 y 16 años y de 1 á 4% en adultos. Sin embargo cuando se realiza el diagnóstico, incluyendo la prueba de desafío oral con placebo, los valores se sitúan entre 0.5 y 2 % para pre-escolares, 0.5-1% para 5 á 16 años y menor al 0.5 % para adultos (F Rancé, Grandmottet, and Grandjean 2005; Rona et al. 2007). Estos datos significan que entre 10 y 25 millones de pacientes en Europa tienen alergia alimentaria, con una progresión creciente acorde al aumento demográfico sostenido que se ha observado en los últimos años. Estos datos en conjunto plantean que esta patología constituye un importante problema sanitario a enfrentar. La situación es aún más grave si se considera que en los últimos 10 años sólo existen 5 trabajos de seguimiento durante aproximadamente un año en los cuales se determina la prevalencia empleando DBPFCF para confirmar la alergia alimentaria, por lo cual la situación podría ser aún más complicada dado que estos estudios están limitados a países del norte de Europa, Inglaterra y España (Arne Høst et al. 2002; Kvenshagen, Halvorsen, and Morten Jacobsen 2008; Venter et al. 2006; Marklund, Staffan Ahlstedt, and Nordström 2004; K M Saarinen et al. 1999). Sin embargo en los últimos años se han lanzado programas multidisciplinarios conformados por varios países y numerosos grupos para establecer datos de prevalencia de alergias alimentarias (EuroPrevall Project/2005 [www.euoprevall.org](http://www.euoprevall.org)).

Se ha descrito que los signos clínicos más frecuentes son los intestinales (32-60 % de los casos), cutáneos (5-90%) y anafilaxia (0.8-9%), siendo este último el más grave y preocupante, ya que el maní y la leche son la principal causa de reacciones fatales en pacientes con alergia alimentaria (Macdougall, Cant, and Colver 2002). Las proteínas de la leche de bovina constituyen junto a las del huevo los alérgenos alimentarios más frecuentes, aunque nuevamente estos estudios se han realizado en un número limitado de países. Esta patología se presenta principalmente en la primera infancia y puede ser un reflejo de factores asociados con hábitos dietarios de la población, forma de preparación de los alimentos, carácter inmunogénico de sus componentes, resistencia de los alérgenos al procesamiento físico y químico durante el procesamiento industrial, resistencia a la digestión en el tracto gastrointestinal, etc. Por estas razones para obtener hidrolizados hipoalérgicos aptos para emplear durante el tratamiento sustitutivo se debe recurrir a métodos de

procesamiento intensos: hidrólisis enzimática intensa seguida de tratamientos físicos (altas temperaturas, altas presiones, ultrafiltración, etc) o a combinaciones de los mismos para lograr alterar los distintos epitopes lineales y conformacionales. Este tipo de hidrolizados junto a las fórmulas individuales de aminoácidos son ampliamente utilizadas ya que han resultado ser las más efectivas en distintos estudios. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, por diversas razones se debe recurrir a otro tipo de sustitutos lácteos y las fórmulas a base de proteínas de soja son frecuentemente empleadas luego de los 6 meses de edad (Walker-Smith 2003; A Høst and S Halcken 2004). Sin embargo, existen controversias sobre su uso dado que se ha observado que los pacientes desarrollan una intolerancia dínica a las mismas durante el tratamiento.

En este trabajo nos interesa caracterizar a las proteínas de soja que son empleadas en las fórmulas sustitutas, dado que estudios previos de nuestro grupo confirmaron que no existe contaminación cruzada con proteínas de leche de vaca y que existen proteínas de reactividad cruzada. Como se ha mencionado previamente dos o más alérgenos presentan reactividad cruzada si los anticuerpos IgE o los receptores de células T específicos son capaces de interactuar con ellos indistintamente (F Ferreira et al. 2004).

Las **caseínas** se han identificado y caracterizado como los principales alérgenos de la leche bovina (Spuerger et al. 1997; Docena et al. 1996), mientras que en la soja se han caracterizado al menos 21 proteínas alérgicas (Shannon Wilson, Blaschek, and de Mejia 2005) con capacidad de unir anticuerpos IgE y provocar reacciones digestivas y respiratorias. Estos alérgenos pertenecen a distintas familias proteicas, siendo los principales alérgenos las proteínas P34 (*Gly m Bd 30K*), *Gly m Bd 68K* y la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina 7S de soja (*Gly m 5*) en poblaciones americanas y japonesas (Mittag et al. 2004). Nuestro grupo ha identificado a la **glicinina G4 (subunidad A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>)** como la proteína de soja que comparte epitopes IgE con caseínas bovinas y por lo tanto, la responsable de la reactividad alérgica observada *in vitro* (Rozenfeld et al. 2002).

Por lo tanto, considerando que la intolerancia dínica a las proteínas de soja durante el tratamiento sustitutivo podría deberse a la existencia de la glicinina G4, que muestra reactividad cruzada con caseínas bovinas, decidimos ***estudiar la reactividad inmunoquímica de esta glicinina frente a distintos anticuerpos específicos anti-proteínas de leche de vaca.***

### **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

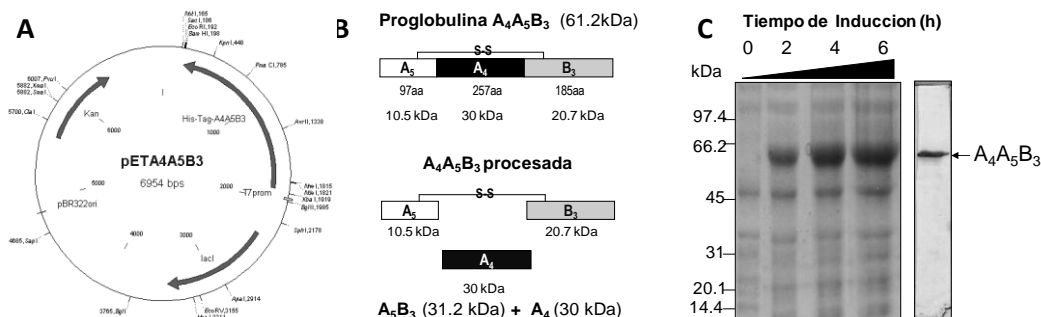
- Clonar el gen codificante para glicinina G4 (Gly m 6.0401) de soja, expresarlo en *E.coli*, purificarlo y evaluar su reactividad inmunoquímica *in vitro*.
- Caracterizar inmunoquímicamente las proteínas de soja de la variedad Raiden (*Glycine max.* L. Merr var. Raiden), que naturalmente no poseen el gen codificante para glicinina G4, para evaluar su utilización como posible sustituto lácteo hipoalergénico en pacientes con ALV IgE mediada.

**1.3 RESULTADOS**

**\* Expresión e Inmunorreactividad de la glicinina de soja  $A_5A_4B_3$  recombinante**

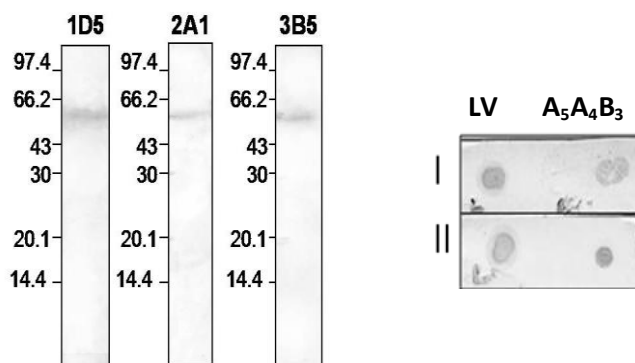
Las caseínas son los principales componentes alérgicos de la LV. Están constituidas por cuatro proteínas mayoritarias:  $\alpha_1$  (40%),  $\alpha_2$  (10%),  $\beta$  (40%) y  $\kappa$  (10%). Empleando anticuerpos monoclonales específicos para  $\alpha$  (1D5),  $\beta$  (2A1) y  $\kappa$ -caseínas bovinas (3B5), y un antisuero policlonal específico contra PLV, se identificó una fracción de 30 kDa en soja con reactividad cruzada *in vitro*, que luego de ser aislada por electroelución y secuenciarla, fue identificada como  $A_5$ - $B_3$ , que forma parte de la subunidad pro-glicinina G4(Rozenfeld et al. 2002). El gen codificante para la subunidad  $A_5A_4B_3$  se donó y se expresó en *E. coli* por medio del vector de expresión que se muestra en la **figura 1A**. Dado que *E. coli* es incapaz de realizar las modificaciones post-traduccionales que ocurren en las semillas de soja en desarrollo, la proteína recombinante  $A_5A_4B_3$  se obtuvo en una forma no procesada de 60 kDa, conocida como *pro-globulina*. En la **figura 1B** se muestra esquemáticamente la estructura de  $A_5A_4B_3$  en sus dos formas, observándose que la globulina procesada presenta los polipéptidos  $A_5B_3$  unidos por un puente disulfuro, mientras que el polipéptido  $A_4$  se integra a la estructura de la subunidad a través de uniones conformacionales no covalentes.

La pro-glicinina se expresó en *E. coli*. Como se observa en la **figura 1C**, el perfil de proteínas obtenido por SDS PAGE a partir del extracto de *E. coli* muestra claramente el incremento en la intensidad de la banda de aproximadamente 60 kDa a medida que transcurre el tiempo luego de la inducción. Esta fracción proteica mostró reactividad por inmunobloting con un anticuerpo monoclonal específico anti-histidina, confirmando la presencia de la proteína recombinante (**figura 1C**).



**Figura 1. A) Vector de expresión de la subunidad  $A_4A_5B_3$ .** El cDNA sin péptido señal (27 residuos aminoácidos) se fusionó a una secuencia de 6 histidinas, un sitio trombina y tag T7 en su extremo 5'. **B) Esquema de la subunidad  $A_5A_4B_3$  con y sin el procesamiento que ocurre en la semilla.** **C) SDS- PAGE, 10% en condiciones reductoras del extracto total de células *E.coli* BL21 portadoras del plásmido pET  $A_5A_4B_3$  antes de la inducción (tiempo 0) y a distintos tiempos post inducción con IPTG (2, 4 y 6 hs, respectivamente). Confirmación de la expresión de  $A_5A_4B_3$  recombinante por inmunobloting del extracto de *E.coli* a 6 horas de la inducción con un anticuerpo monoclonal anti-His, revelado con clonaftol.**

La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad empleando una resina de Ni(II), utilizándose en distintos inmunoensayos para su caracterización. La reactividad cruzada se confirmó *in vitro* por inmunobloting con los anticuerpos monoclonales específicos contra caseínas bovinas (**Figura 2A**), y por unión a IgE específica por dot blot empleando pools de sueros de individuos diagnosticados con ALV (**Fig. 2B**).

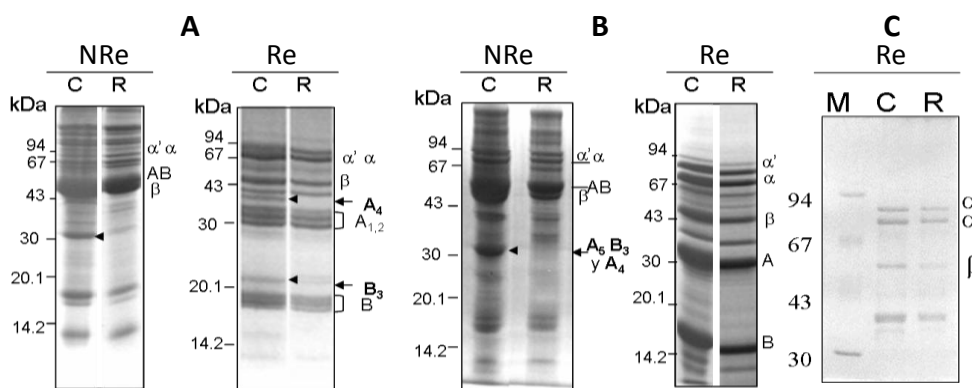


**Figura 2. A) Inmunobloting de A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> recombinante purificada** con anticuerpos monoclonales obtenidos en ratón contra  $\alpha$ -caseína (1D5),  $\beta$ -caseína (2A1) y  $\kappa$ -caseína (3B5), los pesos moleculares relativos se indican a la izquierda en kDa  
**B) DOT BLOT de A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>** con IgE específica sérica contra leche de vaca LV: Extracto proteico de leche de vaca; "I y II" corresponden a distintos pools de sueros IgE positivos para LV.

**\* Comparación de la reactividad inmunoquímica de extractos proteicos de dos variedades de soja por inmunobloting**

Dada la reactividad cruzada inmunoquímica previamente caracterizada entre soja y leche de vaca, y la intolerancia a fórmulas a base de soja observada en pacientes alérgicos a leche de vaca no sensibilizados a proteínas de soja, consideramos que una variedad de soja que no exprese A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> entre sus componente de reserva podría constituir un potencial sustituto lácteo a emplear en el tratamiento. Dado que la soja Raiden (*Glycine max. L. Merr* var. Raiden) naturalmente no expresa A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> (Guo Yan Zhang et al. 2002), decidimos preparar extractos proteicos a partir de semillas de esta variedad y estudiar su reactividad inmunoquímica. Los extractos proteicos de ambas variedades, denominadas de ahora en más "convencional" y "Raiden" (C y R, respectivamente), se analizaron aplicando diferentes condiciones electroforéticas, de manera de obtener perfiles proteicos diferenciales que permitan, también por inmunobloting, identificar los componentes individuales. Como se observa en la **figura 3A**, en presencia de urea 5M y en condiciones no reductoras ("NRe") ambos extractos mostraron un perfil muy similar. Sin embargo, la diferencia entre estas variedades se manifiesta por la ausencia del polipéptido A<sub>4</sub> en la variedad Raiden cuando la separación electroforética se realiza en un gel conteniendo urea 5M y en condiciones

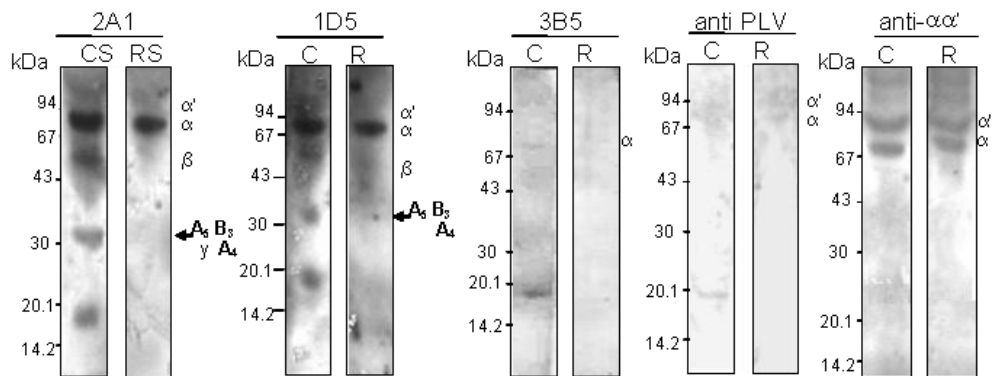
reductoras (**Figura 3, Panel A “Re”**). En geles de poliacrilamida 12, 5 % preparados sin urea y muestras sin tratamiento reductor (**Figura 3, Panel B “NRe”**) se pudo detectar una banda de 30 kDa presente sólo en la variedad Convencional, por lo que esta condición también permite distinguir estas variedades de poroto de soja. En cambio si el gel no posee urea y se realiza en condiciones reductoras (**Figura 3B “Re”**), ambas variedades presentan el mismo perfil electroforético. En geles de poliacrilamida 10% en ausencia de urea observamos que las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina se pueden separar (**Figura 3 Panel C**) en cambio en presencia de urea tienen la misma movilidad electroforética (**Figura 3, Panel A**).



**Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de soja convencional (C) y Raiden (R).** Geles 12,5% en poliacrilamida (A y B) y 10 % (C) se prepararon con urea 5M (A) o sin urea 5M (B y C). NRe y Re indican condiciones no reductoras y reductoras ( $\beta$ -mercaptoetanol 5%) respectivamente.  $\alpha'$   $\alpha$  y  $\beta$  indican las subunidades de  $\beta$ -conglucina (globulina 7S). AB, A y B corresponden a las subunidades AB, polipéptidos ácidos y básicos de glicirina (globulina 11S) respectivamente. Se indican con flechas las diferencias en la composición de subunidades entre ambas variedades de soja. Los patrones de masa molecular (M) se indican a la izquierda en kDa.

En base a estos resultados se decidió estudiar la reactividad cruzada entre los extractos C y R con los de proteínas de LV por inmunobloting empleando geles de poliacrilamida preparados sin urea y muestras sin tratamiento reductor. Para el revelado de los inmunobloting se emplearon anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas y un suero polidonal específico de PLV obtenido en conejo. Como puede observarse en la **figura 4** el anticuerpo monoclonal específico de  $\beta$ -caseína (2A1) reconoció cuatro proteínas (18, 31, 55 y 70 kDa) en el extracto C, y sólo una de 70 kDa en el extracto R. Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo monodonal específico de  $\alpha$  caseína (1D5), mientras que el anticuerpo monodonal específico de  $\kappa$ -caseína (3B5) y el antisuero específico de PLV reconocieron principalmente el componente de 18 kDa del extracto C. Cuando los extractos C y R se revelaron con un suero policlonal obtenido en ratón específico para las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina de soja, se pudieron detectar dos bandas en la región de 70 kDa. La

de menor tamaño de ellas, correspondiente a la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina, fue idéntica a la reconocida por los anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas (**Figura 4**).



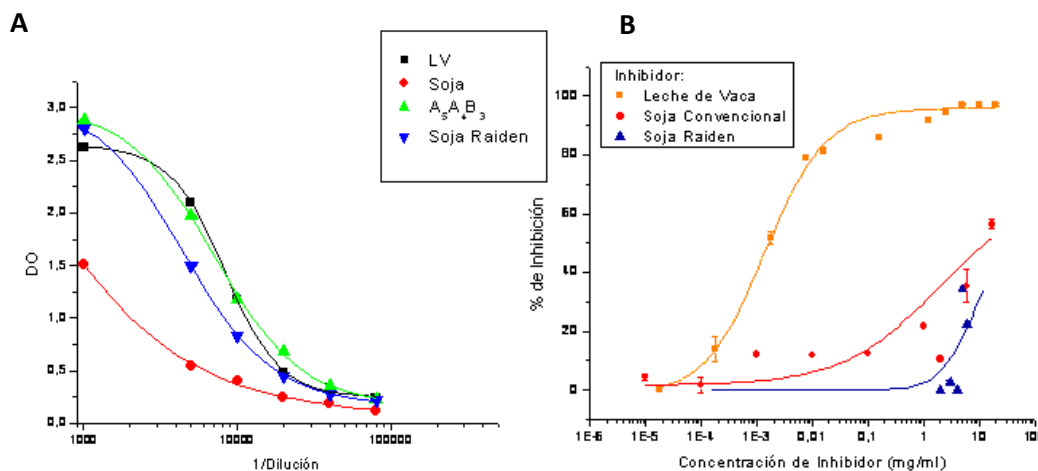
**Figura 4. Inmunobloting** de los extractos de soja Convencional y Raiden. (C y R) con anticuerpos monoclonales de ratón específicos de  $\beta$ -caseína (2A1),  $\alpha$ -caseína (1D5) y  $\kappa$ -caseína (3B5), con un antisuero policlonal específico para PLV obtenido en conejo, ó con un antisuero de ratón anti subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina. La cantidad de proteínas por calle fue de 10-20  $\mu$ g.

**\* Comparación de la reactividad inmunoquímica de extractos proteicos de dos variedades de soja por ELISA**

Se analizó la reactividad de los extractos proteicos de ambas variedades de soja, y de la fracción de  $A_5A_4B_3$ , por ELISA *indirecto* y de *inhibición*. En la **figura 5** se muestran los resultados hallados por ELISA empleando el suero policlonal específico de PLV obtenido en conejo. En el ensayo de ELISA indirecto, como se describió en Materiales y Métodos, la concentración de proteínas empleada para sensibilizar las microplacas fue idéntica para todos los antígenos (1 $\mu$ g/100 $\mu$ l). Como puede observarse en la **figura 5A** el extracto de soja R fue reconocido por el antisuero, al igual que la variedad C que es cualitativamente más rica en componentes de reactividad cruzada por poseer  $A_5A_4B_3$ . La respuesta observada para esta glicina pura en el ensayo indirecto, equivalente a la de un extracto proteico de LV, confirmó la reactividad *in vitro* de  $A_5A_4B_3$  frente a anticuerpos específicos de LV previamente observada por inmunobloting.

El ELISA de inhibición demostró además que tanto la soja C como la R son capaces de inhibir la unión de anticuerpos específicos de PLV a su antígeno de identidad (PLV) inmovilizado en la fase sólida (**Figura 5B**). El extracto C empleado como inhibidor soluble en una concentración de 10 mg/ml permitió obtener un 50 % de inhibición (IC50) de unión de los anticuerpos a PLV. Como puede observarse, el IC50<sub>extracto C</sub> fue diez mil veces superior al IC50<sub>PLV</sub>, mientras que el IC50<sub>extracto R</sub> fue mayor que IC50<sub>PLV</sub>. Por lo tanto se requieren mayores

cantidades de las dos variedades de soja con respecto a PLV para desplazar la unión de los anticuerpos al antígeno de identidad inmovilizado en la fase sólida, y a su vez mayor cantidad de proteínas de la variedad R que de C. Esto indica por un lado que de la totalidad de anticuerpos específicos de LV presentes en el suero, existe una fracción que reconocen específicamente en forma cruzada proteínas de soja, y por otro, que la proteína  $A_5A_4B_3$  es uno de los componentes involucrados en tal reconocimiento, pues se necesitaron mayores cantidades de la variedad R para observar el mismo efecto que con la variedad C.

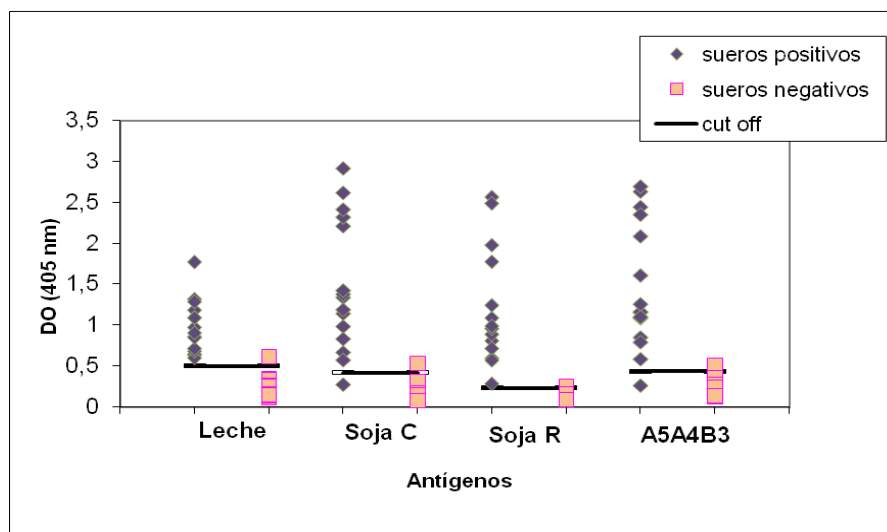


**Figura 5. A) ELISA indirecto** realizado con suero de conejo policlonal contra PLV frente a distintos antígenos en fase sólida: Leche de vaca (LV), Soja Convencional (Soja),  $A_5A_4B_3$  recombinante y Soja Raiden. **B) ELISA de INHIBICIÓN.** La unión del suero policlonal de conejo anti PLV (dilución 1:200.000) al antígeno de identidad en fase sólida ( $1\mu\text{g}/\text{fosa}$ ) (PLV) es inhibida por concentraciones crecientes de inhibidor (LV, Soja C y Soja R) en fase soluble.

Si bien existen diferencias cualitativas en la composición de ambas variedades de soja, éstas no se vieron reflejadas en el ensayo de ELISA indirecto (Figura 5A) pero sí se observaron en un ensayo más específico como el de inhibición (Figura 5B) donde la interacción Ag-Ac se produce en fase soluble.

Finalmente, se caracterizó por ELISA indirecto la capacidad de unión de anticuerpos IgE provenientes de sueros de pacientes alérgicos a PLV (y no sensibilizados a proteínas de soja según historia clínica), a proteínas de los extractos de soja obtenidos y a  $A_5A_4B_3$  recombinante. De los resultados mostrados en la **figura 6** se puede concluir que anticuerpos IgE específicos de PLV son capaces de unir a los distintos componentes de soja presentes en C y R, y a  $A_5A_4B_3$ .





**Figura 6. ELISA indirecto para IgE sérica.** Antígenos inmovilizados: Leche de Vaca ( $1\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ ), extractos de soja Convencional "C" y Raiden "R", y  $A_5A_4B_3$  recombinante ( $0,05\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ ). "Sueros positivos": sueros de individuos con ALV, "sueros negativos": sueros de individuos control sin ALV. Cut-off: valor de corte de cada ensayo.

Todos los sueros evaluados reconocieron componentes presentes en la variedad Raiden (15/15), mientras que el 93,3% de los sueros se unieron a la soja convencional y a  $A_5A_4B_3$  (14/15). Sólo uno de los sueros con bajo nivel de anticuerpos IgE específicos para PLV (clase 1) no reconoció ninguno de los componentes proteicos de soja empleados.

## **1.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES**

En esta primera etapa se estudió la reactividad inmunoquímica *in vitro* de la glicinina de soja G4 (A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>), previamente descrita como componente de reactividad cruzada con PLV, y de los extractos proteicos obtenidos de las variedades de soja Raiden, que naturalmente no expresa dicha proteína de reserva, y Asgrow o soja convencional.

El gen codificante para la glicinina G4 de soja logró clonarse y expresarse en *E.coli* BL21. La proteína recombinante purificada mostró reactividad cruzada *in vitro* frente a diversos anticuerpos específicos anti- PLV: anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas (por inmunobloting), sueros de pacientes con ALV que contenían IgE específica (por dot-blot y por ELISA indirecto) e IgG específica de PLV de un antisuero obtenido en conejo inmunizado con PLV (por ELISA indirecto y de inhibición). Estos resultados obtenidos con la glicinina A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> recombinante corroboraron la reactividad cruzada descrita previamente para la forma natural obtenida a partir de un extracto de soja por electroelución (Rozenfeld et al. 2002). Además estos resultados demuestran que los hidratos de carbono no están implicados en la reactividad cruzada.

Luego se procedió a la caracterización del extracto proteico obtenido a partir de semillas de soja de la variedad Raiden. Comparándolo por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y en presencia de urea con la variedad convencional, se demostró que el perfil proteico de la variedad Raiden, no posee la glicinina G4 (A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>) en su composición. La reactividad inmunoquímica de ambos extractos se ensayó mediante inmunobloting y ELISA indirecto y de inhibición. Claramente se pudo observar que tanto la variedad C como R presentan componentes proteicos que son reconocidos por anticuerpos específicos contra PLV. Además, el extracto de soja R a pesar de poseer menor cantidad de componentes de reactividad cruzada que la variedad C, contiene una proteína de 70 kDa de reactividad cruzada, dado que fue reconocida por dos de los anticuerpos monoclonales específicos para caseínas bovinas. Consideramos en un principio, en base al PM relativo de la banda, que se trataba de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina (Gly m 5.0101). Este componente ha sido descrito por otros grupos como un alérgeno relevante de la soja (T Ogawa et al. 1995).

Por otro lado, se han observado algunas diferencias inmunoquímicas entre ambas variedades de soja. El ELISA indirecto empleando un suero de conejo específico de PLV mostró que el título de anticuerpos es mayor para la variedad C que para R, mientras que en el ELISA de inhibición se aprecia que las curvas de inhibición correspondientes a los extractos C y R no son paralelas entre sí, siendo la IC50 de R mayor que la correspondiente a la variedad C. Estos resultados indican por un lado, en base a la forma de la curva de inhibición que se trata de un reconocimiento específico de los anticuerpos por componentes antigénicos de la soja, y que distintas poblaciones de anticuerpos, con diferentes especificidades y afinidades estarían reconociendo los distintos componentes de reactividad cruzada en ambas variedades de soja. Finalmente, la reactividad frente a anticuerpos IgE específicos de LV de ambas variedades por ELISA indirecto, también demostró menor reactividad de la variedad R, posiblemente debido a la ausencia de la glicinina G4. Por lo tanto el reconocimiento de la variedad R por parte de estos anticuerpos se debería a la presencia de otros componentes de reactividad cruzada, tal como se evidenció por inmunoblotting.

Dado que la soja es uno de los granos más importantes cultivados a nivel mundial, se han realizado muchos avances y aportes para mejorar la calidad nutricional de la soja, así como también aumentar la resistencia a los pesticidas mediante diversas modificaciones genéticas. Esto ha determinado que existan diversos genotipos de soja cultivables (*Glycine max.*) con diferencias en sus perfiles proteicos, y por lo tanto en su contenido de proteínas alergénicas. Resulta relevante entonces estudiar los cambios producidos en los perfiles proteicos mediante diversas técnicas analíticas ya sea para prevenir la introducción de nuevos alérgenos ó componentes tóxicos a la dieta de individuos susceptibles, o evitar la posible reactividad cruzada en individuos sensibilizados (Natarajan et al. 2009; Ladics and Selgrade 2009; Batista et al. 2007). Es frecuente encontrar en la bibliografía estudios comparativos entre variedades de soja, por las razones antes mencionadas, en las que se compara tanto la composición proteica como su alergenicidad/toxicidad, sobre todo en aquellas variedades genéticamente modificadas. Por ejemplo, mediante ensayos de ELISA de inhibición, SDS-PAGE e inmunoblotting de IgE se evaluó la reactividad frente a IgE de individuos alérgicos a soja de una variedad genéticamente modificada para la expresión de una proteína de resistencia a herbicidas (EPSPS) respecto de la variedad salvaje, hallándose que la presencia de la proteína EPSPS no incrementa el riesgo alérgico en la soja (Sang-Ha Kim et al. 2006). También mediante el empleo de herramientas biotecnológicas se ha logrado silenciar genes codificantes para proteínas alergénicas como P34 (Gly m Bd 30k) ó las

subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina, observándose cambios en la composición proteica y menor alergenicidad de estas variedades de soja para individuos alérgicos a proteínas de soja (A J Kinney, R Jung, and E M Herman 2001; Eliot M Herman et al. 2003). Sin embargo, no se han reportado estudios de este tipo destinados a comparar la reactividad cruzada de diversas variedades de soja con proteínas de LV, o con otros alérgenos con los que pueden presentar reactividad cruzada como los de maní, tal como fue descrito en este trabajo de tesis.

Por lo tanto, la variedad de soja Raiden demostró reactividad cruzada residual con caseínas bovinas y hemos identificado por inmunobloting a la subunidad  $\alpha/\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina como posible componente responsable de tal reactividad. Dado que se ha descrito en la literatura a Gly m 5.0101 (subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina) como uno de los alérgenos de soja (T Ogawa et al. 1995), resulta relevante estudiar la antigenicidad de esta proteína frente a distintos anticuerpos específicos de PLV para confirmar si además se comporta como un componente de reactividad cruzada con caseínas bovinas.

## Capítulo 2

Identificación de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -Conglicinina como un nuevo componente de reactividad cruzada con alergenios de la leche de vaca

---



## **2.1 INTRODUCCION**

Como se mencionó anteriormente, la soja se ha transformado en un alérgeno alimentario y ocupacional de consideración (Codina et al. 2002; Ballmer-Weber et al. 2007; Gómez-Ollés et al. 2007). A pesar que es consumida desde hace varios siglos por poblaciones del sudeste asiático, recién en las últimas décadas la industria alimenticia ha intensificado su empleo en la composición de numerosos alimentos. Actualmente la soja es la principal fuente de proteínas y aceite vegetal del mundo, y alimentos a base de soja se emplean principalmente como alimento para el ganado. Sin embargo, el alto valor biológico de sus proteínas y sus propiedades funcionales (texturizante, emulsificante, etc) ha determinado que los alimentos con soja y derivados de la soja sean también intensamente consumidos por el hombre en una amplia variedad de alimentos procesados. Desde la década del 80 la alergia a la soja ha sido documentada y actualmente las autoridades regulatorias han incluido a la soja y sus derivados entre los 8 alimentos que producen la mayor parte de las alergias alimentarias ([www.cf-san.fda.gov/~acrobat/algact.pdf](http://www.cf-san.fda.gov/~acrobat/algact.pdf)). Si bien la prevalencia de la alergia alimentaria a soja es baja, esta condición parece ser importante en casos de sensibilización primaria a otros alérgenos de reactividad cruzada. Se ha detectado sensibilización a alérgenos de la soja en pacientes primariamente sensibilizados al polen de abedul (Mittag et al. 2004), al maní (T A Beardslee et al. 2000b; Scott H Sicherer and Hugh A Sampson 2007) y a la leche de vaca (Rozenfeld et al. 2002). Clínicamente la sensibilización primaria a alérgenos de soja es responsable de generar síntomas más severos, mientras que en pacientes alérgicos al abedul que presentan IgE específica contra alérgenos de soja la probabilidad de reacciones sistémicas es menor (Ballmer-Weber et al. 2007), aunque existe un trabajo que muestra reacciones anafilácticas en estos pacientes (Kleine-Tebbe et al. 2002). También se han reportado casos fatales por reacciones anafilácticas con asma severa causadas por soja en jóvenes alérgicos al maní que no presentaban historia previa de alergia a soja (Foucard and Malmheden Yman 1999). Aunque hemos demostrado la reactividad cruzada inmunoquímica entre alérgenos de soja y leche bovina, no existen estudios clínicos que confirmen estos hallazgos.

Las  $\beta$ -conglucininas (Gly m5), junto con las glicininas (Gly m6), son las globulinas de almacenamiento mayoritarias de la semilla de soja, y están compuestas por tres clases de subunidades:  $\alpha$ (~67kDa),  $\alpha'$ (~71 kDa) y  $\beta$ (~ 50kDa) que en la semilla se combinan formando

heterotrímeros. La **subunidad  $\alpha$** , identificada como el alérgeno Gly m5.0101 ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), también denominada **Gly mBd 60k**, es considerada como uno de los alérgenos mayoritarios de soja, teniendo en cuenta que es reconocida por un alto porcentaje de individuos sensibles a soja (T Ogawa et al. 1995; A Ogawa, Samoto, and Takahashi 2000; Holzhauser et al. 2009). Holzhauser determinó que el 43% de los individuos alérgicos a soja (con historia de anafilaxia o desafío oral doble ciego con soja o placebo) tienen IgE sérica específica contra Gly m5 (Holzhauser et al. 2009). Por otro lado, se ha caracterizado a este alérgeno empleando modelos animales de alergia en rata (Guo et al. 2008) y ratones (X Liu et al. 2008). Aunque en un principio sólo la subunidad  $\alpha$  (Gly m5.0101) era considerada alérgica, actualmente también las subunidades  $\alpha'$  (Gly m5.0201) y  $\beta$  (Gly m5.0301) han sido caracterizadas como alérgenos ([www.allergen.org](http://www.allergen.org), (Krishnan et al. 2009).

En los últimos años ha tenido particular relevancia la implementación de la tecnología de DNA recombinante y la obtención de proteínas recombinantes, junto con el posterior desarrollo y empleo de herramientas bioinformáticas, en los avances logrados tanto en el conocimiento de los sistemas alérgicos, como en la identificación y caracterización de grupos de alérgenos y reactividad cruzada entre ellos. El conocimiento de la secuencia aminoacídica de las subunidades de  $\beta$ -conglucina ha permitido su expresión en forma recombinante en cantidades suficientes para evaluar su reactividad *in vivo* e *in vitro*. Hasta el momento este punto constituía un obstáculo experimental por el bajo rendimiento en la purificación del mismo a partir de la fuente natural (Guo et al. 2008).

En particular, teniendo en cuenta que en el capítulo anterior mostramos que la variedad Raiden posee como componente de reactividad cruzada la subunidad  $\alpha$ , y probablemente la  $\alpha'$  de la  $\beta$ -conglucina (Gly m 5.01 y 5.02), en este capítulo nos planteamos estudiar la reactividad de Gly m 5 y las caseínas bovinas. No se ha descrito en la literatura la importancia de Gly m 5 en las reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados a PLV.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Optimizar las condiciones de expresión como proteína soluble y purificación de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina, y de un fragmento correspondiente al dominio carboxilo (C-terminal) de la misma, denominado  $\alpha$ -CTD.
- Caracterizar inmunoquímicamente de la reactividad de las proteínas recombinantes obtenidas, empleando anticuerpos específicos contra PLV (antiseros policlonales, anticuerpos monodonaes, e IgE específica) en distintos inmunoensayos.

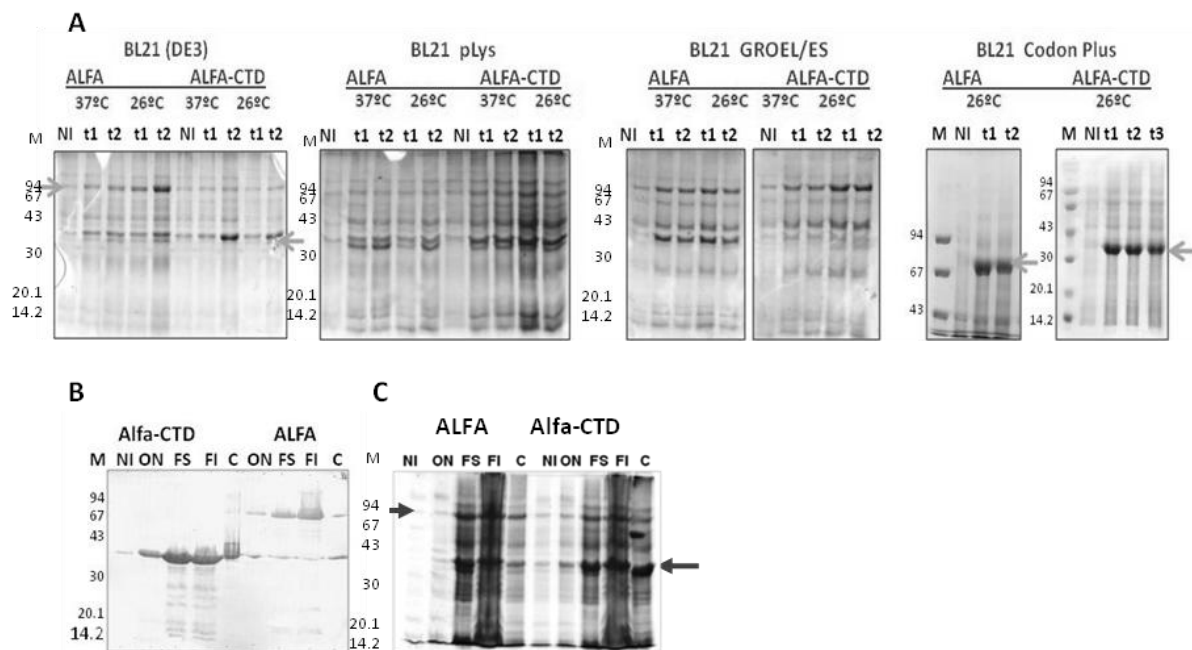


### **2.3 RESULTADOS**

#### ***\* Optimización de las condiciones de expresión de la subunidad $\alpha$ de $\beta$ -conglucina y del péptido $\alpha$ -CTD, y de la producción de las proteínas recombinantes purificadas***

Con el fin de expresar los genes codificantes para la subunidad  $\alpha$  y  $\alpha$ -CTD, y obtener los componentes polipeptídicos en forma soluble, distintas cepas de *E.coli* fueron transformadas con los plásmidos de expresión pET-  $\alpha$  (conteniendo el gen codificante para  $\alpha$   $\beta$ -conglucina sin péptidos señal) y pET- $\alpha$ -CTD (conteniendo el gen codificante para una delección del mismo gen). Las cepas de *Escherichia coli* empleadas fueron: BL21 (DE3), BL21 Codon Plus, BL21 GROEL/ES y BL21 pLys. Luego, se estudió la expresión en cultivos a baja escala (10 ml) y a dos temperaturas diferentes (26°C y 37°C), con el fin de determinar cuál de las cepas permitía obtener un mayor rendimiento de las proteínas en su forma soluble. En la **figura 1A** se presentan los resultados del análisis por SDS-PAGE de los extractos obtenidos a distintos tiempos de inducción. Como puede observarse la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) mostró una buena expresión de ambos genes, principalmente cuando se realizó un cultivo por más de 12hs luego del agregado del inductor (t2), siendo mayor la expresión de la subunidad  $\alpha$  a la menor temperatura ensayada (26°C). En el caso de la cepa *Escherichia coli* BL21 GroEL/ES, (que posee una serie de chaperonas que favorecen el tránsito de proteínas entre la fracción soluble en insoluble y la desagregación de cuerpos de inclusión), o de la cepa BL21 pLys, (que posee el plásmido Lys que codifica para la lisozima T7 que es un inhibidor natural de la polimerasa T7), no se observaron diferencias en los perfiles proteicos de los extractos bacterianos obtenidos luego de la inducción con IPTG en relación con los no inducidos. A diferencia de las cepas anteriores, en el perfil electroforético obtenido para las proteínas producidas por la cepa *Escherichia coli* BL21 Codon Plus evidenció una mayor capacidad para la expresión de los genes codificantes para las proteínas de soja (siempre se observó mayor cantidad de proteínas, aún empleando tiempos de inducción más reducidos y las dos temperaturas evaluadas). Esto indica que el factor que limita la expresión de estos genes de soja en *E.coli* es la diferencia en el uso de codones entre plantas y bacterias, más que la capacidad de plegamiento o toxicidad de la proteína para la bacteria. Se observa además que el incremento en la temperatura no favorece la acumulación de la proteína de

interés (**Figura 1A BL21 DE3**), lo cual sugiere que aunque la mayor temperatura puede favorecer la síntesis, en esta condición la degradación es más intensa.

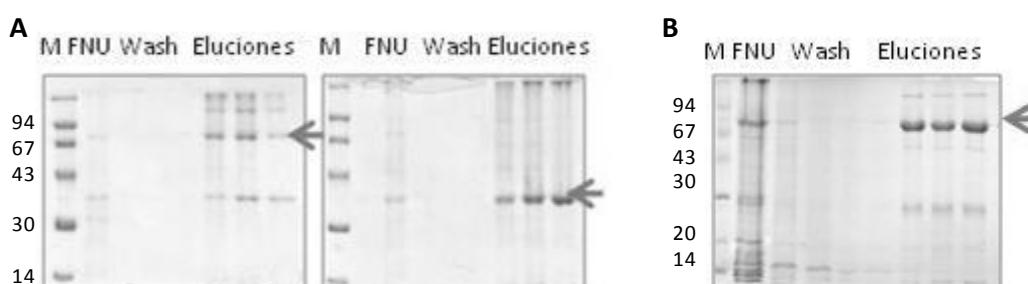


**Figura 1. Cinética de expresión de los genes derivados de la subunidad alfa de la beta conglicina en distintas cepas de Escherichia coli BL21.** A) SDS- PAGE de extractos obtenidos a partir de cepas de E.coli BL21 (DE3), pLys, GroEL/ES y Codon Plus transformadas con pEt-m- alfa y pEt- alfa-CTD.. La inducción se realizó simultáneamente a 37°C y 26-28°C. Se tomaron muestras a distintos tiempos NI: No inducida; t1: 5 horas post inducción; t2: toda la noche. Para el caso de alfa-CTD en Codon Plus, t1 corresponde a 2 hs post inducción y t2 y t3 a 5 hs y toda la noche, respectivamente. M: patrón de peso molecular (en kDa). Las flechas indican las bandas correspondientes a la proteína expresada  
**B) Immunoblotting** con anticuerpo monoclonal anti-histidina en el cultivo de toda la noche (ON) de BL21(DE3) a 37°C  
**C) SDS- PAGE** de los extractos de E.coli del cultivo ON de BL21 (DE3) a 26°C.  
 FS: Fracción Soluble, FI: Fracción Insoluble. C: control de proteína pura.

A su vez, como puede observarse en la **figura 1** el componente  $\alpha$ -CTD es producido más fácilmente por las bacterias a cualquiera de las dos temperaturas evaluadas en comparación con lo que ocurre con la subunidad  $\alpha$  completa. Esto se evidencia al comparar los perfiles de la subunidad  $\alpha$  en la cepa BL21 (DE3) inducida a 37°C, revelada con Coomassie Blue (**Figura 1A**) y por inmunoblotting empleando un anticuerpo anti-histidina (**Figura 1B**). En la figura correspondiente al perfil proteico obtenido por SDS-PAGE no se observa la banda correspondiente a la subunidad  $\alpha$ . Sin embargo, y dada la mayor detectabilidad del inmunoblotting, ésta puede visualizarse con el anticuerpo monoclonal específico para el tag de histidinas. En la **figura 1C** se presenta un análisis de las fracciones solubles e insolubles de la inducción realizada a 26°C, observándose que a esta temperatura tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\alpha$ -CTD se expresan en forma soluble e insoluble.

En base a los resultados obtenidos a baja escala se realizaron cultivos en mayor escala con fines preparativos. En principio, se realizó la expresión de ambos genes en la cepa BL21(DE3) a 26°C, ya que con esta condición se alcanzó un buen rendimiento en la obtención de las proteínas, tanto en forma soluble como insoluble. Sin embargo, al realizar el cambio de escala la proteína  $\alpha$  sólo fue obtenida en la fracción insoluble, mientras que  $\alpha$ -CTD, en ambas fracciones.

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó en base a la afinidad del tag de histidinas presente en ambas construcciones por un metal divalente, ya sea Ni (II) o Co (II). Para el caso de las fracciones insolubles del extracto de *E.coli* BL21(DE3), estas se re-suspendieron en buffer lisis en presencia de urea 6M y se purificaron empleando una resina de Ni (II). La **figura 2A** muestra los resultados por SDS PAGE de las proteínas obtenidas en cada etapa de la purificación de las fracciones insolubles de la expresión de  $\alpha$  y  $\alpha$ -CTD en BL21(DE3) a 26°C, es decir, la fracción no unida (FNU), los lavados (Wash) y las eluciones. Como se puede inferir del gel, ambas proteínas se obtuvieron en las fracciones eluidas, quedando  $\alpha$ -CTD con un mayor grado de pureza.



**Figura 2. SDS PAGE de las fracciones de purificación. A) Purificación con resina de Ni(II) de  $\alpha$  (izquierda) y  $\alpha$ -CTD (derecha). B) Purificación con Co(II) de  $\alpha$ . M: patrón de peso molecular en kDa. FNU: fracción no unida. Wash: lavados de la resina. Las flechas indican la proteína purificada obtenida en las fracciones de elución.**

Por lo tanto, se decidió emplear la cepa *E.coli* BL21 Codon Plus para la obtención de la proteína  $\alpha$  en la fracción soluble. Se indujo la expresión de pEt- $\alpha$  en un cultivo a gran escala de BL21 Codon Plus a 26°C. Luego se purificó la fracción soluble en columna con resina de Co (II). En esta oportunidad, las fracciones eluidas de la proteína recombinante mostraron mayor cantidad y grado de pureza que en la purificación con Ni (II), como se observa en el SDS PAGE de la **figura 2B**. Por lo tanto en estas condiciones se logró expresar en forma soluble la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina.

Luego de la purificación se procedió a la re-naturalización de cada una las proteínas. Las fracciones de elución obtenidas (en buffer urea 6M) de las resinas de Ni(II) se diluyeron al

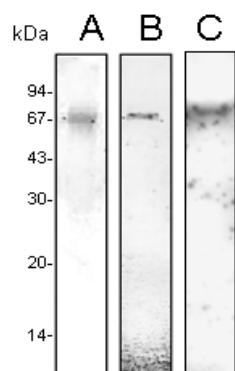
medio en buffer Tris-HCl 1mM pH 8, a fin de reducir la concentración final de urea. Posteriormente se dializó contra Tris-HCl 1mM pH 8 empleando membranas de diálisis de 14 kDa de punto de corte, durante 48 horas, renovando el buffer tres veces.

Las fracciones eluidas de la purificación de la proteína  $\alpha$  con la columna de Co(II) (en buffer con imidazol 150 mM) se dializaron contra agua bidestilada, utilizando una membrana de iguales características que las descritas anteriormente, para eliminar el imidazol. Luego de 15 horas, se cambió el agua por buffer Tris-HCl 1mM pH 8 y se dializó durante 15 horas.

La cantidad de proteínas recuperadas luego de cada purificación y re-naturalización se determinó empleando el método BCA. El rendimiento para la expresión en *E.coli* BL21 (DE3) de la subunidad  $\alpha$  fue 1 mg/Litro de cultivo (inducido toda la noche a 26°C) y 2,5 mg/Litro de cultivo (inducido en las mismas condiciones) para  $\alpha$ -CTD. En el caso de expresarlas en la cepa BL21 Codon Plus el rendimiento fue de 6 mg/Litro de cultivo (inducido toda la noche a 26°C) para  $\alpha$  recombinante.

**\* Análisis por inmunobloting de la reactividad inmunoquímica de las fracciones recombinantes puras.**

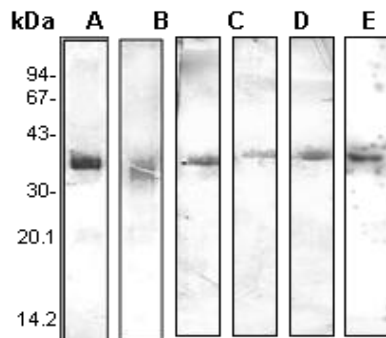
Se analizaron ambas proteínas recombinantes por inmunobloting empleando anticuerpos específicos contra PLV. La subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina recombinante pura fue reconocida por el suero policlonal en conejo específico anti- PLV, un anticuerpo monoclonal específico anti-  $\alpha$  caseína bovina (1D5), y por anticuerpos IgE de un suero de individuo ALV (Figura 3 A, B, y C respectivamente).



**Figura 3. Inmunobloting correspondiente a la subunidad alfa recombinante revelado con:** A) suero policlonal de conejo anti PLV, B) 1D5, mAb específico de alfa caseína bovina, C) IgE específica de un suero representativo correspondiente a un paciente con ALV.

En la figura 4 puede observarse que la fracción recombinante  $\alpha$ -CTD, además de mostrar reactividad frente a estos mismos anticuerpos, fue reconocida por anticuerpos monodonales específicos de  $\beta$ - (2A1) o de  $\kappa$ -caseína (3B5), y por un suero policlonal obtenido en ratón específico de las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de la  $\beta$ -conglucina de soja. Este

resultado confirma que la secuencia de  $\alpha$ -CTD corresponde a un dominio presente en la subunidad  $\alpha$  (**Figura 4**).

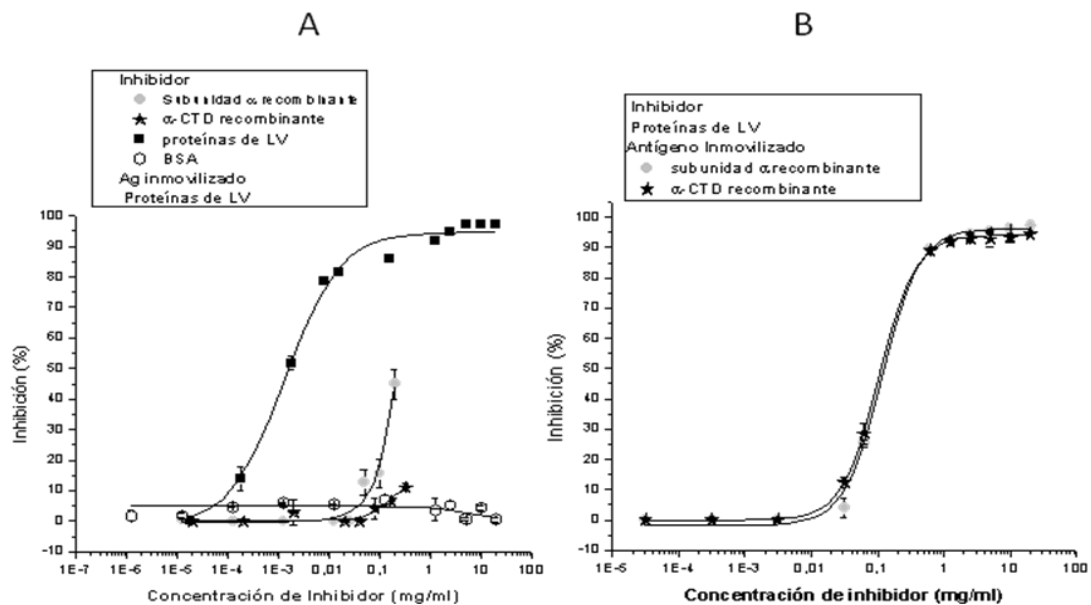


**Figura 4. Immunoblotting correspondiente a alfa-CTD recombinante revelado con A) suero policlonal de ratón anti  $\alpha\alpha'$  de soja, B) antisuero policlonal de conejo anti-PLV, C) 1D5, mAb específico de  $\alpha$ -caseína bovina, D) 2A1, mAb específico de  $\beta$ -caseína E) 3B5, mAb específico de  $\kappa$ -caseína y F) IgE específica de un suero representativo correspondiente a un paciente con ALV.**

**\* Análisis por ELISA de la reactividad inmunoquímica de las fracciones recombinantes puras.**

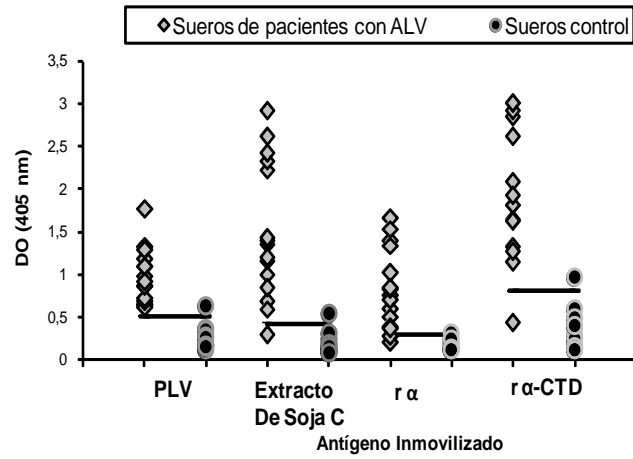
Se empleó nuevamente un **ELISA de inhibición** para evaluar la capacidad de desplazamiento de unión de PLV en fase sólida a anticuerpos específicos de PLV por proteínas recombinantes de soja en fase fluida. Para lograr un ensayo con mayor detectabilidad, se realizó el ELISA de inhibición en forma secuencial pre-incubando el antisuero específico de PLV con los inhibidores (en fase fluida). Luego esta pre-mezcla se enfrentó al antígeno de identidad (en fase sólida) y finalmente se evidenciaron los Ac unidos al Ag en fase sólida empleando un segundo anticuerpo específico conjugado. Como puede observarse en la **figura 5A** las concentraciones de las proteínas puras en fase fluida necesarias para inhibir la unión de anticuerpos específicos de PLV presentes en el suero de conejo a las PLV en fase sólida fueron mucho mayores que las de PLV empleadas como inhibidor en fase soluble. Como muestra el gráfico,  $IC_{50_{PLV}}$  fue de 0,002mg/ml mientras que  $IC_{50_{subunidad\ \alpha\ rec}}$  0,2 mg/ml e  $IC_{50_{\alpha-CTD}}$  fue de 1 mg/ml. Se alcanzó  $IC_{100_{PLV}}$  con 3 mg/ml, mientras que no se alcanzó el IC100 con las proteínas de soja recombinantes. Además se empleó una proteína no relacionada con el sistema, como seroalbúmina bovina (BSA) como inhibidor soluble en concentraciones crecientes, obteniéndose una inhibición basal y constante inferior al 10% (**Figura 5A**). La **figura 5B** corresponde al ELISA de inhibición empleando como antígenos inmovilizados las proteínas recombinantes de soja puras (sensibilización con 0,1  $\mu$ g/fosa), y como inhibidor en fase soluble, a las PLV en distintas concentraciones. En ambos casos, ya sea para competir por la unión de anticuerpos específicos de PLV a la subunidad  $\alpha$  de soja o al fragmento  $\alpha$ -CTD, el  $IC_{50_{PLV}}$  fue de 0,1 mg/ml. En estos ensayos mostrados en el panel **B** el antisuero policlonal específico de PLV

debió emplearse a una dilución 1:6000 para obtener una curva de inhibición sigmoidea, mientras que los ensayos correspondientes al panel A se realizaron con una dilución 1:200.000 del antisuero.



**Figura 5. ELISA de Inhibición empleando un suero de conejo anti-PLV. A) Ag inmovilizado LV (1 $\mu$ g/well), inhibidores:  $\alpha$  y  $\alpha$ -CTD recombinantes Suero de conejo dilución 1/200.000. B) Ag inmovilizado:  $\alpha$  recombinante (0,1  $\mu$ g/well) y  $\alpha$ -CTD (0,1 $\mu$ g/well), el inhibidor es LV y la dilución del Suero de conejo: 1/6000**

Por otro lado, se evaluó por ELISA indirecto la capacidad de unión de las proteínas recombinantes de soja o extractos de soja y leche bovina a anticuerpos IgE presentes en sueros de pacientes con ALV. En la **figura 6** se observan los resultados de este ensayo, donde se puede apreciar que ambas fracciones recombinantes puras fueron reconocidas por anticuerpos IgE de individuos ALV. El 86,7% (13/15) de los sueros evaluados, además de reconocer proteínas en extractos proteicos totales de LV y soja en este mismo ensayo y como se mostró en el capítulo I, se unió a la subunidad  $\alpha$  y el 93,3% (14/15) lo hizo para  $\alpha$ -CTD, resultados que concuerdan con los obtenidos por inmunoblotting empleando los mismos sueros.



**Figura 6. ELISA indirecto para IgE sérica.** Antígenos inmovilizados: Proteínas de leche de vaca "PLV" (1µg/100 µl), extracto de soja convencional C (0,05 µg/100 µl), subunidad α recombinante "r α" (0,05 µg/100 µl) y α-CTD recombinante "r α-CTD" (0,05 µg/100 µl). Sueros Control: individuos NO Alérgicos a LV.

## **2.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES**

$\beta$ -conglucina (Gly m 5) es la proteína mayoritaria de la fracción 7S de reserva en semilla de soja y como se mencionó anteriormente, la subunidad  $\alpha$  (Gly m 5.0101) ha sido descrita como un alérgeno importante de soja en pacientes con dermatitis atópica (T Ogawa et al. 1995), alergia alimentaria (Ballmer-Weber et al. 2007; Krishnan et al. 2009), asma (Codina et al. 2002) y anafilaxia (Holzhauser et al. 2009). Sin embargo, no existen estudios que muestren la importancia de la misma o de otras globulinas 7S en pacientes alérgicos a PLV.

Aquí se evaluó la expresión de la subunidad  $\alpha$  y de  $\alpha$ -CTD como proteínas recombinantes en distintas cepas bacterianas y bajo distintas condiciones experimentales que permitieran obtenerlas puras en forma soluble, y en cantidades suficientes para su análisis inmunoquímico. Por inmunobloting y ELISA ambas proteínas recombinantes fueron reconocidas por distintos anticuerpos específicos contra PLV, lo cual indica la existencia de epitopes B (epitopes IgG) y que la reactividad cruzada no es específica de hidratos de carbono, que sí están presentes en las contrapartidas naturales. En el mismo sentido, el reconocimiento de las mismas por parte de anticuerpos IgE séricos de individuos alérgicos a LV, indica la existencia de epitopes IgE.

Mediante los ensayos de inhibición confirmamos la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos presentes en el antisuero específico anti-PLV a los componentes recombinantes de soja. Por comparación de los distintos IC50 podemos concluir que en el antisuero existen distintas poblaciones de anticuerpos específicos contra PLV, algunas de las cuales son capaces de reconocer epitopes presentes en las proteínas de soja. El hecho de no lograr un 100% de desplazamiento de los anticuerpos a PLV en fase sólida por las proteínas de soja en fase fluida indica que existen anticuerpos que no son de reactividad cruzada. En concreto, estos resultados junto con la forma de la curva de inhibición sugieren que hay una población restringida de anticuerpos específicos contra PLV en el suero policlonal que reconocen específicamente epitopes IgG en las proteínas de soja  $\alpha$  y  $\alpha$ -CTD.

A veces la sensibilización puede no ser equivalente a la manifestación sintomática de la alergia, y la reactividad cruzada inmunoquímica puede ser más amplia que la reactividad cruzada clínica. La afinidad de anticuerpos IgE, el número de epitopes en la molécula, las



características conformacionales del alérgeno luego de su absorción en la mucosa, y la dosis y accesibilidad de los epitopes nativos hacia la IgE unida a células inflamatorias, pueden ser determinantes de la activación celular y la consecuente aparición de los síntomas. En este sentido, dado que ambas fracciones recombinantes mostraron idéntica reactividad frente a anticuerpos específicos contra PLV (IgG e IgE), podría inferirse que la reactividad cruzada con caseínas bovinas de la subunidad  $\alpha$  se debe a la antigenicidad de la región C-terminal, donde se localizarían los epitopes responsables de la reactividad cruzada con las PLV.

Por lo tanto hemos hallado un nuevo componente de reactividad cruzada en la fracción de proteínas de reserva 7S, la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina, que presenta una alta homología estructural y de secuencia con las otras subunidades de la  $\beta$ -conglucina (subunidades  $\alpha'$  y  $\beta$ ) (N Maruyama et al. 1998; Yukie Maruyama et al. 2004). No descartamos la existencia de epitopes de reactividad cruzada en estas otras dos subunidades ya que por inmunoblotting de los extractos totales de soja mostrados en el capítulo anterior hemos observado reactividades IgG en zonas con PM relativos correspondientes a estas fracciones. Además, el polipéptido  $\alpha$ -CTD que mostró reactividad cruzada con los distintos anticuerpos específicos de PLV, por lo cual concluimos que contendría epitopes IgG e IgE, corresponde al dominio carboxilo terminal de las 3 subunidades de la  $\beta$ -conglucina por la homología entre las mismas antes mencionada.

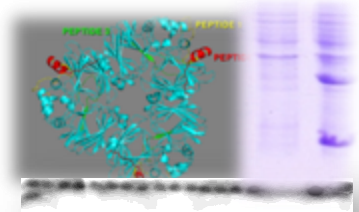
Estas tres subunidades de la beta-conglucina junto con la glicina  $A_5A_4B_3$  presente en la soja convencional podrían ser las responsables de la reactividad cruzada clínica observada en ciertos pacientes alérgicos IgE-mediados a PLV que son tratados con sustitutos lácteos a base de proteínas de soja (Zeiger et al. 1999; Klemola et al. 2002). La confirmación de esta hipótesis requiere profundizar los estudios *in vitro* e *in vivo*. Estamos trabajando en la obtención en forma recombinante de las subunidades restantes de la  $\beta$ -conglucina y en estudios clínicos para evidenciar la reactividad cruzada en pacientes alérgicos a PLV que no se encuentran sensibilizados a proteínas de soja. Para tal fin es relevante contar con una historia clínica dirigida a este punto y la implementación de desafío oral con PLV o de soja.

Por otro lado, la caracterización de los epitopes B permitirá una mejor comprensión a nivel molecular de la reactividad cruzada. *En el próximo capítulo se avanzará en el mapeo de epitopes de reactividad cruzada presentes en el fragmento  $\alpha$ -CTD.*

## Capítulo 3

# Mapeo de epitopes responsables de la reactividad cruzada entre caseínas bovinas y proteínas de soja

---



### **3.1 INTRODUCCION**

Dado el rol crítico que poseen los anticuerpos IgE específicos en las reacciones alérgicas, la identificación de epitopes B y T, en especial los epitopes IgE, parece ser de gran importancia para comprender mejor la naturaleza alérgica de ciertas proteínas. Además esta información puede tener un impacto directo en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. En este capítulo nos interesa mostrar lo realizado hasta el momento en cuanto al mapeo de epitopes de reactividad cruzada entre proteínas no relacionadas filogenéticamente, pero que podrían causar reacciones alérgicas como consecuencia del reconocimiento de epitopes conservados (Oezguen et al. 2008; Albrecht et al. 2009; Barre et al. 2008a).

En proteínas de leche de vaca se ha descrito ampliamente la presencia de epitopes B en diferentes alérgenos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseínas y  $\beta$ -lactoglobulina), aunque no se han identificado hasta el momento epitopes T (P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, K Beyer, et al. 2001; P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, L Vila, et al. 2001; K M Järvinen et al. 2001). En la actualidad existen trabajos que describen la presencia de epitopes T en el alérgeno mayor del huevo y del maní (Hong et al. 1999; Lemon-Mulé et al. 2008; Buchanan et al. 2007). Información sobre mapeo de epitopes B y T resulta central al momento de plantear nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la instauración de tolerancia oral mediante el empleo de proteínas o péptidos con baja o nula capacidad de activación de mastocitos y basófilos, pero con capacidad de activación de linfocitos T.

La presencia de epitopes lineales en alérgenos alimentarios es relevante principalmente porque el sistema inmune se enfrenta a los alérgenos luego de haber sido parcialmente desnaturalizados y digeridos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, las proteínas de soja presentan arreglos conformacionales tridimensionales importantes y muestran una marcada tendencia a asociarse entre sí. No existe en la literatura información sobre el estado en el que estas proteínas llegan a la superficie de la mucosa intestinal absorbiva, ni cómo atraviesan la mucosa como parte del proceso de absorción de nutrientes. Es sabido que un 10 % aproximadamente de las proteínas que alcanzan la barrera epitelial son absorbidas como tales (pasaje paracelular) y pueden hallarse con su conformación nativa en la mucosa intestinal, o inclusive en circulación. Por lo tanto, si un trímero o un monómero (el trímero se disocia a pHs extremos) de globulinas 7S es capaz de resistir el procesamiento

digestivo, podría ser reconocido por los elementos del sistema inmune presente en la mucosa gastrointestinal. Por esta razón no hay que descartar la presencia de epitopes B conformacionales en estos alérgenos, aunque la presencia de secuencias aminoacídicas cortas portadoras de epitopes B y/o T parece ser lo más razonable *a priori*. En este trabajo nos hemos concentrado en la identificación de epitopes B lineales (epitopes IgG e IgE) comunes entre ambos sistemas proteicos, lo cual constituye un indicio de la presencia de epitopes lineales de reactividad cruzada.

El estudio y la identificación de epitopes inmunodominantes lineales o conformacionales pueden ser abordados mediante la aplicación de diferentes estrategias. Hemos decidido estudiar la presencia de péptidos lineales mediante la síntesis en fase sólida de péptidos que contienen epitopes lineales (seleccionados en base a métodos bioinformáticos predictivos por comparación de secuencias aminoacídicas). Por otro lado, la obtención de péptidos en forma recombinante y fusionado a una proteína de mayor tamaño permitirá analizar la presencia de epitopes conformacionales. Finalmente los ensayos de scanning de alanina en péptidos obtenidos por síntesis química nos permitirá identificar los aminoácidos críticos para la reactividad inmunológica.

Como se mostró previamente existen zonas conservadas entre las distintas globulinas de la soja ya que evolutivamente derivan de un mismo gen ancestral. Sobre la base de los primeros resultados de reactividad cruzada de la glicina  $A_5A_4B_3$  determinamos que la reactividad está concentrada en la subunidad B3 (Rozenfeld et al. 2002) y confirmamos esta reactividad empleando una fracción recombinante y una variedad de soja natural que carecía de esta subunidad (capítulo 1). Posteriormente mostramos que la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina también es un componente de reactividad cruzada con las caseínas y que tal reactividad aparece fundamentalmente en el fragmento  $\alpha$ -CTD (capítulo 2). *En este capítulo nos centraremos en la identificación y caracterización de los epitopes de reactividad cruzada presentes en este polipéptido.*

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Identificar las regiones responsables de la reactividad cruzada del fragmento  $\alpha$ -CTD con las caseínas bovinas empleando métodos *in silico*.
- Confirmar las predicciones realizadas empleando péptidos sintéticos y recombinantes.
- Identificar aquellos residuos aminoacídicos críticos para la inmuno-reactividad antigénica y alergénica.

### **3.3 RESULTADOS**

#### ***\*Análisis in silico para la predicción de epitopes de reactividad cruzada***

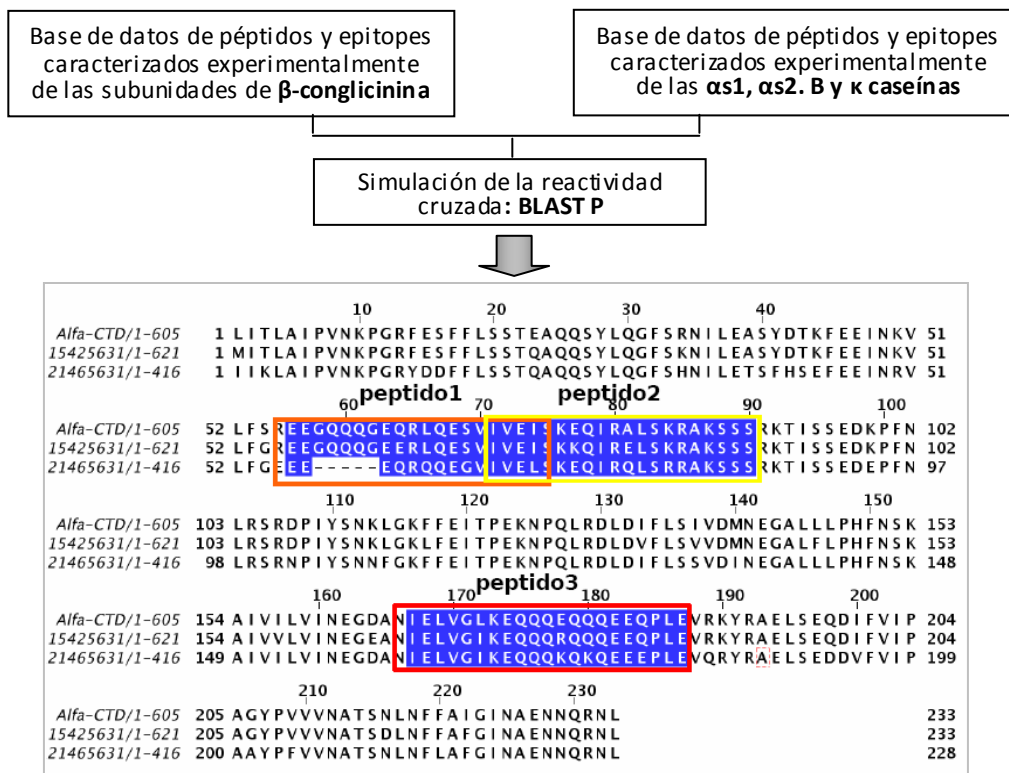
Sobre la base experimental de la reactividad cruzada observada en el péptido recombinante  $\alpha$ -CTD, se inició un análisis teórico empleando herramientas bioinformáticas con el propósito de localizar regiones de similitud secuencial entre epitopes descritos en caseínas bovinas (alfa, beta y kappa) y el péptido  $\alpha$ -CTD. Esas regiones podrían contener epitopes potenciales que permitirían explicar la reactividad cruzada observada entre los sistemas. Además el modelado de  $\alpha$ -CTD, permitiría localizarlos en la estructura tridimensional de la molécula. Análisis similares se han realizado en otros alergenos de reactividad cruzada y se ha observado que generalmente estos epitopes B se encuentran en la superficie de la molécula y por lo tanto son accesibles a los anticuerpos presentes en el medio (Barre, Borges, and Rougé 2005; Barre et al. 2008a; Fu et al. 2007; Sordet et al. 2009).

Las secuencias de las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$  de la  $\beta$ -conglucina y de  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas fueron obtenidas de la base de datos Genbank, y con ellas se efectuó la predicción de epitopes de reactividad cruzada por alineamiento de las secuencias con los epitopes de caseínas identificados experimentalmente recopilados en distintas bases de datos (**Allergome**: [www.allergome.org](http://www.allergome.org); **IUIS allergens**: [www.allergen.org](http://www.allergen.org); **CSL allergen** [www.csl.gov.uk/allergen](http://www.csl.gov.uk/allergen); **FARRP**: [allergenonline.com](http://allergenonline.com); **SDAP-Structural Database of Allergenic Proteins** SDAP: [fermi.utmb.edu/SDAP](http://fermi.utmb.edu/SDAP); **ALLERDB**: [antigen.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/](http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/); **PROTALL**: [www.ifr.ac.uk/protall](http://www.ifr.ac.uk/protall)) o bien predichos *in silico* empleando distintos algoritmos basados en las propiedades de los residuos de los aminoácidos o de la estructura, por ejemplo que predicen hidrofiliidad, hidrofobicidad, flexibilidad, antigenicidad, estructura secundaria, etc. ([www.imtech.res.in/raghava/algpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/), <http://tools.immuneepitope.org/tools/>, <http://expasy.org/tools/>). El resultado de esta primera aproximación demostró que a lo largo de la secuencia de las subunidades de  $\beta$ -conglucina se encuentran algunas regiones con mayor similitud secuencial con los epitopes de caseínas bovinas (**figura 1**), principalmente con alfa s1 caseína.

Alfa betaconglucina	287	VPSGTTYVVPDNNENLRLITLAI PVNKP G
Alfa prima betaconglucina	303	VPAGTTYVVPDNDENLRMITLAI PVNKP G
Beta betaconglucina	103	IPAGTTYLVNPHDHQNLKIIKLAIPV NKP G
Alfa betaconglucina	356	REEGQQQGEQRLQESVIVEISKEQIRALS KRAKSSS
Alfa prima betaconglucina	370	REEGQQQGEERLQESVIVEISKKQIRELS KRAKSSS
Beta betaconglucina	171	RVLFGEEEEQRQQEGVIVELSKEQIRQLS RRAKSSS
Alfa betaconglucina	472	IELVGLKEQQEQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDI
Alfa prima betaconglucina	488	IELVGIKEQQQRQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDI
Beta betaconglucina	283	ELVGIKEIQQQKQKQEEPELVQRYRAELSEDDV
Alfa betaconglucina	572	NQRESYFVDAQPKKEEGNKGRKGPLSSILRAFY
Alfa prima betaconglucina	588	SQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGPLSSILRAFY
Beta betaconglucina	383	KQRESYFVDAQPQQKEEGSKGRKGPPSILGALY

**Figura 1. Comparación de las secuencias aminoácidas de las proteínas de reactividad cruzada estudiadas.** Se señalan en las secuencias de las subunidades de  $\beta$ -conglucina aquellas regiones que presentan mayor similitud con los epitopes de caseínas bovinas descritos o predichos. Se indican con diferente color las similitudes secuenciales con cada una de las caseínas; rojo para alfa s1 caseína, violeta para beta caseína y azul para kappa.

A las regiones identificadas en la predicción anterior se agregaron los epitopes de las subunidades de  $\beta$ -conglucina caracterizados experimentalmente y disponibles en la base de datos Immune Epitope Data Base (IEDB). Se construyó una nueva base de datos de péptidos y epitopes de  $\beta$ -conglucina que luego fue empleada para efectuar una **simulación de la reactividad cruzada**, al enfrentarla mediante el programa BLASTP con una base de datos de epitopes caracterizados y péptidos de las caseínas bovinas creada de manera similar. Los resultados de la comparación de ambas bases de datos se muestran en la **figura 2**.



**Figura 2. Esquema de la metodología utilizada para la predicción de posibles epitopes intervinientes en la reactividad cruzada.** El resultado obtenido se muestra mediante el alineamiento de alfa-CTD con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina, en azul se indican las regiones con mayor similitud secuencial con caseínas bovinas. Se seleccionaron tres péptidos como las zonas de posibles epitopes de reactividad cruzada con caseínas de LV (regiones recuadradas).

De esta simulación de reactividad cruzada, se seleccionaron **tres secuencias aminoacídicas** que de aquí en adelante se denominarán “**péptido 1**”, **péptido2**” y “**péptido3**”, presentes en  $\alpha$ -CTD (entre los residuos 57 y 187) y en las subunidades  $\alpha$  (gi 121281),  $\alpha'$ - (gi 15425631) y  $\beta$ - (gi 21465631) de la  $\beta$ -conglucina (entre los residuos 357 y 493), como se indica en la **figura 3**, las cuales presentan **la mayor similitud secuencial con las caseínas, bovinas**. Los péptidos 1 y 2 poseen 20 aminoácidos cada uno y sus secuencias están solapadas, mientras que el péptido 3 tiene una longitud de 21 aminoácidos y se encuentra en el extremo C-terminal en la secuencia aminoacídica.

<p><b>Péptido 1 de <math>\alpha</math>-CTD</b>  <math>\beta</math>-caseína  <math>\beta</math>-caseína  <math>\alpha</math>1-caseína</p>	<p><b>361</b>            EEGQQGEORLQESVIVEIS            EEQQQTEE-LODK-THPFA            EELNVPGE-IVE-S            EIVPNSAEERLH-SMKEGIH</p>
<p><b>Péptido 2 de <math>\alpha</math>-CTD</b>  <math>\alpha</math>1-caseína  <math>\alpha</math>1-caseína</p>	<p><b>376</b>            IVEISKEQIRALSKRAKSSS            PEVFGKEKVNELSKDIGSES            IVPNSVEQKHIQ-KEDVPSE</p>
<p><b>Péptido 3 de <math>\alpha</math>-CTD</b>  <math>\beta</math>-caseína  <math>\alpha</math>1-caseína  <math>\kappa</math>-caseína  <math>\alpha</math>2-caseína</p>	<p><b>471</b>            TELVGLKEQQEQQQEEQPLE <b>492</b>            INKKIEKFSQQQTEDELQ            ERLHSMKEGIHAQQKEPMIGV            LALTLPLGAEQEQE-OPIR            MESTEVFTKTKLTEEEKNRL</p>

**Figura 3. Alineamiento de los péptidos identificados para alfa-CTD con epítopes IgE descriptos de caseínas bovinas.** En rojo se indican los residuos idénticos y en naranja aquellos estructuralmente homólogos, presentes en epítopes IgE de caseínas bovinas.

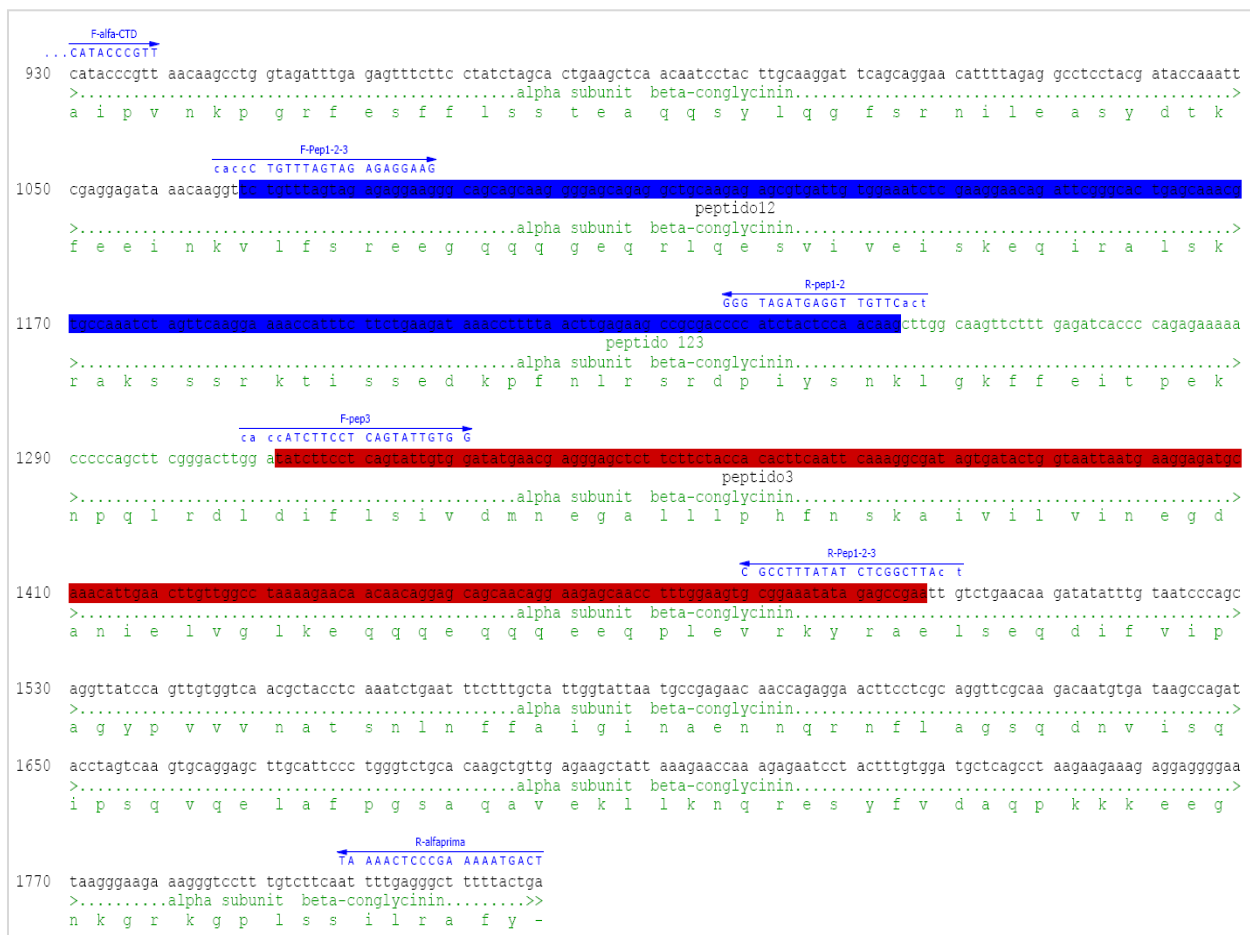
Estas regiones de similitud de secuencias entre  $\alpha$ -CTD y las distintas caseínas bovinas identificadas *in silico* podrían explicar los resultados obtenidos en los capítulos anteriores empleando anticuerpos monodonaes específicos contra distintas caseínas.

**\* Clonado y expresión de péptidos recombinantes**

Con el propósito de probar si las predicciones realizadas aplicando métodos de análisis *in silico* eran correctas y si los péptidos responsables de la reactividad cruzada pudieran contener epítopes conformacionales, se decidió obtener una delección de la subunidad alfa que comprendiera las secuencias de los péptidos 1, 2 y 3 y clonar estos péptidos fusionados a una proteína no relacionada con el sistema (MBP o maltosa-binding protein). Para ello se emplearon los primers mostrados en la tabla 1 de Materiales y Métodos, que amplifican la región de la subunidad alfa de la beta conglucina mostrada en la **figura 4**. Dependiendo de las combinaciones de primers realizadas se obtuvo la zona completa denominada **P123** o bien solo una parte correspondiente a los péptidos 12



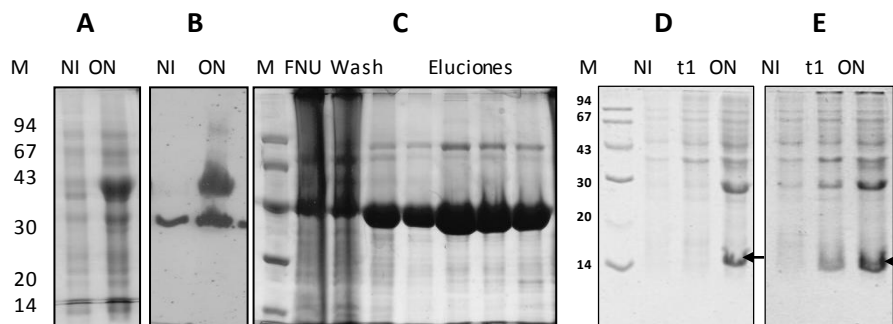
(indicado en azul) o péptido 3 (indicado en rojo). Estos primers fueron diseñados para hacer un clonado direccional en pENTR (Invitrogen) o pET200 D/TOPO (Invitrogen) ajustándose el marco de lectura de forma tal que al transferir esta secuencia a un vector de destino de expresión (pDEST-HIS-MBP) o bien directamente el producto de PCR clonado en pET200, quedara en el marco de lectura con el o los tags de purificación. El mutante P123 contiene la secuencia nucleotídica que abarca los tres péptidos (1 y 2 están solapados, luego hay una zona donde no hay similitud con caseínas bovinas y continúa con el péptido 3). Los fragmentos P12 y P3 poseen sólo las zonas de similitud secuencial con caseínas, y los límites fueron establecidos teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la beta conglucina (N Maruyama et al. 2001), tratando de mantener las regiones de estructura secundaria intactas.



**Figura 4. Esquema de la obtención de fragmentos P123, P12 y P3.** Se indican las secuencias obtenidas a para P12 (azul) y P3 (rojo), a partir de la secuencia de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina con los primers específicos indicados

La figura 5 muestra los resultados de la inducción de *E.coli* BL21 “Codon Plus” conteniendo pDEST-HIS-MBP-P123. Las condiciones inducción (cantidad de inductor, tiempos y temperaturas) fueron ajustadas como se mostró en el capítulo anterior de forma de

obtener la proteína recombinante soluble en el citosol. Posteriormente se realizó un cambio de escala en la producción: se pasó de 10 ml a cultivos de 500 ml.



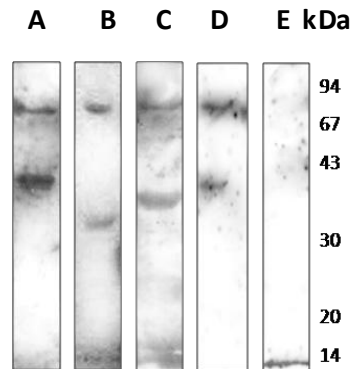
**Figura 5. Perfiles electroforéticos correspondientes a la expresión y purificación de los péptidos recombinantes.** A. SDS PAGE del extracto de *E.coli* pre- y post inducción (NI: no inducida; ON: inducción toda la noche) de P123; B. Inmunoblotting con un anticuerpo anti-histidina sobre la fracción inducida. C. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación de P123 con resina de Co(II) (FNU: Fracción no unida a la resina, Wash: lavados). D. SDS PAGE del extracto de *E.coli* pre- y post inducción a 37°C de P12 en *E.coli*. E. SDS PAGE del extracto de *E.coli* pre- y post inducción a 37°C de P3. Con las flechas se indican los productos recombinantes obtenidos (NI: No Inducido, t1: 5 hs post inducción, ON: toda la noche de inducción).

En los paneles A y B se observa que se han logrado buenos niveles de expresión de P123. Se observan dos bandas de aproximadamente 43 kDa y 80 kDa, pudiendo estas últimas corresponder a dímeros del mismo. Las electroforesis que se muestran en la figura 5 C corresponden a muestras obtenidas durante la purificación de P123 en la fracción soluble luego de cultivos de 500 ml. Se indujo al expresión a 26°C y se purificó el péptido recombinante con una columna de resina con Co(II). Aquí también puede observarse la presencia de una banda a un PM que podría corresponder a la formación de dímeros del péptido fusionado a MBP. Se cuantificó el nivel de proteínas purificadas, el cual fue de 5 mg/L de cultivo inducido.

Para el caso de los fragmentos peptídicos P12 y P3 la expresión también se realizó usando *E.coli* BL21 Codon Plus. En la figura 5 (D y E) se muestran los resultados de la inducción de ambas construcciones realizadas a baja escala y a 37°C. Como puede observarse, los fragmentos recombinantes P12 y P3 lograron expresarse en *E.coli* BL21 Codon Plus a 37°C, y corresponden a proteínas de masa molecular aproximada de 14-16 kDa. Además, se pudo observar expresión luego de 5 hs de inducción para el fragmento P3 (figura 5E), por ser de menor tamaño que P12, del cual sólo se observó expresión a tiempos posteriores (figura 5D).

**\* Inmunoensayos empleando los péptidos recombinantes**

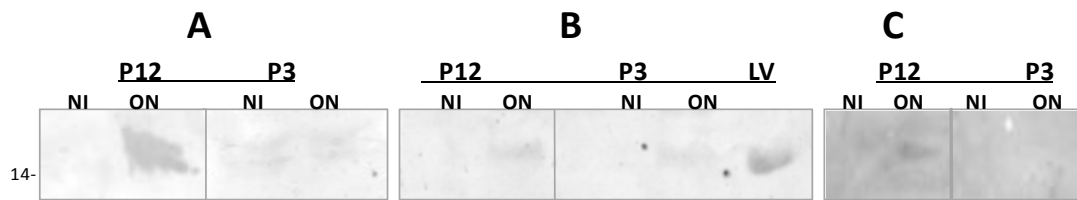
Se evaluó la reactividad inmunoquímica del fragmento P123 recombinante purificado frente a anticuerpos específicos de PLV por inmunobloting. En la **figura 6** se observan los resultados empleando un antisuero policlonal obtenido en cabra específico de PLV (**A**), distintos anticuerpos monodonaes específicos de caseínas bovinas, 1D5 ( $\alpha$ -caseína) (**B**) y 4C3 ( $\beta$ -caseína) (**C**) y un suero de paciente alérgico a PLV con IgE específica (**D**).



**Figura 6. Inmunobloting de P123 frente a diversos anticuerpos específicos de PLV.** **A)** Suero de cabra anti-PLV; **B)** 1D5 o anticuerpo monoclonal específico de  $\alpha$ -caseína; **C)** 4C3 o anticuerpo monoclonal específico de  $\beta$ -caseína; **D)** IgE de suero de individuo con ALV, **E)** MBP recombinante como control antigénico negativo revelado con el mismo suero que en D). Los pesos moleculares se indican en kDa. Las dos bandas reactivas indican el dímero que se obtuvo de la proteína P123 pura.

Se observa en los inmunobloting la presencia de dos bandas reactivas para el fragmento recombinante P123 puro frente a diversos anticuerpos específicos de PLV. Por otro lado se deduce que la reactividad inmunoquímica de las construcciones “His-MBP-P123”, se atribuye a la fracción de los péptidos exclusivamente, ya que la proteína MBP recombinante pura no fue reconocida en los inmunobloting por anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas ni por IgE de individuos con ALV, como se muestra en este caso en la **calle E**.

Para el caso de los péptidos P12 y P3 recombinantes, los cuales no se han expresado en gran escala aún y por ello no se dispone de sus fracciones purificadas, se evaluó su reactividad frente a anticuerpos monodonaes específico contra caseínas bovinas por inmunobloting de los extractos de *E.coli* de los cultivos no inducidos (**NI**) y luego de toda una noche de crecimiento en presencia de inductor IPTG (**ON**). En la **figura 7** se muestra la región del inmunobloting correspondiente al tamaño molecular de 14 kDa, donde se localizaron previamente por SDS-PAGE (figuras 5D y 5E) las bandas de expresión de los péptidos recombinantes.



**Figura 7. Inmunobloting de extractos de *E.coli* de expresión de fragmentos P12 y P3.** Región correspondiente al tamaño de 14 kDa para los extractos no inducidos (NI) e inducidos toda la noche (ON) de *E.coli* con el gen codificante para P12 y P3, respectivamente, frente a anticuerpos monoclonales específicos anti  $\alpha$ -caseína bovina (A),  $\beta$ -caseína bovina (B) y  $\kappa$ -caseína bovina (C). Se sembraron 15  $\mu$ l de extracto bacteriano por calle. LV: Leche de vaca, control antigénico positivo.

Como puede observarse, el fragmento P12 recombinante demostró reactividad frente a los tres anticuerpos monoclonales empleados, siendo claramente mayor esta reactividad con el anticuerpo monodonal específico contra  $\alpha$ -caseína bovina (**figura 7 panel A**). En el caso del fragmento P3 sólo se observó diferencia en la reactividad del extracto bacteriano inducido toda la noche respecto de la fracción no inducida con el anticuerpo monodonal específico anti-  $\beta$ -caseína (**figura 7 panel B**). La intensidad de la banda correspondiente a P12 recombinante en el extracto de cultivo inducido toda la noche (ON), fue equivalente a la de la banda correspondiente a la fracción de  $\alpha$ -caseínas presente en un extracto de PLV empleado en el mismo ensayo como control positivo. Estos resultados indican *a priori* que la reactividad en P123 observada en los ensayos de la **figura 6**, se debería a la presencia de epitopes en el fragmento P12 en común con epitopes de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas bovinas, mientras que el péptido 3, sólo compartiría epitopes con  $\beta$ -caseínas. Será necesario contar con los fragmentos purificados P12 y P3 para completar la evaluación de su reactividad por inmunobloting y ELISA frente a otros anticuerpos específicos de PLV y además para evitar el background que pudiera producir la presencia de otras proteínas propias del extracto bacteriano en este tipo de ensayos.

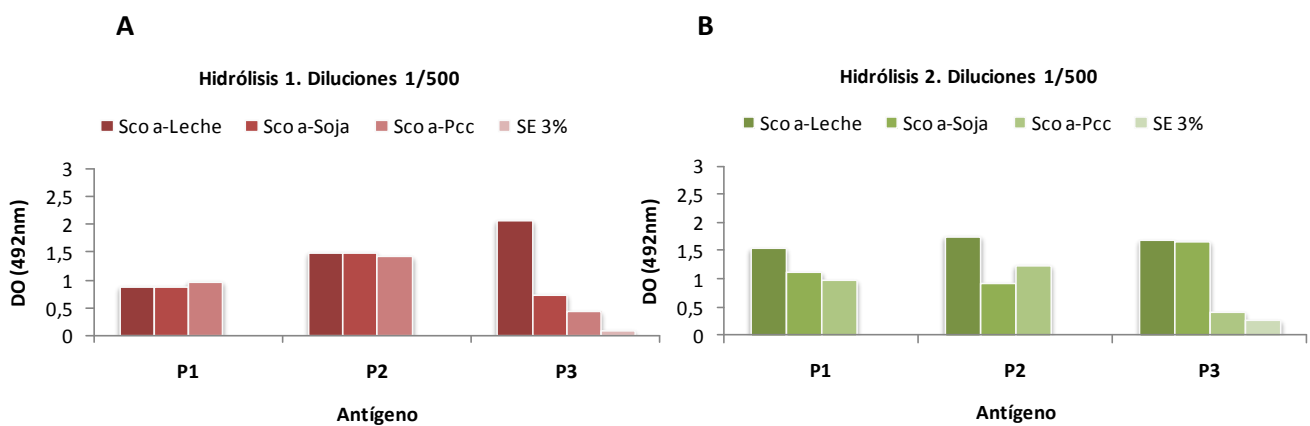
**\* Inmunoensayos empleando los péptidos sintetizados en fase sólida**

Las secuencias aminoacídicas correspondientes a los péptidos 1, 2 y 3 se obtuvieron en forma individual por síntesis en fase sólida (*spot synthesis*) adicionando de a un aminoácido por vez. Se utilizó papel de celulosa, y se ensayaron distintos métodos de hidrólisis para la desprotección de las cadenas laterales en la etapa final post-síntesis, previo a su empleo en inmunoensayos.

Estos papeles de celulosa con cada péptido unido covalentemente se bloquearon empleando distintos sistemas de bloqueo de sitios no específicos, para evitar que el anticuerpo primario se una en forma inespecífica. Además los ensayos se optimizaron en los

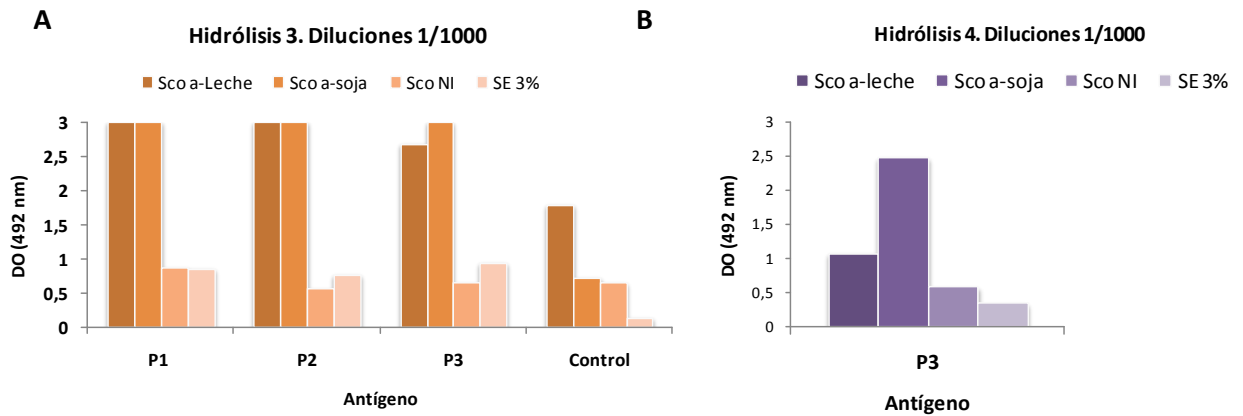
tiempos de incubación con los anticuerpos primario y secundario, y las diluciones de los mismos. En esta etapa de optimización se emplearon controles negativos: sueros de los animales pre-inmunes, antisueros obtenidos por inmunización con antígenos no relacionados con el sistema (Pcc o para-coccidiosis), y péptidos en la fase sólida con secuencias aminoacídicas no relacionadas con las de los péptidos seleccionados (poli-alanina).

En la **figura 8** se muestran los resultados de uno de los ensayos donde se compararon dos series de péptidos sintetizados de la manera descrita en Materiales y Métodos, pero bajo distintas condiciones de hidrólisis para la desprotección de grupos laterales en la etapa final de su síntesis. Como puede observarse en los gráficos, bajo estas condiciones experimentales sólo con el péptido 3 se obtuvieron resultados específicos, es decir DO altas cuando se emplearon los antisueros específicos de leche de vaca o soja, y DO bajas con el suero control o con la solución de bloqueo.



**Figura 8. Ensayo de reactividad de los péptidos sintéticos con distintas condiciones de hidrólisis, frente a antisueros policlonales de conejo. A) Hidrólisis 1:** solución de TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TIBS y Fenol. **B) Hidrólisis 2:** solución de TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y TIBS, SIN Fenol. Bloqueo con SE 5%v/v en solución fisiológica, sueros diluidos 1:500 en SE 3% en solución fisiológica (2 hs a 37°C). Revelado con anti IgG de Conejo-HRP diluido 1:3000 en SE 3%. "Sco a-Leche, Sco a-soja, Sco a-Pcc": antisueros policlonales de conejo específicos anti- PLV, proteínas de soja o paracoccidioso, respectivamente. "SE": Suero Equino. P1, P2, P3: papeles con cada uno de los péptidos sintéticos unido covalentemente.

Al modificar la dilución del anticuerpo primario (1/1000) e induir como control negativo un suero de conejo pre-inmune se obtuvieron mejores resultados para los 3 péptidos en una nueva condición de hidrólisis (**H3**), como se observa en la **Figura 9**. En este caso, una dilución 1/1000 de los anticuerpos primarios permitió tener resultados de DO elevada con los antisueros específicos de leche o soja, y DO bajas con los sueros control negativos.



**Figura 9. Ensayos de reactividad de los péptidos sintéticos con distintas condiciones de hidrólisis.**  
**A) Hidrólisis 3:** TFA, TIBS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sin Fmoc y sin Fend, **B) Hidrólisis 4:** TFA, TIBS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sin Fmoc y con Fenol.  
 Bloqueo con SE 5%v/v en solución fisiológica, sueros diluidos 1:1000 en SE 3% en solución fisiológica (2 hs a 37°C). Revelado con anti IgG de Conejo-HRP diluido 1:4500 en SE 3%. "SE": suero Equino, "Sco a-leche, Sco a-soja": sueros policlonales de conejos inmunizados con PLV ó soja, "Sco NI": suero de conejo pre-inmune. P1, P2, P3; Papeles con cada uno de los péptidos unidos covalentemente, "Control": péptido sintético negativo (poli-alanina ó secuencia aminoacídica al azar)

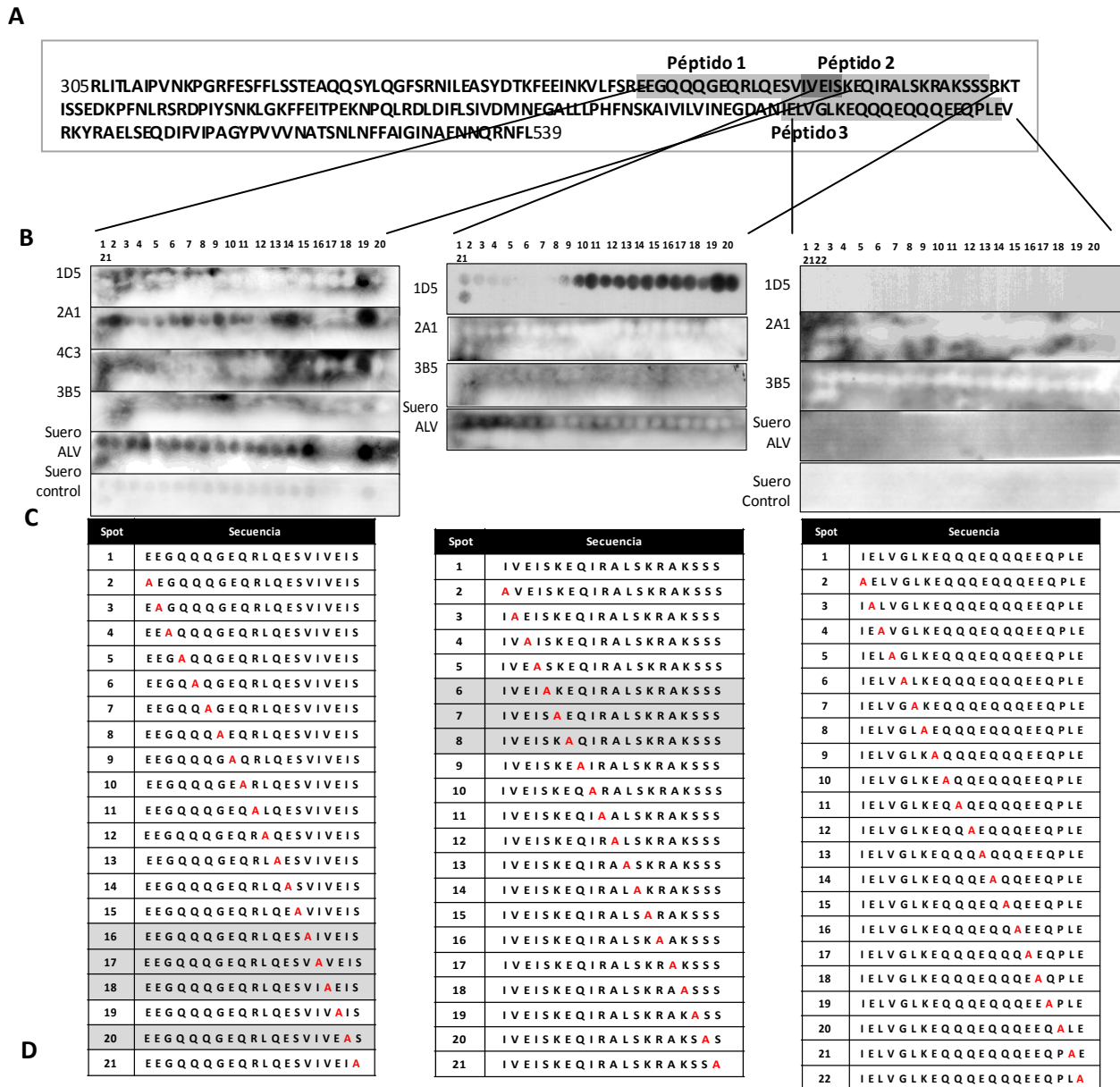
Con este inmunoensayo optimizado pudimos demostrar que los 3 péptidos seleccionados son reconocidos por anticuerpos específicos contra proteínas de leche de vaca y de soja. Como control antigénico negativo se emplearon spots que contienen péptidos sintéticos cuya composición aminoacídica es idéntica a la de P1 P2 y P3 pero en una secuencia diferente, o bien péptidos de la misma longitud constituidos únicamente por residuos de alanina (poli-ala). Al revelar estos péptidos con los antisueros específicos y el suero pre-inmune se obtuvieron DO inferiores a los spots con los péptidos P1, P2 y P3. La condición de hidrólisis 4, que sólo se evaluó para el péptido 3, y empleando los mismos anticuerpos primarios, arrojó resultados poco satisfactorios como puede verse en la **figura 9 B**, en comparación con los resultados de los péptidos obtenidos con la condición de hidrólisis 3.

**\* Identificación de aminoácidos críticos para la inmunorreactividad de los péptidos**

Para la identificación de residuos aminoacídicos críticos en la secuencia de los péptidos para la inmunorreactividad de los mismos, se sintetizaron péptidos en fase sólida en cuya secuencia se reemplaza cada posición aminoacídica por un residuo de alanina por vez. De esta manera para los péptidos de 20 aminoácidos se dispuso de una serie de 21 spots para cada péptido (para los péptidos 1 y 2), mientras que para el péptido 3 formado por 21 aminoácidos, se sintetizaron 22 spots diferentes. La reactividad de los mismos se evaluó

mediante dot-blot empleando distintos anticuerpos primarios específicos contra PLV y se reveló por quimioluminiscencia para incrementar la detectabilidad. Cabe mencionar que para cada péptido se dispuso de una membrana con la serie de péptidos en los spots, es decir membranas con 21 o 22 spots, y que la realización de stripping permitió probar distintos anticuerpos sobre la misma membrana. Como controles negativos para cada ensayo se emplearon membranas con tres spots correspondientes a péptidos con los aminoácidos de los péptidos P1, P2 y P3 pero ordenados al azar.

En la **figura 10** se presentan los resultados correspondientes al scanning de alanina de los péptidos 1, 2 y 3 con anticuerpos monodonaes específicos anti  $\alpha$ -caseína bovina (1D5),  $\beta$ -caseína bovina (2A1 o 4C3) y  $\kappa$ -caseína bovina (3B5), y con IgE proveniente de sueros representativos de individuos con ALV y pacientes control (sin ALV diagnosticada y sin IgE específica para PLV). La intensidad del spot luego del revelado de la membrana indica si la reactividad se mantiene, aumenta o disminuye al reemplazar cada aminoácido por alanina. En el esquema de la figura además, se muestra la secuencia de cada spot y se indica en rojo el residuo de alanina introducido en cada caso. Los péptidos sombreados en las tablas son aquellos en los que se observa una disminución de la reactividad respecto a los spots control con la secuencia original de cada péptido.



305RLITLAI PVNKPGRFESFLLSSTEAAQQSYLQGFNRNILEASYDTKFEIINKVLFSEEGQQQGEQRLQESVIVEISKEQIRALSKRAKSSSRKTISSEDK  
 PFLNRSRDP IYSNKL GKFFEITPEKNPQLRDLDFILSIVDMNEGALLPHFNKAI VILVINEGDANIELVGLKEQQQEQQEEQPLEV RKYRAELSEQDIF  
 VIPAGYVVVNATSNLNFFAIGINAENNQRNLF539

**Figura 10. Reactividad de los péptidos obtenidos por scanning de alanina.** Las membranas se bloquearon en SE3% en TTBS y se incubaron ON a 4°C con una dilución 1:1500 de anticuerpo monoclonal en SE al 1% en TTBS o ¼ de sueros humanos, el revelado se hizo por quimioluminiscencia. **A)** Se localizan en la secuencia de la subunidad α de la beta conglicina a la delección α-CTD, los péptidos estudiados. **B)** Dot Blot de cada membrana conteniendo el scanning de alanina del péptido indicado en A) frente a Ac monoclonales específicos contra caseínas bovinas (1D5 o anti-α1-caseína, 2A1 y 4C3 ó anti-β-caseína, 3B5 ó anti-κ-caseína) y sueros de individuos ALV y control (indicados a la izquierda de cada membrana). Cada spot se indica con un número en la parte superior de la membrana, cuya secuencia aminoacídica se muestra en C), indicando en rojo el residuo de alanina “A” que fue insertado en cada posición. Resaltado en gris se presenta la secuencia de aquellos spots que demostraron disminución de la reactividad por la presencia de alanina. **D)** Se indica en la secuencia de α-CTD en celeste los aminoácidos críticos para la reactividad con Ac monoclonales e IgE (V: valina, I:isoleucina, S:serina, K: lisina, E:ácido glutámico, Q: glutamina), y en fucsia, las posiciones donde la presencia de ala aumenta la reactividad (E: ácido glutámico, I:isoleucina, S: serina).



Con los resultados mostrados en la **figura 10** podemos concluir que ninguno de los anticuerpos evaluados reconoció los spots correspondientes al péptido 3, y que la mayor variabilidad en la respuesta la presentan los péptidos 1 y 2, por las razones que se describen a continuación. El anticuerpo monodonal 1D5, específico de  $\alpha$ S1-caseína, no presentó afinidad por prácticamente ninguna de las secuencias mutadas del P1, siendo notoria la pérdida de señal en los spots 16,17,18 y 20, es decir que, todas las posiciones en el péptido 1 son importantes para la reactividad frente a este anticuerpo monodonal, siendo críticas las posiciones 16, 17 y 18. Sin embargo, el mismo anticuerpo demostró una buena señal/afinidad por casi todas las secuencias ensayadas del P2, y la señal decae marcadamente al introducir Ala en las posiciones 4 á 8. Por lo tanto los residuos críticos compartidos con epitopes de  $\alpha$ -caseína, se encuentran en los residuos 4-8 para el péptido 2. El perfil de reactividad del anticuerpo monodonal 2A1, específico de  $\beta$ -caseína, fue opuesto al anterior, es decir, demostró afinidad por prácticamente todas las secuencias de P1, menos para las correspondientes a los spots 12, 16, 17, 18 y 19, y no reconoció ninguno de los spots del péptido P2. Lo mismo se observó con el anticuerpo monoclonal 4C3, también específico de  $\beta$ -caseína bovina. Para el caso de 3B5, específico de  $\kappa$ -caseína, no se obtuvo buena intensidad de señal para ninguno de los 2 péptidos, y por lo tanto no se pudo discernir claramente la presencia de spots reactivos o no en ninguna de las dos series de secuencias evaluadas. Al evaluar la reactividad con sueros que contienen IgE específica para PLV, se observó una gran diferencia con la reactividad obtenida empleando sueros humanos negativos como control, como era de esperar. Asimismo, para el péptido 1 todos los spots demostraron afinidad por la IgE excepto al encontrarse alanina en las posiciones de los spots 16, 17 y 18. En cambio, con el péptido 2 no se encontró una reactividad IgE similar, y sólo los primeros spots (1, 2, 3, 4) mostraron señal, siendo esta más baja en los spots 6, 7 8 y 9, y luego se obtuvo ausencia de señal en los spots subsiguientes (10 á 21).

Otro resultado a resaltar hallado es que para algunos dot-blot se obtuvo una señal mayor, en comparación con el péptido original, al reemplazar el aminoácido por alanina. Para el caso del spot 19 del péptido 1 todos los anticuerpos evaluados mostraron este efecto, como así también en el spot 14 con 2A1 e IgE. En el péptido 2 sólo se observó este efecto con 1D5 en los spots 19 y 20. Esto podría deberse a que la presencia de alanina puede favorecer la afinidad por el anticuerpo.

Finalmente, en el panel **D** de la figura 9 se indican resaltadas en color celeste las posiciones aminoacídicas de  $\alpha$ -CTD que al reemplazarlas por alanina perdieron la reactividad

por anticuerpos específicos de LV (Valina V<sup>376</sup>, Isoleucina I<sup>377</sup>, Valina V<sup>378</sup>, Isoleucina I<sup>380</sup>, Serina S<sup>381</sup>, Lisina K<sup>382</sup>, Acido glutámico E<sup>383</sup> y Glutamina Q<sup>384</sup>), y en color fucsia, las posiciones donde el reemplazo por alanina favoreció la unión de los anticuerpos (Acido glutámico E<sup>374</sup>, Acido glutámico E<sup>379</sup>, Isoleucina I<sup>385</sup>, Serina S<sup>394</sup> y Serina S<sup>395</sup>). Estos hallazgos confirman que los péptidos contienen epitopes B (G y E) y que ciertos aminoácidos son imprescindibles para que los anticuerpos se unan a ellos.

### **3.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES**

En el presente capítulo se estudió por métodos computacionales e inmunoquímicos la existencia de regiones con similitud secuencial entre las caseínas bovinas y la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina, específicamente en el extremo c-terminal comprendido en el polipéptido  $\alpha$ -CTD.

Mediante herramientas bioinformáticas se halló que existe similitud secuencial entre las caseínas bovinas y el fragmento  $\alpha$ -CTD, y que los potenciales epitopes se encuentran en el dominio C-terminal de la subunidad  $\alpha$ . Se seleccionaron tres regiones o tres “péptidos” con gran similitud con los epitopes presentes en caseínas bovinas y fueron analizadas por distintos métodos.

Como primera aproximación, se enfocó el análisis a la identificación de epitopes lineales. Las tres regiones ó péptidos seleccionados, se sintetizaron y emplearon en ensayos inmunoquímicos para evaluar si contienen epitopes B. Como se mencionó anteriormente sostenemos que la reactividad cruzada es debida a la presencia de secuencias aminoacídicas conservadas entre proteínas, descartándose la posibilidad que estos epitopes compartidos estén conformados por hidratos de carbono.

El fragmento P123 fusionado a Maltosa Binding Protein (MBP) se expresó en BL21 Codón Plus y se obtuvieron buenos rendimientos al purificar con Co(II). Sin embargo, se observó en los perfiles por SDS-PAGE la formación de un dímero, ya que junto a la banda mayoritaria de 43 kDa correspondiente a MBP-P123 se observó una banda del doble de peso molecular relativo. Tanto el monómero MBP-P123 como el dímero fueron reconocidos en forma específica por los distintos anticuerpos específicos de PLV evaluados, por eso se observan dos bandas reactivas. Se descartó la posibilidad que dicha reactividad fuera causada por MBP. En principio, se puede inferir con estos resultados que los péptidos denominados en este trabajo 1, 2 y 3, son reactivos frente a anticuerpos específicos anti- PLV y podrían contener los epitopes responsables de la reactividad cruzada observada. Para evaluar la reactividad de estos péptidos recombinantes en forma independiente, se logró obtener las secuencias de los péptidos P1 y P2 juntos (ya que sus secuencias están solapadas) y en otra construcción, el péptido P3, las cuales lograron expresarse en *E.coli* BL21 Codon Plus. Se evaluó la reactividad inmunoquímica de las fracciones presente en el

extracto bacteriano inducido frente a anticuerpos monodonaes específicos anti caseínas bovinas, observándose reactividad en el fragmento P12 frente a anticuerpos monoclonales contra  $\alpha$ - $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas, y en el péptido 3 únicamente contra un anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -caseína. Dado que por scanning de ALA no se observó reactividad con el anticuerpo monodonal específico de  $\kappa$ -caseínas con los péptidos 1 y 2, y que P12 recombinante reacciona con este anticuerpo, se puede inferir que existe un epítopo conformacional que puede ser evidenciado por 3B5.

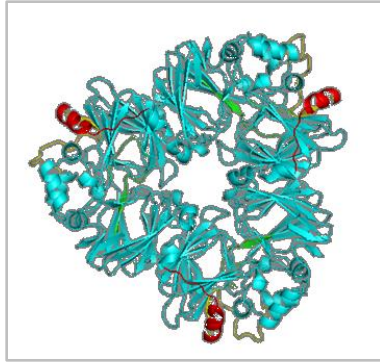
La metodología alternativa que nos permitió obtener cada uno de los péptidos en forma independiente fue la síntesis química sobre papel de celulosa. Las etapas sintéticas comunes para todos los spots se llevaron a cabo empleando sucesivas reacciones de desprotección-acoplamiento según metodología Fmoc (Hilpert, Winkler, and Hancock 2007; Frank 2002). El control de pureza y caracterización estructural de los péptidos se realizó por HPLC-Masas y UV-MALDI-TOF. Mediante ensayos del tipo EAST, empleando anticuerpos específicos contra PLV o contra soja logramos evidenciar su reactividad inmunoquímica. Por lo tanto, considerando la reactividad con anticuerpos monoclonales específicos anti-caseínas bovinas e IgE de individuos con ALV de los tres péptidos recombinantes (P123) observada por inmunoblotting y la reactividad de los péptidos sintéticos frente a sueros policlonales de conejo, se puede concluir que los tres péptidos contienen epítopes B (epítopes G y E) que son reconocidos por anticuerpos específicos contra PLV y soja. Por ello, concluimos que estos péptidos contienen secuencias aminoacídicas que se comportan como epítopes de reactividad cruzada con PLV.

Posteriormente se identificaron posiciones aminoacídicas críticas para la inmunoreactividad de los mismos por reemplazo individual de cada aminoácido por un residuo de alanina. Se obtuvieron resultados concluyentes para los péptidos 1 y 2 en los cuales se determinó ciertas posiciones críticas para el reconocimiento por los distintos anticuerpos: Val<sup>376</sup>, Ile<sup>377</sup>, Val<sup>378</sup>, Ile<sup>380</sup>, Ser<sup>381</sup>, Lys<sup>382</sup>, Glu<sup>383</sup> y Gln<sup>384</sup>. Estos aminoácidos son polares (ácidos y básicos) o hidrofóbicos (Val, Ile) por lo cual sostenemos que son importantes desde el punto de vista estructural para mantener la conformación del epítopo, y además permiten que estén ubicados en la interfase con el medio acuoso en el que se encuentran los anticuerpos con los cuales van a interactuar. Por otro lado, se detectaron otras posiciones en los péptidos 1 y 2 (Glu<sup>374</sup>, Glu<sup>379</sup>, Ile<sup>385</sup>, Ser<sup>394</sup> y Ser<sup>395</sup>) que al ser ocupadas por residuos de alanina favorecieron la interacción con el anticuerpo, quizás debido al cambio de un aminoácido polar por otro no polar como alanina, y porque coincidentemente algunas de

estas posiciones (Glu<sup>374</sup>, Glu<sup>379</sup>, Ile<sup>385</sup>) son adyacentes a los residuos críticos donde se vio pérdida de unión. Recientemente se ha descrito que existen ciertos fragmentos en común entre alérgenos con una distribución característica de aminoácidos, donde residuos cargados como alanina o glicina suelen ubicarse en el centro del epítipo y los residuos aromáticos como prolina y cisteína se localizarían en los extremos, que no se ha encontrado en proteínas no alérgicas (Asakawa et al. 2010). Esto también explicaría el incremento de reactividad en algunos spots por la presencia de alanina.

En resumen, los tres péptidos poseen epítopos que fueron reconocidos por anticuerpos específicos contra PLV y soja presentes en antisueros policlonales obtenidos en conejo, pero sólo los péptidos 1 y 2 mostraron reactividad específica frente a anticuerpos monodonaes anti- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas (por inmunoblotting de péptidos recombinantes y scanning de alanina). El péptido 3 sólo mostró reactividad frente al anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -caseína por inmunoblotting del péptido recombinante, pero no mostró reactividad alguna por scanning de alanina. Esto coincide con los resultados del análisis *in silico*, donde el péptido 3 presenta mayor similitud secuencial con epítopos descritos de  $\beta$ -caseína y  $\alpha$ -caseína y coincide en sólo 1 o 2 residuos con epítopos descritos de  $\kappa$ -caseína bovina (**figuras 1 y 3**).

A partir de la cristalización de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina se conoce su estructura tridimensional y sobre la base de esta información, y conociendo la homología secuencial con la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina, se modeló la estructura tridimensional de subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina como se describió en Materiales y Métodos (sección 5.1). Como se muestra en la **figura 11**, el modelado de esta proteína permitió observar que los tres péptidos seleccionados se localizan en regiones expuestas al medio, y cercanas al sitio de unión entre monómeros del homotrímero. La presencia de los mismos en la superficie de la molécula permite comprender la accesibilidad y unión de anticuerpos específicos. Por otro lado, la oligomerización de esta molécula permite suponer *a priori* que en el trímero existen al menos 3 epítopos iguales a través de los cuales este complejo podría entrelazar moléculas de IgE unidas a sus receptores específicos en la superficie de mastocitos, basófilos o eosinófilos, y de esta manera inducir su activación.



**Figura 11. Modelo del homotrímero de la subunidad  $\alpha$  obtenido por PyMol con la localización de los péptidos en el mismo. En amarillo se indica el péptido 1, en rojo el péptido 2 y en verde, el péptido 3.**

Estudios similares se han reportado para otros alérgenos. En un trabajo recientemente publicado, el clonado y expresión del alérgeno de LV  $\alpha$ 1-caseína recombinante permitió evaluar su alérgenicidad e identificar epítopes lineales. El componente recombinante fue reconocido por IgE presente en más del 50% de los sueros de individuos con síntomas manifiestos de ALV. La ventaja del empleo de este alérgeno en forma recombinante reside que cuando se lo purifica a partir de la fuente natural, co-purifica con  $\alpha$ 2-caseína y por lo tanto no se puede discernir si la reactividad es contra  $\alpha$ 1-caseína o contra  $\alpha$ 2-caseína. Además, mediante el empleo de péptidos solapados que cubren la secuencia de  $\alpha$ 1-caseína lograron identificar varios epítopes IgE secuenciales (Schulmeister et al. 2009). Sin embargo, aunque los epítopes IgE secuenciales o lineales parecen ser relevantes en ciertas alergias alimentarias y estos métodos de mapeo de epítopes han permitido identificar alérgenos de LV, maní o huevo (Spuerger et al. 1997; P Chatchatee, K M Järvinen, L Bardina, L Vila, et al. 2001; Lemon-Mulé et al. 2008; Palmer and Wesley Burks 2006), en algunos casos no permiten evidenciar la unión a IgE, particularmente en estudios de interacción antígeno/anticuerpo en fase fluida (Albrecht et al. 2009). Estos resultados sugieren que también los epítopes conformacionales son importantes en el reconocimiento de la IgE y que la disposición espacial de los epítopes lineales, determinada por la conformación del alérgeno, suele ser crítica en la unión de los anticuerpos IgE para producir el entrecruzamiento de los mismos y la inducción de las señales intracelulares de activación celular.

Luego, dependiendo de la aproximación experimental empleada para la identificación de epítopes y la unión de anticuerpos a los mismos, los resultados obtenidos pueden ser muy diferentes. Por ello, resulta relevante emplear métodos que reflejen aún mejor la alérgenicidad *in vivo* que los ensayos en fase sólida, y en este sentido son de utilidad los ensayos de unión a IgE en fase fluida como ELISA de inhibición, ensayos de activación de

basófilos, o el empleo de modelos animales de alergia (Takai et al. 2005; Naoki Matsumoto et al. 2009; Pecquet et al. 2000).

*En conclusión, estos resultados demuestran que existen epitopes lineales en la molécula de  $\alpha$ -CTD, aunque no podemos concluir si se trata de 1, 2 ó 3 epitopes. Tampoco se descarta la posibilidad de que sean conformacionales dado que la predicción in silico permitió identificarlos en la superficie de la molécula. Al menos hemos identificado una región de aminoácidos críticos para la reactividad cruzada entre los péptidos 1 y 2, e independientemente de si trate de un anticuerpo IgG o IgE éste es capaz de reconocerlo en la superficie de la molécula nativa. Los resultados que se mostrarán en el capítulo siguiente ayudarán a comprender la importancia de estos epitopes como epitopes E.*

## Capítulo 4

### Estudio *in vivo* de la reactividad cruzada entre alergen<sup>os</sup> de leche de vaca y soja

---





#### **4.1 INTRODUCCION**

En este capítulo analizaremos la reactividad cruzada alérgica *in vivo* empleando un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca. En la actualidad, los **modelos animales de enfermedades alérgicas son muy** importantes para estudiar diferentes aspectos moleculares y celulares de las fases inductora (sensibilización alérgica) y efectora (instauración del proceso inflamatorio), como así también para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas. En estos modelos lo que se busca es inducir la producción de IgE específica y la instauración de mecanismos de hipersensibilidad luego de un desafío alérgico. Dado que los ratones (modelo animal más empleado) no desarrollan en forma natural alergias, ésta debe inducirse artificialmente, lo cual limita los alcances de los estudios relacionados con los mecanismos de sensibilización o fase inductora. En ratones, la respuesta fisiológica frente a un antígeno que ingresa por el tracto gastrointestinal es la tolerancia inmunológica con la generación de linfocitos T específicos con actividad regulatoria. Por lo tanto, en los modelos murinos de alergia se aplican distintos protocolos de sensibilización, que incluye el uso de adyuvantes, donde se busca alterar los mecanismos fisiológicos de tolerancia (Ricki M Helm and A Wesley Burks 2002). En nuestro modelo de alergia alimentaria empleamos un adyuvante mucosal pro-Th2 (toxina colérica) y en dosis repetitivas por vía oral junto al alérgeno. De esta manera logramos inducir signos clínicos y sistémicos post desafío oral, similares a los que se observan en un individuo con alergia a leche de vaca.

En los últimos años se han producido importantes avances en la creación de este tipo de modelos animales de alergia alimentaria en otras especies como rata, perro o cerdos y en todos los casos se logran reproducir diferentes aspectos de la patología observada en humanos (Atkinson and Miller 1994; Kitagawa et al. 1995; Ermel et al. 1997; X M Li et al. 1999). Disponer de estos modelos y la creciente información sobre la fisiología del sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal ha posibilitado una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos e inmuno-regulatorios que operan en las alergias alimentarias. Esto ha permitido plantear y estudiar un variado abanico de terapias a aplicar en el futuro en pacientes con alergias alimentarias (Cardoso et al. 2008; Mübeccel Akdis and Cezmi A Akdis 2009; Ganeshan et al. 2009; Broide 2009).

Por otro lado, los ratones se han constituido en la especie indicada para los modelos animales aplicados al estudio de las enfermedades alérgicas por distintos motivos: disponibilidad de reactivos, en especial de anticuerpos específicos contra distintas proteínas de interés inmunológico, facilidad para su reproducción y mantenimiento, existencia de numerosas y variadas cepas, y por la posibilidad de emplear animales modificados genéticamente (transgénicas y knock out para distintos genes relacionados con la fisiología del sistema inmune) (Ricki M Helm and A Wesley Burks 2002; Dearman and Kimber 2009; Finotto et al. 2002). En particular, el modelo de alergia a proteínas de leche bovina que hemos optimizado en la cepa BALB/c guarda numerosas similitudes con la patología observada en humanos: el desafío oral induce signos clínicos locales y sistémicos compatibles con la activación de mastocitos y basófilos de manera IgE-dependiente (Wanich et al. 2009), durante la sensibilización/activación del sistema inmune se induce una respuesta inmune humoral con la síntesis de isotipos de inmunoglobulinas asociadas con una activación Th2 (Vandezande et al. 1999; Kirsten Beyer et al. 2002; Shek et al. 2005), incremento en los niveles de histamina en sangre (Bengtsson et al. 1997), inducción de la proliferación de LT específicos con fenotipo Th2 en bazo y en la mucosa duodenal (Schade et al. 2000), incremento en los niveles de IL-5 e IL-13 (Kirsten Beyer et al. 2002), inclusive no se observa una inhibición en la producción de IFN- $\gamma$  tal como se ha descrito en humanos (D E Campbell, D J Hill, and Kemp 1998), etc.

Este tipo de modelos también ha sido empleado para comparar la alergenicidad de diferentes alimentos, o componentes del mismo, ya sea por estar modificados genéticamente, por poseer neoantígenos, o para estudiar la posible reactividad cruzada entre alérgenos relacionados. El empleo de los modelos animales para predecir la alergenicidad de un alimento no está aceptado por la Comisión del Codex Alimentario (Organización Mundial de la Salud) ni por la Food and Agricultural Organization (FDA-USA), debido a la ausencia de modelos validados (Goodman et al. 2008; Lehrer and G A Bannon 2005; Gizzarelli et al. 2006). En este trabajo hemos empleado el modelo de alergia a proteínas de leche de vaca inducido en la cepa de ratones BALB/c como una herramienta *in vivo* para confirmar la reactividad inmunoquímica cruzada descrita anteriormente.

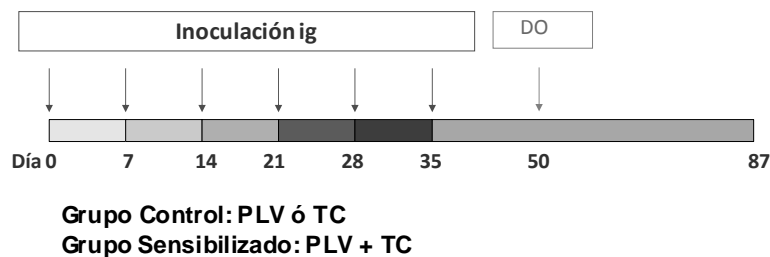
#### **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Sensibilizar ratones BALB/c mediante la administración intra-gástrica en forma repetitiva del antígeno junto a toxina colérica, de manera de disponer de un modelo murino de alergia alimentaria IgE-dependiente a proteínas de leche de vaca.
- Analizar la inducción de componentes específicos para proteínas de leche bovina (anticuerpos y linfocitos T) y de signos clínicos compatibles con reacciones de hipersensibilidad, luego del desafío oral con proteínas de soja.

### 4.3 RESULTADOS

#### \* Plan de inmunización por vía intragástrica

Ratones machos BALB/c de 5 semanas de edad fueron inoculados por vía intragástrica con una solución de 20 mg de PLV en buffer bicarbonato (lote de animales **control PLV**), o con 10 µg de toxina colérica (lote de animales **control TC**), o con una solución de 20 mg de PLV y 10 µg de toxina colérica como adyuvante mucosal (lote de animales **sensibilizados**). En todos los lotes se realizó un plan de sensibilización consistente en una administración semanal durante 6 semanas (**figura 1**). Luego de 15 días de la última inoculación, se realizó el **desafío oral** (DO) únicamente con el antígeno, empleando PLV o extracto total de proteínas de soja (S). Durante el plan de sensibilización se obtuvieron distintos tipos de muestras y finalmente en el día 87 los animales fueron sacrificados.



**Figura 1. Esquema del plan de inmunización.** Se indican los días en que se realizó cada inoculación por vía intragástrica (ig) con las flechas. El lote de ratones control fue inoculado con PLV (20 mg) o con TC (10 µg), y el lote de ratones sensibilizados, con PLV y toxina colérica (PLV +TC). En el día 50 se realizó el desafío oral en animales de ambos grupos. Día 87, se indica la muerte de algunos animales de ambos lotes para extracción de bazo e intestino. **DO:** desafío oral; **TC:** toxina colérica.

#### \* Desafío oral y evaluación de los signos clínicos

Luego de 15 días de la última inmunización, se realizó un desafío oral, administrando PLV o S en buffer bicarbonato, y en algunos animales se realizó un doble desafío oral, administrándoles la solución de proteínas de soja al día siguiente del desafío con PLV (Grupo PLV/Soja). Los signos clínicos observados inmediatamente después del desafío oral fueron evaluados por distintos observadores simple ciego y se le asignó un score (número de 0 a 5) que se correlaciona con la severidad de los síntomas (tabla de la **figura 2**) considerando los signos clínicos que se observan en pacientes con alergia alimentaria.

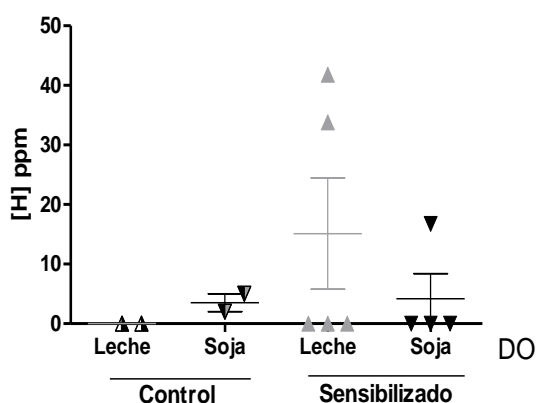


**Figura 2. Evaluación de los síntomas clínicos producidos por el desafío oral con PLV (20 mg), con proteínas de Soja (5mg) o ambas PLV/Soja, en animales de los grupos Control (PLV o TC) y Sensibilizado (PLV+ TC). Se grafica el promedio de scores clínicos observados para cada DO en cada lote de animales. La tabla indica la referencia de cada valor del score clínico.**

Como puede observarse, los ratones sensibilizados mostraron signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria al ser desafiados con PLV y/o S, mientras que los ratones del lote control no mostraron signos clínicos luego del DO. La mayoría de los animales sensibilizados presentó rascado, agitación, aumento de la frecuencia respiratoria, disminución de la actividad o falta de respuesta al ser tocados. No se indujeron signos graves como convulsiones o muerte.

**\* Determinación de niveles de histamina plasmática**

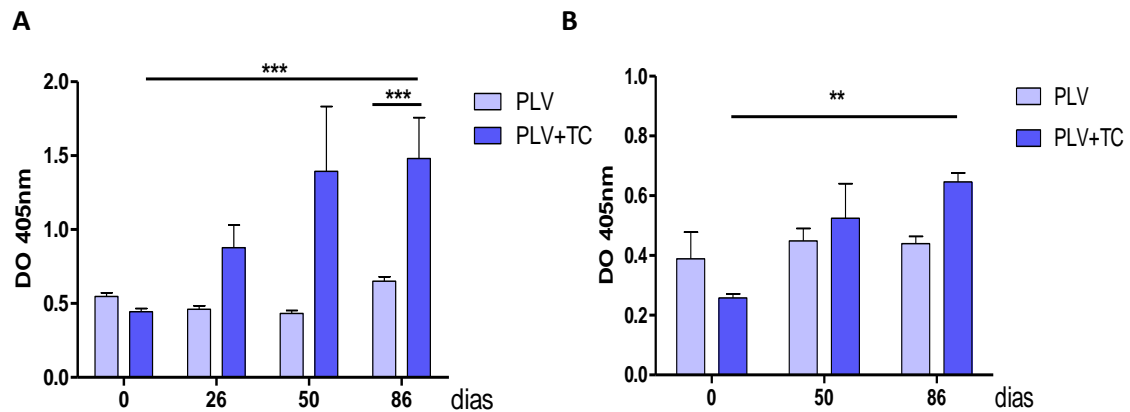
Como parámetro experimental que refleja la inducción de signos clínicos sistémicos se cuantificó la concentración de histamina plasmática en los distintos animales luego del desafío oral con PLV o S. Como puede observarse en la **figura 3**, en los animales del lote sensibilizado los niveles de histamina son superiores a los de los ratones de los lotes control. Estos resultados reflejan la inducción de un proceso inflamatorio local (mucosa gastrointestinal) y sistémico (en circulación) frente a una nueva exposición al antígeno por vía oral.



**Figura 3. Determinación de niveles de histamina plasmática por ELISA. 30 minutos luego del desafío oral con Leche o Soja a ratones del grupo Control y Sensibilizado, se extrajo sangre para la determinación de los niveles de histamina mediante un kit comercial. Se grafica la concentración de histamina en ppm vs. el desafío oral (DO) realizado en cada lote de animales.**

**\* Caracterización in vitro de la respuesta inmune durante el plan de inmunización**

Se evaluó la presencia de anticuerpos séricos específicos en muestras obtenidas durante el plan de sensibilización. En la **figura 4** se presentan los resultados de anticuerpos IgE específicos obtenidos por EAST.

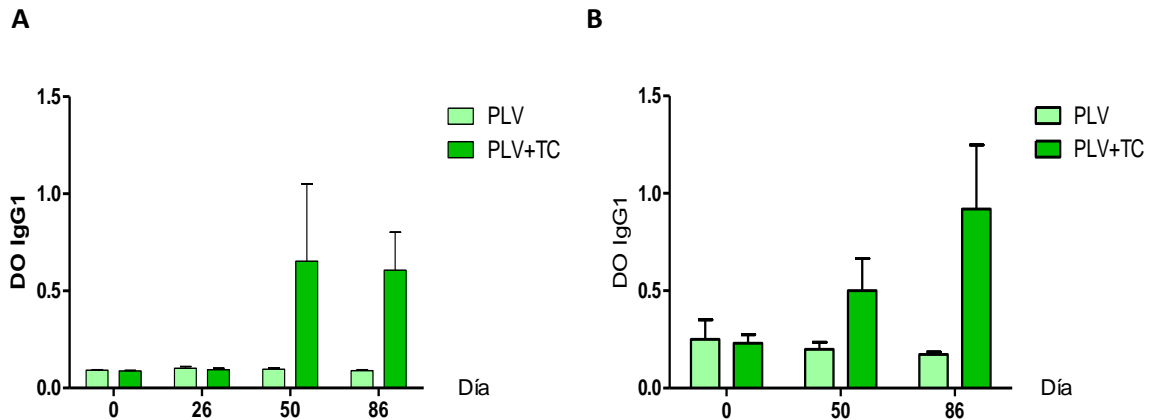


**Figura 3. Determinación de IgE por EAST en sueros de ratones control (PLV) y sensibilizados (PLV+TC) obtenidos en distintas etapas del plan de inmunización. A) IgE específica para PLV. Ag inmovilizado en papel: solución de PLV 1,75mg/ml. B) IgE de reactividad cruzada con soja. Ag inmovilizado en papel: ETS 0,5 mg/ml. Valores promedio de DO (405nm)± DS (\*\*\*) p<0,005, \*\* p<0,01).**

Como puede observarse, durante la sensibilización se produjeron anticuerpos IgE específicos de PLV (**panel A**), que también reconocieron por reactividad cruzada proteínas del extracto de soja (**panel B**). Los ratones del lote control mostraron niveles basales de IgE específica que no se incrementaron con el tiempo. Si se comparan los valores de DO para los anticuerpos específicos de soja y de PLV puede apreciarse valores inferiores para el caso de IgE específica de soja. Deben considerarse dos aspectos que influyen en estas diferencias, por un lado, la concentración de proteínas de soja en fase sólida debió reducirse respecto de la de PLV en 3,5 veces para lograr una sensibilidad del ensayo tal que permitiera diferenciar la respuesta de ambos lotes de animales, y por otro lado, en el ensayo de la **figura 4 A** se observa la reactividad de anticuerpos IgE específicos de PLV frente al Ag identidad, mientras que en el ensayo de la **figura 4 B**, se identifican aquellos anticuerpos IgE específicos de PLV que presentan reactividad cruzada con epitopes presentes en soja.

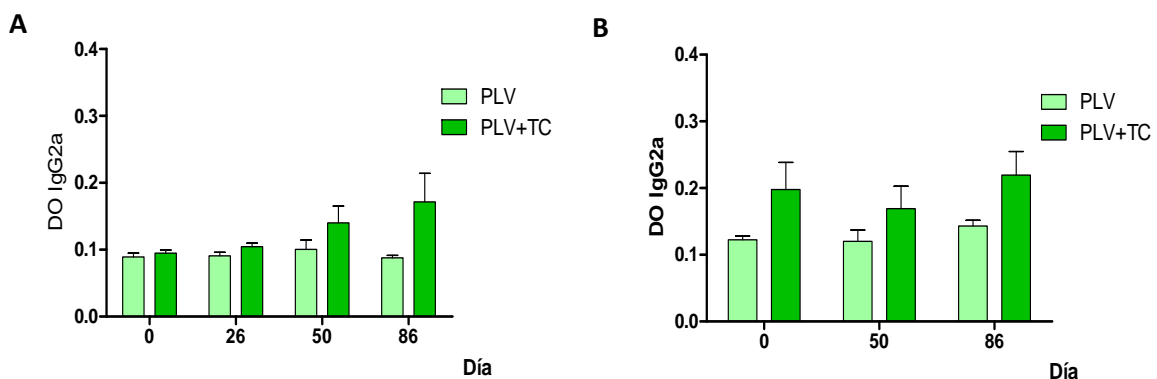
La presencia de anticuerpos de isotipo IgG específicos para PLV y S fue analizada por ELISA indirecto en los sueros obtenidos durante el plan de inmunización. En la **figura 5** se muestran los resultados de **IgG1** específicos. Como puede observarse se indujo IgG1 específicos de PLV (**panel A**) y de soja (**panel B**) en el tiempo en el lote de ratones

sensibilizados, mientras que los animales del lote control mantuvieron valores basales. Cabe destacar que la aparición de IgG1 específica en el suero es posterior a la de IgE.



**Figura 5. Determinación de IgG1 por ELISA indirecto en sueros de ratones control (PLV) y sensibilizados (PLV+TC) obtenidos en distintas etapas del plan de inmunización. A) IgG1 específica para PLV. Ag inmovilizado 1 $\mu$ g/well de PLV. B) IgG1 de reactividad cruzada con soja. Ag inmovilizado ETS 1 $\mu$ g/well. Valores promedio de DO (492nm) $\pm$  DS.**

Por el contrario, como se muestra en la **figura 6**, no se observó inducción en la producción de anticuerpos de isotipo **IgG2a** específicos para PLV o soja en los ratones del lote de sensibilización.

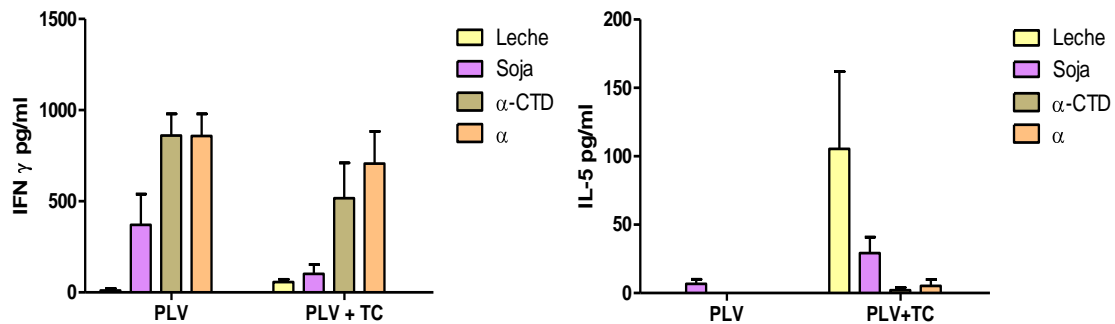


**Figura 6. Determinación de IgG2a por ELISA indirecto en sueros de ratones control (PLV) y sensibilizados (PLV+TC) obtenidos en distintas etapas del plan de inmunización. A) IgG2a específica para PLV. Ag inmovilizado 1 $\mu$ g/well de PLV. B) IgG2a de reactividad cruzada con soja. Ag inmovilizado ETS 1 $\mu$ g/well. Valores promedio de DO (492nm) $\pm$  DS.**

Estos resultados claramente indican que la administración intragástrica de TC junto a PLV induce la síntesis de isotipos asociados a una respuesta Th2. La aparición de IgE e IgG1 específicos de proteínas de soja sólo puede explicarse por reactividad cruzada entre ambos sistemas proteicos dado que los animales sólo fueron sensibilizados con PLV. En el caso que el alimento contenga proteínas de soja (información desconocida) la respuesta de los ratones sería la de inducción de tolerancia oral, por lo cual no se incrementarían los isotipos asociados a una respuesta Th2.

**\* Producción de citoquinas en cultivo de esplenocitos**

Al día siguiente del desafío oral algunos animales fueron sacrificados (lote control y lote sensibilizados), se extrajo el bazo, se preparó una suspensión de células mononucleares y se realizó un ensayo de proliferación antígeno-específico. En el sobrenadante de los cultivos se determinó la presencia de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-5) como marcadores de una respuesta inmune humoral local Th1 o Th2 respectivamente. Se optimizó el ensayo de proliferación empleando distintos estímulos y en distintas concentraciones, eligiéndose las diluciones de trabajo: PLV (2000  $\mu\text{g/ml}$ ), ETS (400  $\mu\text{g/ml}$ ), subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (180  $\mu\text{g/ml}$ ) y el polipéptido  $\alpha$ -CTD (176  $\mu\text{g/ml}$ ) recombinantes. Se mantuvo el cultivo durante 72hs y luego se cuantificó las citoquinas por un ELISA de captura comercial.



**Figura 7. Producción de citoquinas IFN  $\gamma$  e IL-5 por esplenocitos de ratones control (PLV) y sensibilizados a leche bovina (PLV+TC), en sobrenadante de cultivo luego de 72 hs de estimulación con Leche (PLV: 1000  $\mu\text{g}$ ), Soja (ETS:200 $\mu\text{g}$ ), alfa recombinante ( $\alpha$ :90  $\mu\text{g}$ ) y  $\alpha$ -CTD recombinante ( $\alpha$ -CTD: 88 $\mu\text{g}$ ).**

Cómo se observa en los gráficos de la **figura 7**, en los ratones sensibilizados con TC y PLV se indujo la producción de IL-5 tanto en esplenocitos cultivados con PLV como con proteínas de soja. Estos resultados reflejan la presencia de LT Th2 específicos de PLV que también reconocen péptidos en las proteínas de soja por reactividad cruzada. El hecho que la subunidad  $\alpha$  o  $\alpha$ -CTD de soja no induzcan claramente la secreción de IL-5 puede deberse a un problema de concentraciones en el cultivo. Cuando en el cultivo se empleó el extracto de PLV como estímulo los niveles de IL-5 fueron elevados.

Independientemente de la respuesta observada para IL-5, para el caso de IFN- $\gamma$ , se observaron niveles elevados en los esplenocitos provenientes de animales control y sensibilizados, frente a los distintos estímulos empleados. Estos mismos resultados pueden hallarse en la bibliografía para individuos normales o incluso pacientes alérgicos a leche de vaca (ver discusión).

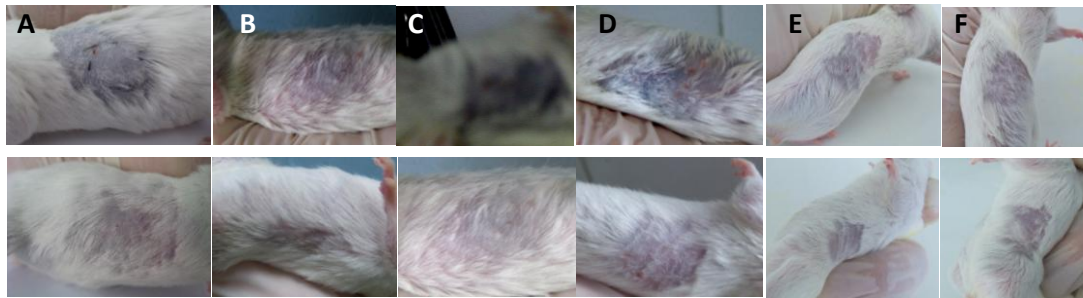


Estos resultados indican que la administración intragástrica de TC junto a PLV induce la activación de LT y su diferenciación a LT Th2. Dado que los animales no fueron sensibilizados con proteínas de soja, los resultados hallados con este antígeno sólo pueden explicarse por reactividad cruzada entre las distintas proteínas.

**\* Caracterización in vivo de la respuesta inmune inducida**

Para evidenciar la inducción de anticuerpos de isotipo IgE específicos de PLV se estudió la presencia de mastocitos sensibilizados en piel frente a la administración de distintos antígenos. Para ello se realizó **prueba cutánea** en ratones pertenecientes a los lotes control y sensibilizado. Sobre un flanco del lomo del ratón se realizó una inoculación subcutánea con el antígeno a ensayar diluido en solución fisiológica estéril (SF), y del lado opuesto, una inoculación con solución fisiológica como control. Al mismo tiempo se administró azul de Evans por vía endovenosa (cola) para evidenciar la extravasación del mismo como indicador de la instauración de un proceso inflamatorio local. La aparición de color azul en el sitio de inoculación del antígeno a los 15-20 minutos es indicativa de la activación y degranulación de los mastocitos cutáneos, consecuencia del entrecruzamiento de los anticuerpos IgE presentes en la superficie de la célula por parte del antígeno. Cabe aclarar que pruebas de este tipo se aplican en humanos como métodos diagnóstico complementario de reacciones alérgicas IgE-mediadas.

Las fotos de la **figura 8** muestran los resultados de las pruebas cutáneas realizadas con PLV (**fig. 8A**) y con proteínas de soja (**fig.8 B, C, D**). Como pruebas control se realizaron los mismos ensayos en ratones de los lotes control (**fig.8 E y F**) y prueba cutánea con antígenos no relacionados con PLV (arroz) en los ratones sensibilizados con PLV (resultados no mostrados).



**Figura 8. Prueba de hipersensibilidad cutánea inmediata a distintos antígenos en ratones sensibilizados a PLV y no sensibilizados.** Panel superior: pruebas positivas, panel inferior: prueba negativa frente a SF (control) en el mismo animal. **A)** PLV (200µg), **B)** Soja (ETS 400µg), **C)** Subunidad  $\alpha$  recombinante (100 µg), **D)**  $\alpha$ -CTD recombinante (100 µg), **E)** PLV en un ratón del grupo control, **F)** Soja en un ratón del grupo control.

Es importante resaltar que las distintas proteínas de soja recombinantes fueron capaces de activar mastocitos, lo cual indica que al menos tienen dos epitopes iguales o distintos con capacidad de puentear anticuerpos IgE de reactividad cruzada en la superficie de los mastocitos.

Aunque la foto que muestra los resultados cuando se empleó la subunidad  $\alpha$  (**figura 8C**) no es de la calidad adecuada, además de la extravasación del colorante se pudo observar signos dínicos indicativos de una inflamación sistémica inducida por la inoculación local de la proteína recombinante (hiporreactividad, rascado, aumento de la frecuencia respiratoria y temblores).

Por lo tanto estos resultados también confirman que el plan de sensibilización aplicado induce la síntesis de anticuerpos IgE específicos de PLV y de reactividad cruzada capaces de unirse a su receptor específico en la superficie de los mastocitos. Estos al contactar el antígeno se activan, degranulan e inducen un proceso inflamatorio local y sistémico, similar al que se produce en humanos cuando se desafía la piel de un paciente alérgico a la leche bovina con el alérgeno específico.

#### **4.4 DISCUSION Y CONCLUSIONES**

Habiéndose descripto y caracterizado la reactividad cruzada *in vitro* entre PLV y proteínas de soja (naturales y recombinantes) en los capítulos precedentes, se planteó la aplicación de un modelo murino de alergia alimentaria a PLV para estudiar la reactividad cruzada con proteínas de soja *in vivo*.

En trabajos anteriores del grupo, y a diferencia de otros autores (X M Li et al. 1999; X M Li et al. 2000; Morafo et al. 2003), hemos demostrado que en ratones Balb/c la administración intragástrica del antígeno junto a toxina colérica induce una respuesta inmune Th2-dependiente en la mucosa gastrointestinal y sistémica, y que la posterior administración oral del antígeno genera una reacción alérgica en forma similar a lo que ocurre en pacientes con alergia alimentaria. Otros grupos también han demostrado que optimizando las cantidades de antígeno y adyuvante a administrar por vía intragástrica es posible inducir un cuadro dínico similar al de una alergia alimentaria con síntomas locales y sistémicos (Adel-Patient et al. 2003; Adel-Patient et al. 2005). Por lo tanto nuestro objetivo fue aplicar este modelo para inducir anticuerpos IgE y LT específicos anti PLV para luego evaluar si estos receptores antigénicos tienen capacidad de reconocer epitopes B y T presentes en proteínas de soja.

Luego del desafío oral con PLV o con el extracto proteico de soja observamos a los pocos minutos la aparición de signos clínicos compatibles con una reacción alérgica. Concomitantemente, los niveles de histamina plasmática en sangre se elevaron, los animales desarrollaron elevados niveles de IgE e IgG1 específicos, esplenocitos rea-activados *ex-vivo* en forma Ag-dependiente secretaron IL-5 y las pruebas cutáneas resultaron positivas en estos ratones. Estos resultados en conjunto daramente indican que la sensibilización intragástrica con toxina colérica induce una respuesta inmune Th2, con la consiguiente síntesis y secreción de IgE, la cual al unirse a sus receptores específicos en mastoditos tisulares media la activación de los mismos frente al antígeno específico. La activación de estas células genera el incremento en los niveles circulantes de histamina y la inducción de las distintas reacciones inflamatorias observadas.

Por otro lado, la inducción de signos clínicos frente a un desafío oral con soja, la detección de IgE e IgG1 específicas para soja, la activación de esplenocitos al cultivarlos con el extracto de soja y la inducción de prueba cutánea con proteínas de soja, indican la existencia de una reactividad cruzada entre proteínas de la leche de vaca y los componentes de soja. Además estos resultados confirman la existencia de epitopes B (epitopes G y E) y T en las proteínas de soja y la existencia de al menos dos epitopes iguales o distintos en cada molécula del alérgeno. Para el caso del extracto proteico obtenido a partir de soja estos resultados son fáciles de explicar ya que las proteínas de soja se asocian entre sí formando trímeros o hexámeros, por lo cual en un mismo complejo una molécula con al menos un epítope es suficiente para entrecruzar al menos dos moléculas de IgE en la superficie de los mastocitos. Sin embargo, para el caso en que se empleó la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina o  $\alpha$ -CTD recombinantes, los resultados sugieren que habría al menos dos epitopes B por molécula.

La no inducción de IgG2a específica durante la sensibilización sería un indicador de la no activación de de LT Th1. Sin embargo observamos la secreción de IFN- $\gamma$ , lo cual sólo puede ser explicado por la presencia de LT Th1 específicos. Estos mismos resultados pueden observarse en la literatura para LT aislados de la mucosa gastrointestinal de pacientes con alergia IgE-mediada a leche bovina (Kirsten Beyer et al. 2002), y en trabajos en los que se describe que la toxina colérica también induce la producción de IFN- $\gamma$  en animales sensibilizados (Anjuère et al. 2004; Perrier et al. 2010; Adel-Patient et al. 2005).

En los últimos años se han descrito modelos murinos de alergia a leche de vaca o alergia a maní por administración intragástrica de PLV o proteínas de maní con toxina colérica como adyuvante en cepas de ratones C3H/HeJ y BALB/c (X M Li et al. 1999; Morafo et al. 2003; Adel-Patient et al. 2005; van Wijk et al. 2004). Se logró inducir la aparición de una respuesta local y sistémica del tipo Th2 luego del desafío con el antígeno. Más recientemente también se han obtenido modelos de alergia alimentaria a soja, los que se emplearon para evaluar la alergenidad de componentes individuales de soja, estudiar los mecanismos fisiopatogénicos implicados en la respuesta alérgica, comparar la alergenidad de variedades de soja genéticamente modificadas, etc. Ha resultado sumamente útil contar con herramientas *in vivo* de este tipo para evidenciar que la modificación genética en las variedades de soja empleadas actualmente no incrementa el carácter alérgico respecto de la soja salvaje (Gizzarelli et al. 2006). En particular, se estudió el carácter alérgico de las fracciones de glicininas y  $\beta$ -conglucina de soja sensibilizando ratones BALB/c sin el empleo

---

de adyuvante mucosal alguno. Se observó una respuesta inmune caracterizada por el incremento de anticuerpos plasmáticos IgE e IgG1 específicos, incremento en los niveles de histamina plasmática, y desaparición de mastocitos intactos en el epitelio intestinal de los animales sensibilizados, a lo largo del período de sensibilización (X Liu et al. 2008).

A pesar del desarrollo en los últimos años de modelos de alergia, no es frecuente su aplicación al estudio de reactividad cruzada entre alergenos. Una aproximación de esta índole se ha descrito en modelos murinos de alergia a maní sobre los cuales se ha estudiado la modulación de la respuesta alérgica a maní por inmunización con extracto proteico de soja por vía intraperitoneal (Pons et al. 2004) o productos fermentados de soja (T Zhang et al. 2008), basándose en la homología existente entre alergenos de soja y maní (vicilinas y leguminas). En ambos casos la inmunoterapia alérgica específica con alergenos de maní presentaba efectos adversos y su reemplazo por proteínas de soja demostró la desensibilización o disminución de la respuesta inmune a proteínas de maní en los animales sensibilizados.

Los resultados expuestos en el presente capítulo en su conjunto, validan el empleo del modelo murino de alergia alimentaria como una herramienta biológica para estudiar la alergenicidad de un determinado sistema proteico o una proteína en particular, así como también para estudiar la reactividad cruzada entre proteínas. Además contar con un modelo de este tipo permite realizar estudios *in vivo* sin la necesidad de recurrir a pacientes, hecho que en muchos casos se ve limitado por cuestiones éticas.

# Discusión y Conclusiones Finales

---



En el presente trabajo de tesis se estudió la presencia de componentes proteicos en la semilla de soja que presentan antigenicidad y alergenicidad cruzada con caseínas bovinas, los alérgenos mayoritarios de la LV.

En la primera etapa, a partir del donado y expresión del gen codificante para la proteína G4 (A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>) y la caracterización inmunoquímica de los componentes presentes en los extractos proteicos de soja *Glycine max*. L Merr Asgrow (Convencional) y *Glycine max*. L Merr variedad Raiden, se logró confirmar la reactividad cruzada entre caseínas bovinas y dicho componente de soja, descrito hasta entonces como el único componente responsable de la reactividad cruzada observada *in vitro* entre estos sistemas proteicos (Rozenfeld et al. 2002). Estos resultados además confirmaron que la existencia de reactividad cruzada no reside en la presencia de hidratos de carbono. Además, se evidenció reactividad cruzada residual en la variedad de soja Raiden, por la presencia de las subunidades  $\alpha/\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina (Gly m 5), por lo que concluimos que existe otro componente proteico de reactividad cruzada en la semilla de soja además de G4.

Luego, se caracterizó la reactividad inmunoquímica de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina de soja y de una delección de la misma conteniendo el dominio c-terminal, obtenidas en forma recombinante. La reactividad de ambas fracciones frente a anticuerpos específicos anti-PLV observada *in vitro* confirmó nuevamente la reactividad cruzada de la subunidad  $\alpha$  de la soja con caseínas bovinas, atribuyéndose la misma a la presencia de epítopos contenidos en el fragmento  $\alpha$ -CTD. Mediante un análisis *in silico* e *in vitro* con péptidos sintéticos y recombinantes, se mapearon los epítopos responsables de la reactividad cruzada con caseínas bovinas. La estructura de la subunidad  $\alpha$  fue obtenida empleando modelado por homología observándose que los epítopos de reactividad cruzada predichos se ubicaban en la superficie de la molécula.

Finalmente, se obtuvo un modelo murino de alergia alimentaria a LV que permitió estudiar la reactividad cruzada con proteínas de soja *in vivo*. La aparición de signos clínicos, reacciones de hipersensibilidad cutánea inmediata y parámetros séricos compatibles con una respuesta alérgica IgE mediada en animales sensibilizados a PLV luego del desafío oral con proteínas de soja, demostró la reactividad cruzada entre proteínas de soja y PLV, y además confirmó la reactividad de la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina y la presencia de epítopos en el fragmento  $\alpha$ -CTD.

Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran que la reactividad cruzada puede darse, además de entre proteínas muy similares pertenecientes a una misma familia como ocurre entre vicilinas de frutas secas y maní o leguminas de soja y maní (T A Beardslee et al. 2000b; Barre et al. 2008b; Xiang et al. 2002a; Barre, Borges, and Rougé 2005; Jenkins et al. 2005b), entre proteínas no relacionadas evolutivamente. Específicamente en este trabajo hemos descrito la reactividad cruzada entre proteínas de origen animal, las caseínas bovinas, y de origen vegetal (soja), las subunidades G4 de la globulina 11S (Gly m6) y la  $\alpha$  de la globulina 7S (Gly m5), por lo cual la existencia de epitopes conservados no sólo estaría restringido a proteínas evolutivamente relacionadas y podría atribuirse a la presencia de arreglos estructurales comunes entre proteínas. A pesar de poseer diferente naturaleza, diferentes secuencias aminoacídicas y características estructurales, hemos comprobado que anticuerpos específicos anti proteínas de LV de diferente origen e isotipo (IgG en sueros policlonales, anticuerpos monodonaes en ratón, o bien IgE sérica de pacientes con ALV que no han sido expuestos previamente a soja) son capaces de reconocer también componentes de las familias de globulinas 7S (vicilinas) y 11S (leguminas) de soja *in vitro*.

Debido a la poca identidad de secuencia entre la glicinina A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>B<sub>3</sub> (legumina) y la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (vicilina), la reactividad cruzada entre estos componentes observada en este trabajo, podría explicarse por la presencia de epitopes conformacionales conservados (Jenkins et al. 2005b). Sin embargo, los epitopes involucrados en las reacciones descritas en el presente trabajo son resistentes a los tratamientos térmicos empleados en la preparación de extractos y también a las condiciones electroforéticas desnaturizantes. La resistencia a la digestión proteolítica y desnaturización y las propiedades anti-proteolítica e inhibitoria de proteasas, son algunas de las características que contribuyen a la sensibilización oral y a la predisposición a la inflamación intestinal alérgica (Breiteneder, Heimo and Christian Radauer 2004). Por otro lado, la reactividad cruzada observada la hemos atribuido a la presencia de regiones en la zona c-terminal de las subunidades de Gly m 5 con similitud secuencial con epitopes descritos de caseínas bovinas. Secuencias de 6-8 aminoácidos podrían resultar expuestas luego del proceso de digestión de estos alergenos alimentarios, y ser suficientes para constituir epitopes lineales o conformacionales capaces de ser reconocidos por anticuerpos específicos o de reactividad cruzada (Silvanovich et al. 2006), por más que el alergen en su totalidad no presente similitud estructural o secuencial, como ocurre con las caseínas bovinas y las proteínas de soja.



A su vez, el hecho de que sólo hemos observado reactividad cruzada entre caseínas bovinas y un componente del total de las seis subunidades de las glicininas Gly m6 (subunidad G4) y también una de las tres conglucinas, la subunidad  $\alpha$ , podría deberse no sólo a las diferencias en cuanto a la presencia de epitopes entre las proteínas de familias iguales o distintas, sino también a que los diversos anticuerpos empleados en los diferentes ensayos poseen una especificidad variable. En este trabajo hemos demostrado que tanto los anticuerpos monoclonales específicos anti caseínas bovinas, como los polidonaes anti proteínas de LV reconocieron más de una proteína de soja, nativa o recombinante. Es decir, que además de la presencia de epitopes compartidos entre proteínas de ambos sistemas, existe cierta “plasticidad” de los anticuerpos para reconocer diferentes antígenos. Esta multi-especificidad de los anticuerpos permite explicar hechos como las enfermedades autoinmunes o las reacciones alérgicas mediadas por IgE, donde los anticuerpos reconocen sustancias normalmente inocuas para el organismo, y se ha propuesto que se debe a la capacidad de un anticuerpo de adoptar diversas conformaciones en su sitio de unión (James, Roversi, and Tawfik 2003). La variabilidad conformacional, o el dinamismo, se observa naturalmente en varias proteínas (enzimas, anticuerpos) que presentan plegamientos y funciones cambiantes. Esta propiedad determina la capacidad de evolucionar de ciertas proteínas, es decir la habilidad para adoptar rápidamente nuevas funciones con su plegamiento existente o incluso cambiar hacia un nuevo plegamiento (Tokuriki and Tawfik 2009). Luego, teniendo en cuenta estas características inherentes a los anticuerpos, la reactividad cruzada observada *in vitro* con diversos anticuerpos específicos contra proteínas de LV nos ha permitido identificar hasta el momento dos componentes de reactividad cruzada con caseínas bovinas. Sin embargo, debido a la similitud estructural y secuencial con otras leguminas y vicilinas, no debe descartarse la posibilidad de que *in vivo*, los anticuerpos específicos contra PLV en individuos alérgicos pudieran reconocer más antígenos de soja. De hecho, dado que el fragmento  $\alpha$ -CTD conteniendo los epitopes responsables de la reactividad cruzada con caseínas bovinas, posee una identidad secuencial del 92 y 81% con los dominios equivalentes de las subunidades  $\alpha'$  y  $\beta$ , respectivamente, de la  $\beta$ -conglucina, proponemos que estas dos subunidades de Gly m 5, también podrían presentar reactividad cruzada.

La importancia de contar con los ensayos *in vivo* realizados sobre un modelo murino de ALV nos ha permitido confirmar la alergenicidad de las proteínas de soja y la presencia de al menos un epitope de reactividad cruzada con caseínas bovinas en la subunidad  $\alpha$ , en el dominio c-terminal. El/los epitopes presentes en soja demostraron la capacidad de producir

el entrecruzamiento de los receptores Fcε RI de las células sensibilizadas que poseen en su superficie IgE específicas de PLV, con la consecuente respuesta inflamatoria. Los ensayos de proliferación antígeno-específicos sugieren además que existen epítopes T de reactividad cruzada, además de los epítopes B, Gy E. Modelos murinos de alergia alimentaria se han empleado en diferentes situaciones para estudiar nuevas variantes de inmunointervención. Por ejemplo un modelo de alergia alimentaria al maní, usando diferentes protocolos de desensibilización, ha sido utilizado con éxito para estudiar proteínas hipoadérgicas de maní (producidas por mutagénesis sitio dirigida para alterar epítopes IgE) junto a adyuvantes bacterianos como inmunomoduladores (Xiu-Min Li et al. 2003) y proteínas de soja conteniendo epítopes de reactividad cruzada con alérgenos de maní (Pons et al. 2004).

La caracterización de los epítopes T ha permitido comprender aspectos moleculares y celulares de la reactividad cruzada que se observa en distintos sistemas (B Bohle et al. 2005; Beatrice Jahn-Schmid et al. 2005), a la vez que impulsó el desarrollo de nuevas vacunas basadas en el empleo de péptidos hipoadérgicos para la inducción de tolerancia oral (inmunoterapia oral o sublingual) (Gerstmayr et al. 2007; Knittelfelder, Riemer, and Jensen-Jarolim 2009; Rosa, Ribeiro, and Cunha-Neto 2010; M Yang, C Yang, and Mine 2010). Por lo tanto la identificación de péptidos conteniendo epítopes T arroja importante información a ser aplicada en el desarrollo de vacunas T. La administración por distintas vías mucosales constituye en la actualidad una forma segura y efectiva de vacunación en comparación con las vías sistémicas que se han empleado desde hace muchos años. El empleo de modelos animales para probar la eficacia de estas vacunas puede sentar las bases experimentales para la inducción de tolerancia inmune antígeno-específica. Por lo tanto la optimización de protocolos en los que el antígeno sea expuesto directamente en la mucosa, puede tener un importante impacto en el desarrollo de nuevas terapias inmunomoduladoras a aplicar en humanos. Estudios de este tipo se han probado con éxito en modelos animales de enfermedades autoinmunes (Jewell et al. 1998; Caroline C Whitacre et al. 2004), alergias respiratorias (Takagi et al. 2005) y alergias alimentarias (M Yang, C Yang, and Mine 2010). En humanos en los últimos años la inmunoterapia oral o sublingual ha resultado ser eficaz en distintos sistemas, y se observa que los pacientes logran tolerar cantidades crecientes de alérgenos (Hiroi and Takaiwa 2006; Takaiwa 2007; Domon et al. 2009). Estos resultados han sido eficientes en un rango de situaciones que van desde evitar reacciones alérgicas frente a contactos accidentales con el alérgeno, hasta tolerar totalmente la exposición natural al mismo (Buchanan et al. 2007; Staden et al. 2007). El trabajo de Staden (Staden et al. 2007) fue el primer ensayo clínico controlado con alérgenos de huevo. Para alergia a leche de vaca

se ha observado en los últimos años que en estos pacientes la tolerancia natural se alcanza a edades más tardías, presenta una mayor tendencia a ser persistente y suele ocasionar anafilaxia (Bock, A Muñoz-Furlong, and H A Sampson 2001; Bock, Anne Muñoz-Furlong, and Hugh A Sampson 2007; Pumphrey and Gowland 2007). Por lo tanto resulta altamente deseable desarrollar u optimizar nuevas terapias para intervenir en esta patología. Se han realizado estudios empleando leche de vaca en distintas dosis, doble ciego y con placebo, en pacientes mayores de 5 años (Giorgio Longo et al. 2008; Skripak and Wood 2009), lográndose un incremento en el umbral de contacto con el alergeno para inducir una reacción alérgica, con un incremento en los niveles séricos de IgG4. Sin embargo, el hecho que en estos estudios se observe la aparición de reacciones adversas impulsa al desarrollo de nuevos estudios para mejorar la seguridad y la eficacia de este tipo de inmunointervenciones.

Los resultados hasta aquí obtenidos permiten interpretar la intolerancia dínica a las fórmulas a base de proteínas de soja que se presenta en algunos niños con ALV durante el tratamiento sustitutivo. Por la edad de los niños a la que se manifiesta esta intolerancia, probablemente éstos no han estado previamente expuestos a proteínas de soja. Esto determina que las reacciones adversas que manifiestan serían debidas al reconocimiento en forma cruzada de proteínas de soja por anticuerpos y LT específicos generados contra PLV. *A priori*, contar con una variedad de soja carente del único componente de soja descrito como componente de reactividad cruzada con caseínas bovinas (G4) para emplear como sustituto hipoalergénico en niños con ALV, no es suficiente ya que hemos comprobado la existencia de reactividad cruzada también debido a la subunidad  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina. Por lo tanto, y dada a la homología existente entre las tres subunidades de Gly m 5, de comprobarse la alergenicidad en las subunidades  $\alpha'$  y  $\beta$ , sería necesario modificar genéticamente la composición de proteínas de reserva en soja, o emplear una variedad de soja que no exprese los genes codificantes para la subunidad G4 de Gly m6, ni las subunidades de Gly m5, si se pretende desarrollar un producto hipoalergénico empleando proteínas de soja. En Japón, donde los problemas de alergia a proteínas de soja son más importantes, por métodos clásicos de mejoramiento genético se ha obtenido una variedad sin la subunidad alfa de la beta conglucina (Samoto et al. 1997), sin embargo las otras dos subunidades (alfa prima y beta) no han sido eliminadas ya que sólo recientemente se ha informado que también serían alergénicas (Adachi et al. 2009; Krishnan et al. 2009).

Por otro lado, estos resultados nos alientan a profundizar el análisis del sistema leche-soja, y proyectar los estudios hacia el desarrollo de vacunas mucosales basadas en la reactividad cruzada que existe entre los alérgenos con el consiguiente empleo de péptidos hipoalérgicos que contengan epitopes T y epitopes B alterados. En este sentido los estudios de scanning de alanina resultan muy importantes para identificar aquellas posiciones aminoacídicas que son críticas para el reconocimiento de los anticuerpos IgE. Sobre la base de la identificación de péptidos conteniendo los epitopes responsables de la reactividad cruzada que hemos presentado en este trabajo, continuaremos con los trabajos de identificación de epitopes B (ensayos con péptidos solapados y anticuerpos monoclonales e IgE séricos) y T (aislamiento y clonación de linfocitos T específicos de sangre periférica) para definir los péptidos a emplear por distintas vías mucosales (intranasal y oral) con el propósito de inducir linfocitos T regulatorios específicos.

Además esta hipótesis puede ser reforzada por el hecho que la alergia alimentaria a proteínas de soja que ingresan por el tracto gastrointestinal no es frecuente y que la alergia a soja se observa principalmente en pacientes que presentan una sensibilización primaria a otros alérgenos. Existen otros sistemas alérgicos donde se están estudiando terapias similares en modelos animales aunque no han alcanzado las fases clínicas en humanos.

La posibilidad de clonar y expresar las otras subunidades de  $\beta$ -conglucina permitirá evaluar la existencia de alérgenos de reactividad cruzada adicionales, obtener mayor información sobre las características de los epitopes B y T de reactividad cruzada y la identificación de péptidos con epitopes T para su aplicación en inmunoterapia oral. Asimismo contar con alérgenos recombinantes, péptidos sintéticos, anticuerpos monoclonales purificados, anticuerpos monoclonales recombinantes (expresión en *E. coli*), anticuerpos IgE humanos recombinantes (obtenidos por phage display a partir de linfocitos B de pacientes alérgicos) nos permitirá ahondar en el conocimiento de la interacción antígeno-anticuerpo por aplicación de modernas tecnologías dirigidas a caracterizar la constante de afinidad Ag-Ac (por BIA-CORE), detalles moleculares de la interacción Ag-Ac (por técnicas *in silico* de docking), y la existencia de uno o más epitopes E en el antígeno (estudio de la activación *ex vivo* de basófilos periféricos por citometría de flujo). Asimismo se iniciarán los estudios clínicos en pacientes alérgicos a leche de vaca para corroborar por desafío oral controlado y con placebo la alergenidad cruzada entre leche y soja.

En conclusión, en el trabajo de tesis aquí presentado confirmamos la reactividad cruzada existente entre leche y soja, identificamos un nuevo alérgeno de soja de reactividad

cruzada (Gly m 5.0101), iniciamos la caracterización de epitopes B y T, obtuvimos alérgenos de soja en forma recombinante, péptidos sintéticos y recombinantes, pusimos en evidencia la alérgenicidad cruzada *in vivo* e identificamos un péptido que contiene epitopes B y T ( $\alpha$ -CTD). Asimismo, validamos el empleo del modelo murino de alérgia alimentaria a leche bovina en ratones BALB/c como una herramienta biológica para identificar alérgenos de reactividad cruzada, con una potencial aplicación al estudio de nuevas variantes hipoalérgicas a emplearse en el desarrollo de futuras vacunas mucosales inmunomoduladoras.



# Bibliografía

- Adachi, M, Y Takenaka, A B Gidamis, B Mikami, and S Utsumi. 2001. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *Journal of Molecular Biology* 305, no. 2 (January 12): 291-305. doi:10.1006/jmbi.2000.4310.
- Adachi, A, Horikawa, T, Shimizu, H, Sarayama, Y, Ogaawa, T, Sjolander, S, Tanaka, A and Moriyama, T (2009). Soybean beta-conglycinin as the main allergen in a patient with food-dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu: Food processing alters pepsin resistance. *Clinical and Experimental Allergy* 39(1): 167-173.
- Adachi, Motoyasu, Jiro Kanamori, Taro Masuda, Kazuhiro Yagasaki, Keisuke Kitamura, Bunzo Mikami, and Shigeru Utsumi. 2003. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 12 (June 10): 7395-7400. doi:10.1073/pnas.0832158100.
- Adachi, Motoyasu, Eiko Okuda, Yumiko Kaneda, Asako Hashimoto, Andrei D Shutov, Claudia Becker, Klaus Müntz, and Shigeru Utsumi. 2003. Crystal structures and structural stabilities of the disulfide bond-deficient soybean proglycinin mutants C12G and C88S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, no. 16 (July 30): 4633-4639. doi:10.1021/jf026065y.
- Adel-Patient, K, H Bernard, S Ah-Leung, C Créminon, and J-M Wal. 2005. Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 60, no. 5 (May): 658-664. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00767.x.
- Adel-Patient, K, M-A Nahori, B Proust, J R Lapa e Silva, C Créminon, J-M Wal, and B B Vargaftig. 2003. Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33, no. 3 (March): 376-385.
- Akdis, Mübeccel, and Cezmi A Akdis. 2009. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nature Reviews. Drug Discovery* 8, no. 8 (August): 645-660. doi:10.1038/nrd2653.
- Albrecht, Melanie, Yvonne Kühne, Barbara K Ballmer-Weber, Wolf-Meinhard Becker, Thomas Holzhauser, Iris Lauer, Andreas Reuter, et al. 2009. Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, no. 2 (August): 328-336. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.031.
- Anderson, L B, E M Dreyfuss, J Logan, D E Johnstone, and J Glaser. 1970. Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *The Journal of Allergy* 45, no. 5 (May): 310-319.
- Anjuère, Fabienne, Carmelo Luci, Michael Lebens, Déborah Rousseau, Catherine Hervouet, Geneviève Milon, Jan Holmgren, Carlos Ardavin, and Cecil Czerkinsky. 2004. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, no. 8 (October 15): 5103-5111.
- Añibarro, B, F J Seoane, and M V Múgica. 2007. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology: Official Organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana De Alergia E Inmunología* 17, no. 3: 168-172.
- Asakawa, Naoyuki, Noriyuki Sakiyama, Reiko Teshima, and Shigeaki Mitaku. 2010. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. *Journal of Biochemistry* 147, no. 1 (January): 127-133. doi:10.1093/jb/mvp150.
- Asero, R, L Antonicelli, A Arena, L Bommarito, B Caruso, G Colombo, M Crivellaro, et al. 2009. Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study. *International Archives of Allergy and Immunology* 150, no. 3: 271-277. doi:10.1159/000222679.
- Asero, Riccardo, Barbara K Ballmer-Weber, Kirsten Beyer, Amedeo Conti, Ruta Dubakiene, Montserrat Fernandez-Rivas, Karin Hoffmann-Sommergruber, et al. 2007. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, no. 1 (January): 135-147. doi:10.1002/mnfr.200600132.
- Atkinson, H A, and K Miller. 1994. Assessment [correction of Assessment] of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* 91, no. 3 (August 12): 281-288.

- Ballmer-Weber, Barbara K, Thomas Holzhauser, Joseph Scibilia, Diana Mittag, Guliana Zisa, Claudio Ortolani, Morten Oesterballe, Lars K Poulsen, Stefan Vieths, and Carsten Bindslev-Jensen. 2007. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, no. 6 (June): 1489-1496. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.049.
- Ballmer-Weber, Barbara K, and Stefan Vieths. 2008. Soy allergy in perspective. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 8, no. 3 (June): 270-275. doi:10.1097/ACI.0b013e3282ffb157.
- Barre, Annick, Jean-Philippe Borges, and Pierre Rougé. 2005. Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie* 87, no. 6 (June): 499-506. doi:10.1016/j.bi ochi.2005.02.011.
- Barre, Annick, Camille Sordet, Raphaël Culerrier, Fabienne Rancé, Alain Didier, and Pierre Rougé. 2008a. Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. *Molecular Immunology* 45, no. 5 (March): 1231-1240. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.014.
- Batista, Rita, Isabel Martins, Paul Jenó, Cândido Pinto Ricardo, and Maria Margarida Oliveira. 2007. A proteomic study to identify soya allergens--the human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. *International Archives of Allergy and Immunology* 144, no. 1: 29-38. doi:10.1159/000102611.
- Battais, F, F Pineau, Y Popineau, C Aparicio, G Kanny, L Guerin, D A Moneret-Vautrin, and S Denery-Papini. 2003. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33, no. 7 (July): 962-970.
- Beardslee, T A, M G Zeece, G Sarath, and J P Markwell. 2000a. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *International Archives of Allergy and Immunology* 123, no. 4 (December): 299-307.
- Bengtsson, U, T W Knutson, L Knutson, A Dannaeus, R Hällgren, and S Ahlstedt. 1997. Eosinophil cationic protein and histamine after intestinal challenge in patients with cow's milk intolerance. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100, no. 2 (August): 216-221.
- Benhamou, Avigael H, Michela G Schäppi Tempia, Dominique C Belli, and Philippe A Eigenmann. 2009. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Medical Weekly: Official Journal of the Swiss Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology* 139, no. 21 (May 30): 300-307. doi:smw-12258.
- Beyer, Kirsten, Russell Castro, Audrey Birnbaum, Keith Benkov, Nanci Pittman, and Hugh A Sampson. 2002. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, no. 4 (April): 707-713.
- Bock, S A, A Muñoz-Furlong, and H A Sampson. 2001. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, no. 1 (January): 191-193. doi:10.1067/mai.2001.112031.
- Bock, S Allan, Anne Muñoz-Furlong, and Hugh A Sampson. 2007. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, no. 4 (April): 1016-1018. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.622.
- Bohle, B, A Radakovic, D Lüttkopf, B Jahn-Schmid, S Vieths, and C Ebner. 2005. Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35, no. 10 (October): 1392-1399. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02332.x.
- Bousquet, J, and P Burney. 1993. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 23, no. 6 (June): 484-492.
- Bradford, M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (May 7): 248-254.



- Branum, Amy M, and Susan L Lukacs. 2009. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 124, no. 6 (December): 1549-1555. doi:10.1542/peds.2009-1210.
- Breiteneder, H, K Pettenburger, A Bitó, R Valenta, D Kraft, H Rumpold, O Scheiner, and M Breitenbach. 1989. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *The EMBO Journal* 8, no. 7 (July): 1935-1938.
- Breiteneder, Heimo, and E N Clare Mills. 2005. Plant food allergens—structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances* 23, no. 6 (September): 395-399. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.05.004.
- Breiteneder, Heimo, and Clare Mills. 2006. Structural bioinformatic approaches to understand cross-reactivity. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, no. 7 (July): 628-632. doi:10.1002/mnfr.200500274.
- Breiteneder, Heimo, and E N Clare Mills. 2005. Molecular properties of food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, no. 1 (January): 14-23; quiz 24. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.022.
- Breiteneder, Heimo, and Christian Radauer. 2004. A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, no. 5 (May): 821-830; quiz 831. doi:10.1016/j.jaci.2004.01.779.
- Breiteneder, Heimo and Christian Radauer. 2004. A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, no. 5 (May): 821-830; quiz 831. doi:10.1016/j.jaci.2004.01.779.
- Broide, David H. 2009. Immunomodulation of allergic disease. *Annual Review of Medicine* 60: 279-291. doi:10.1146/annurev.med.60.041807.123524.
- Bruijnzeel-Koomen, C, C Ortolani, K Aas, C Bindslev-Jensen, B Björkstén, D Moneret-Vautrin, and B Wüthrich. 1995. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy* 50, no. 8 (August): 623-635.
- Buchanan, Ariana D, Todd D Green, Stacie M Jones, Amy M Scurlock, Lynn Christie, Karen A Althage, Pamela H Steele, et al. 2007. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, no. 1 (January): 199-205. doi:10.1016/j.jaci.2006.09.016.
- Busse, William W. 2010. The National Institutes of Allergy and Infectious Diseases networks on asthma in inner-city children: an approach to improved care. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, no. 3 (March): 529-537; quiz 538-539. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.036.
- Calder, Philip C, Susanne Krauss-Etschmann, Esther C de Jong, Christophe Dupont, Julia-Stefanie Frick, Hanne Frokiaer, Joachim Heinrich, et al. 2006. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *The British Journal of Nutrition* 96, no. 4 (October): 774-790.
- Campbell, D E, D J Hill, and A S Kemp. 1998. Enhanced IL-4 but normal interferon-gamma production in children with isolated IgE mediated food hypersensitivity. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 9, no. 2 (May): 68-72.
- Cantani, A, and M Micera. 2004. Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 8, no. 4 (August): 153-164.
- Cardoso, C R, G Teixeira, P R Provinciatto, D F Godoi, B R Ferreira, C M Milanezi, D B Ferraz, M A Rossi, F Q Cunha, and J S Silva. 2008. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, no. 2 (February): 338-349. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02866.x.
- Cerecedo, Inmaculada, Javier Zamora, Wayne G Shreffler, Jing Lin, Ludmilla Bardina, Ma Carmen Dieguez, Julie Wang, Alfonso Muriel, Belén de la Hoz, and Hugh A Sampson. 2008. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, no. 3 (September): 589-594. doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040.
- Ceska, M. 1981. Radioimmunoassay of IgE using paper disks. *Methods in Enzymology* 73: 646-656.

- Cianferoni, Antonella, and Jonathan M Spergel. 2009. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 58, no. 4 (December): 457-466. doi:10.2332/allergolint.09-RAI-0138.
- Cocco, Renata R, Kirsi-Marjut Järvinen, Hugh A Sampson, and Kirsten Beyer. 2003. Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, no. 2 (August): 433-437.
- Cochrane, S, K Beyer, M Clausen, M Wjst, R Hiller, C Nicoletti, Z Szepefalusi, et al. 2009. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* 64, no. 9 (September): 1246-1255. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02128.x.
- Codina, R, L Arduzzo, R F Lockey, C Crisci, and I Medina. 2003. Allergenicity of varieties of soybean. *Allergy* 58, no. 12 (December): 1293-1298.
- Codina, R, L Arduzzo, R F Lockey, C D Crisci, C Jaén, and N H Bertoya. 2002. Identification of the soybean hull allergens involved in sensitization to soybean dust in a rural population from Argentina and N-terminal sequence of a major 50 KD allergen. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32, no. 7 (July): 1059-1063.
- Corrigan, C J, A Jayaraman, Y Wang, Y Liu, R de Waal Malefyt, Q Meng, A B Kay, S Phipps, T H Lee, and S Ying. 2009. Early production of thymic stromal lymphopoietin precedes infiltration of dendritic cells expressing its receptor in allergen-induced late phase cutaneous responses in atopic subjects. *Allergy* 64, no. 7 (July): 1014-1022. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.01947.x.
- Curciarello, R, J F Lareu, C A Fossati, G H Docena, and S Petruccelli. 2008. Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, no. 9 (September): 1559-1565. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03062.x.
- Chang, Tse Wen, Pheidias C Wu, C Long Hsu, and Alfur F Hung. 2007. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. *Advances in Immunology* 93: 63-119. doi:10.1016/S0065-2776(06)93002-8.
- Chatthatee, P, K M Järvinen, L Bardina, K Beyer, and H A Sampson. 2001. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, no. 2 (February): 379-383. doi:10.1067/mai.2001.112372.
- Chatthatee, P, K M Järvinen, L Bardina, L Vila, K Beyer, and H A Sampson. 2001. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31, no. 8 (August): 1256-1262.
- Christensen, Hanne R, Susanne W Bruun, and Hanne Frøkiaer. 2003. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein. *International Archives of Allergy and Immunology* 132, no. 1 (September): 58-67. doi:10.1159/000073265.
- Dearman, R J, and I Kimber. 2009. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, no. 4 (April): 458-468. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03194.x.
- Docena, G, P Rozenfeld, R Fernández, and C A Fossati. 2002. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 57, no. 2 (February): 83-91.
- Docena, G H, R Fernandez, F G Chirido, and C A Fossati. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51, no. 6 (June): 412-416.
- Domon, Eiji, Hidenori Takagi, Sakiko Hirose, Koichi Sugita, Saori Kasahara, Hiroyasu Ebinuma, and Fumio Takaiwa. 2009. 26-Week oral safety study in macaques for transgenic rice containing major human T-cell epitope peptides from Japanese cedar pollen allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, no. 12 (June 24): 5633-5638. doi:10.1021/jf900371u.
- Eckman, John, Sarbjit S Saini, and Robert G Hamilton. 2009. Diagnostic evaluation of food-related allergic diseases. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 5, no. 1: 2. doi:10.1186/1710-1492-5-2.

- Eigenmann, P A. 2003. Future therapeutic options in food allergy. *Allergy* 58, no. 12 (December): 1217-1223.
- Ermel, R W, M Kock, S M Griffey, G A Reinhart, and O L Frick. 1997. The atopic dog: a model for food allergy. *Laboratory Animal Science* 47, no. 1 (February): 40-49.
- Ferreira, F, T Hawranek, P Gruber, N Wopfner, and A Mari. 2004. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 59, no. 3 (March): 243-267. doi:10.1046/j.1398-9995.2003.00407.x.
- Finotto, Susetta, Markus F Neurath, Jonathan N Glickman, Shixin Qin, Hans A Lehr, Francis H Y Green, Kate Ackerman, et al. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science (New York, N.Y.)* 295, no. 5553 (January 11): 336-338. doi:10.1126/science.1065544.
- Foucard, T, and I Malmheden Yman. 1999. A study on severe food reactions in Sweden--is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis? *Allergy* 54, no. 3 (March): 261-265.
- Frank, Ronald. 2002. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *Journal of Immunological Methods* 267, no. 1 (September 1): 13-26.
- Fu, Chunjiang J, Joseph M Jez, Monty S Kerley, Gary L Allee, and Hari B Krishnan. 2007. Identification, characterization, epitope mapping, and three-dimensional modeling of the alpha-subunit of beta-conglycinin of soybean, a potential allergen for young pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 10 (May 16): 4014-4020. doi:10.1021/jf070211o.
- Fukuda, Takako, Nobuyuki Maruyama, Mohamad Ramlan Mohamed Salleh, Bunzo Mikami, and Shigeru Utsumi. 2008. Characterization and crystallography of recombinant 7S globulins of Adzuki bean and structure-function relationships with 7S globulins of various crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, no. 11 (June 11): 4145-4153. doi:10.1021/jf072667b.
- Galfè, G, and C Milstein. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymology* 73: 3-46.
- Ganeshan, Kirthana, Colleen V Neilsen, April Hadsaitong, Robert P Schleimer, Xunrong Luo, and Paul J Bryce. 2009. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, no. 1 (January): 231-238.e4. doi:10.1016/j.jaci.2008.10.011.
- Gell PGH, Coombs RRA, eds, 1963. *Clinical Aspects of Immunology*. 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
- Gendel, Steven M, and John A Jenkins. 2006. Allergen sequence databases. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, no. 7 (July): 633-637. doi:10.1002/mnfr.200500271.
- Gerstmayr, Marianne, Nicola Ilk, Irma Schabussova, Beatrice Jahn-Schmid, Eva M Egelseer, Uwe B Sleytr, Christof Ebner, and Barbara Bohle. 2007. A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant allergen-S-layer fusion protein rSbsC-Bet v 1 matures dendritic cells that prime Th0/Th1 and IL-10-producing regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179, no. 11 (December 1): 7270-7275.
- Gizzarelli, F, S Corinti, B Barletta, P Iacovacci, B Brunetto, C Butteroni, C Afferni, et al. 2006. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36, no. 2 (February): 238-248. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02415.x.
- Gómez-Ollés, S, M J Cruz, J Bogdanovic, I M Wouters, G Doekes, I Sander, F Morell, and M J Rodrigo. 2007. Assessment of soy aeroallergen levels in different work environments. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37, no. 12 (December): 1863-1872. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02827.x.
- Goodman, Richard E, Stefan Vieths, Hugh A Sampson, David Hill, Motohiro Ebisawa, Steve L Taylor, and Ronald van Ree. 2008. Allergenicity assessment of genetically modified crops--what makes sense? *Nature Biotechnology* 26, no. 1 (January): 73-81. doi:10.1038/nbt1343.
- Guo, Pengfei, Xiangshu Piao, Yunhe Cao, Deyuan Ou, and Defa Li. 2008. Recombinant soybean protein beta-conglycinin alpha'-subunit expression and induced hypersensitivity reaction in rats. *International Archives of Allergy and Immunology* 145, no. 2: 102-110. doi:10.1159/000108135.

- Han, N, K M Järvinen, R R Cocco, P J Busse, H A Sampson, and K Beyer. 2008. Identification of amino acids critical for IgE-binding to sequential epitopes of bovine kappa-casein and the similarity of these epitopes to the corresponding human kappa-casein sequence. *Allergy* 63, no. 2 (February): 198-204. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01539.x.
- Hannuksela, M, and A Lahti. 1977. Immediate reactions to fruits and vegetables. *Contact Dermatitis* 3, no. 2 (April): 79-84.
- He, Rui, Michiko K Oyoshi, Lilit Garibyan, Lalit Kumar, Steven F Ziegler, and Raif S Geha. 2008. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 33 (August 19): 11875-11880. doi:10.1073/pnas.0801532105.
- Helm, R, G Cockrell, E Herman, A Burks, H Sampson, and G Bannon. 1998. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. *International Archives of Allergy and Immunology* 117, no. 1 (September): 29-37.
- Helm, R M, G Cockrell, C Connaughton, H A Sampson, G A Bannon, V Beilinson, D Livingstone, N C Nielsen, and A W Burks. 2000. A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. *International Archives of Allergy and Immunology* 123, no. 3 (November): 205-212.
- Helm, R M, G Cockrell, C Connaughton, H A Sampson, G A Bannon, V Beilinson, N C Nielsen, and A W Burks. 2000. A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. *International Archives of Allergy and Immunology* 123, no. 3 (November): 213-219.
- Helm, Ricki M, and A Wesley Burks. 2002. Animal models of food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2, no. 6 (December): 541-546. doi:10.1097/01.all.0000044541.45448.bb.
- Herman, Eliot M. 2003. Genetically modified soybeans and food allergies. *Journal of Experimental Botany* 54, no. 386 (May): 1317-1319.
- Herman, Eliot M, Ricki M Helm, Rudolf Jung, and Anthony J Kinney. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiology* 132, no. 1 (May): 36-43. doi:10.1104/pp.103.021865.
- Hiemori, M, N Bando, T Oga wa, H Shimada, H Tsuji, R Yamanishi, and J Terao. 2000. Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *International Archives of Allergy and Immunology* 122, no. 4 (August): 238-245.
- Hilpert, Kai, Dirk F H Winkler, and Robert E W Hancock. 2007. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols* 2, no. 6: 1333-1349. doi:10.1038/nprot.2007.160.
- Hiroi, Takachika, and Fumio Takaiwa. 2006. Peptide immunotherapy for allergic diseases using a rice-based edible vaccine. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 6, no. 6 (December): 455-460. doi:10.1097/01.all.0000246621.34247.fa.
- Hoff, Michael, Dae-Yeul Son, Michaela Gubesch, Kangmo Ahn, Sang-Il Lee, Stefan Vieths, Richard E Goodman, Barbara K Ballmer-Weber, and Gary A Bannon. 2007. Serum testing of genetically modified soybeans with special emphasis on potential allergenicity of the heterologous protein CP4 EPSPS. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, no. 8 (August): 946-955. doi:10.1002/mnfr.200600285.
- Holzhauser, Thomas, Olga Wackemann, Barbara K Ballmer-Weber, Carsten Bindslev-Jensen, Joseph Sibilia, Lorenza Perono-Garoffo, Shigeru Utsumi, Lars K Poulsen, and Stefan Vieths. 2009. Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, no. 2 (February): 452-458. doi:10.1016/j.jaci.2008.09.034.
- Hong, S J, J G Michael, A Fehring, and D Y Leung. 1999. Pepsin-digested peanut contains T-cell epitopes but no IgE epitopes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, no. 2 (August): 473-478.

- Høst, A, and S Halken. 1990. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 45, no. 8 (November): 587-596.
- . 2004. Hypoallergenic formulas—when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! *Allergy* 59 Suppl 78 (August): 45-52. doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00574.x.
- Høst, Arne, Susanne Halken, Hans P Jacobsen, Anne E Christensen, Anne M Herskind, and Karin Plesner. 2002. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 13 Suppl 15: 23-28.
- Hunninghake, Gary M, Manuel E Soto-Quirós, Jessica Lasky-Su, Lydiana Avila, Ngoc P Ly, Catherine Liang, Barbara J Klanderman, et al. 2008. Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, no. 1 (July): 93-98, 98.e1-5. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.015.
- Ibáñez, M D, M Martínez, J J Sánchez, and E Fernández-Caldas. 2003. [Legume cross-reactivity]. *Allergologia Et Immunopathologia* 31, no. 3 (June): 151-161.
- In vitro, Gateway Technology. 2003. Gateway® Technology: A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. *Catalog nos. 12535-019 and 12535-027*, September 22.
- Ivanciuc, Ovidiu, Catherine H Schein, Tzintzuni Garcia, Numan Oezguen, Surendra S Negi, and Werner Braun. 2009. Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 54, no. 3 (August): S11-19. doi:10.1016/j.yrtph.2008.11.007.
- Jahn-Schmid, Beatrice, Astrid Radakovic, Dirk Lüttkopf, Stephan Scheurer, Stefan Vieths, Christof Ebner, and Barbara Bohle. 2005. Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, no. 1 (July): 213-219. doi:10.1016/j.jaci.2005.04.019.
- James, Leo C, Pietro Roversi, and Dan S Tawfik. 2003. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science (New York, N.Y.)* 299, no. 5611 (February 28): 1362-1367. doi:10.1126/science.1079731.
- Jaroszewski, Lukasz, Leszek Rychlewski, Zhanwen Li, Weizhong Li, and Adam Godzik. 2005. FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Research* 33 (July 1): W284-288. doi:10.1093/nar/gki418.
- Järvinen, K M, P Chatthatee, L Bardina, K Beyer, and H A Sampson. 2001. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 126, no. 2 (October): 111-118.
- Järvinen, Kirsi-Marjut, Kirsten Beyer, Leticia Vila, Pantipa Chatthatee, Paula J Busse, and Hugh A Sampson. 2002. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110, no. 2 (August): 293-297.
- Järvinen, K-M, M Turpeinen, and H Suomalainen. 2003. Concurrent cereal allergy in children with cow's milk allergy manifested with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33, no. 8 (August): 1060-1066.
- Jenkins, John A, Sam Griffiths-Jones, Peter R Shewry, Heimo Breiteneder, and E N Clare Mills. 2005a. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, no. 1 (January): 163-170. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.026.
- . 2005b. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, no. 1 (January): 163-170. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.026.
- Jensen, L B, M H Pedersen, P S Skov, L K Poulsen, C Bindslev-Jensen, S B Andersen, and A M Torp. 2008. Peanut cross-reacting allergens in seeds and sprouts of a range of legumes. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, no. 12 (December): 1969-1977.

doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03129.x.

- Jewell, S D, I E Gienapp, K L Cox, and C C Whitacre. 1998. Oral tolerance as therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: demonstration of T cell anergy. *Immunology and Cell Biology* 76, no. 1 (February): 74-82. doi:10.1046/j.1440-1711.1998.00716.x.
- Johansson, S G, J O Hourihane, J Bousquet, C Brujnzeel-Koomen, S Dreborg, T Haahtela, M L Kowalski, et al. 2001. A revised nomenclature for allergy. An EAAAC position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, no. 9 (September): 813-824.
- Karlsson, Malin R, Jarle Rugtveit, and Per Brandtzaeg. 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of Experimental Medicine* 199, no. 12 (June 21): 1679-1688. doi:10.1084/jem.20032121.
- Katz, Yitzhak, Michael R Goldberg, Galia Zadik-Mnuhin, Moshe Leshno, and Eli Heyman. 2008. Cross-sensitization between milk proteins: reactivity to a "kosher" epitope? *The Israel Medical Association Journal: IMAJ* 10, no. 1 (January): 85-88.
- Kim, Sang-Ha, Hyun-Mi Kim, Young-Min Ye, Seung-Hyun Kim, Dong-Ho Nahm, Hae-Sim Park, Sang-Ryeol Ryu, and Bou-Oung Lee. 2006. Evaluating the allergic risk of genetically modified soybean. *Yonsei Medical Journal* 47, no. 4 (August 31): 505-512.
- Kinney, A J, R Jung, and E M Herman. 2001. Cosuppression of the alpha subunits of beta-conglycinin in transgenic soybean seeds induces the formation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies. *The Plant Cell* 13, no. 5 (May): 1165-1178.
- Kitagawa, S, S Zhang, Y Harari, and G A Castro. 1995. Relative allergenicity of cow's milk and cow's milk-based formulas in an animal model. *The American Journal of the Medical Sciences* 310, no. 5 (November): 183-187.
- Kleine-Tebbe, Jörg, Lothar Vogel, Dring N Crowell, Uwe-Frithjof Haustein, and Stefan Vieths. 2002. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110, no. 5 (November): 797-804.
- Klemola, Timo, Kirsti Kalimo, Tuija Poussa, Kaisu Juntunen-Backman, Riitta Korpela, Erkka Valovirta, and Timo Vanto. 2005. Feeding a soy formula to children with cow's milk allergy: the development of immunoglobulin E-mediated allergy to soy and peanuts. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 16, no. 8 (December): 641-646. doi:10.1111/j.1399-3038.2005.00326.x.
- Klemola, Timo, Timo Vanto, Kaisu Juntunen-Backman, Kirsti Kalimo, Riitta Korpela, and Elina Varjonen. 2002. Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. *The Journal of Pediatrics* 140, no. 2 (February): 219-224. doi:10.1067/mpd.2002.121935.
- Kneepkens, C M Frank, and Yolanda Meijer. 2009. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *European Journal of Pediatrics* 168, no. 8 (August): 891-896. doi:10.1007/s00431-009-0955-7.
- Knittelfelder, Regina, Angelika B Riemer, and Erika Jensen-Jarolim. 2009. Mitope vaccination—from allergy to cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, no. 4 (April): 493-506. doi:10.1517/14712590902870386.
- Krishnan, Hari B, Won-Seok Kim, Sungchan Jang, and Monty S Kerley. 2009. All three subunits of soybean beta-conglycinin are potential food allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, no. 3 (February 11): 938-943. doi:10.1021/jf802451g.
- Kvenshagen, Bente, Ragnhild Halvorsen, and Morten Jacobsen. 2008. Adverse reactions to milk in infants. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 97, no. 2 (February): 196-200. doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00599.x.
- Lack, Gideon. 2008. Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, no. 6 (June): 1331-1336. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.032.
- Ladics, Gregory S, and MaryJane K Selgrade. 2009. Identifying food proteins with allergenic potential: evolution of approaches to safety assessment and research to provide additional tools. *Regulatory Toxicology and*

- Pharmacology: RTP* 54, no. 3 (August): S2-6. doi:10.1016/j.yrtp.2008.10.010.
- Laemmli, U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, no. 5259 (August 15): 680-685.
- Lehrer, S B, and G A Bannon. 2005. Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality. *Allergy* 60, no. 5 (May): 559-564. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00704.x.
- Lemon-Mulé, Heather, Hugh A Sampson, Scott H Sicherer, Wayne G Shreffler, Sally Noone, and Anna Nowak-Wegrzyn. 2008. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, no. 5 (November): 977-983.e1. doi:10.1016/j.jaci.2008.09.007.
- L'Hocine, Lamia, and Joyce I Boye. 2007. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, no. 2: 127-143. doi:10.1080/10408390600626487.
- Li, Hongxing, Mima Chehade, Weicheng Liu, Huabao Xiong, Lloyd Mayer, and M Cecilia Berin. 2007. Allergen-IgE complexes trigger CD23-dependent CCL20 release from human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 133, no. 6 (December): 1905-1915. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.024.
- Li, X M, C K Huang, T F Zhang, A A Teper, K Srivastava, B H Schofield, and H A Sampson. 2000. The chinese herbal medicine formula MSSM-002 suppresses allergic airway hyperreactivity and modulates TH1/TH2 responses in a murine model of allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, no. 4 (October): 660-668. doi:10.1067/mai.2000.110102.
- Li, X M, B H Schofield, C K Huang, G I Kleiner, and H A Sampson. 1999. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103, no. 2 (February): 206-214.
- Li, Xiu-Min, Kamal Srivastava, Alexander Grishin, Chih-Kang Huang, Brian Schofield, Wesley Burks, and Hugh A Sampson. 2003. Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, no. 1 (July): 159-167.
- Liu, X, J Feng, Z R Xu, Y Z Wang, and J X Liu. 2008. Oral allergy syndrome and anaphylactic reactions in BALB/c mice caused by soybean glycinin and beta-conglycinin. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, no. 2 (February): 350-356. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02893.x.
- Longo, Giorgio, Egidio Barbi, Irene Berti, Rosanna Meneghetti, Angela Pittalis, Luca Ronfani, and Alessandro Ventura. 2008. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, no. 2 (February): 343-347. doi:10.1016/j.jaci.2007.10.029.
- Macdougall, CF, A J Cant, and A F Colver. 2002. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Archives of Disease in Childhood* 86, no. 4 (April): 236-239.
- Mari, Adriano, Enrico Scala, Paola Palazzo, Stefano Ridolfi, Danila Zennaro, and Gabriele Carabella. 2006. Bioinformatics applied to allergy: allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. *Cellular Immunology* 244, no. 2 (December): 97-100. doi:10.1016/j.cellimm.2007.02.012.
- Marklund, Birgitta, Staffan Ahlstedt, and Gun Nordström. 2004. Health-related quality of life among adolescents with allergy-like conditions - with emphasis on food hypersensitivity. *Health and Quality of Life Outcomes* 2: 65. doi:10.1186/1477-7525-2-65.
- Martelli, Alberto, Anna De Chiara, Maurizio Corvo, Patrizia Restani, and Alessandro Focchi. 2002. Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 89, no. 6 (December): 38-43.

- Maruyama, N, M Adachi, K Takahashi, K Yagasaki, M Kohno, Y Takenaka, E Okuda, S Nakagawa, B Mikami, and S Utsumi. 2001. Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268, no. 12 (June): 3595-3604.
- Maruyama, N, T Katsube, Y Wada, M H Oh, A P Barba De La Rosa, E Okuda, S Nakagawa, and S Utsumi. 1998. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 258, no. 2 (December 1): 854-862.
- Maruyama, Yukie, Nobuyuki Maruyama, Bunzo Mikami, and Shigeru Utsumi. 2004. Structure of the core region of the soybean beta-conglycinin alpha' subunit. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 60, no. 2 (February): 289-297. doi:10.1107/S0907444903027367.
- Matsumoto, Naoki, Mina Okochi, Miyoko Matsushima, Aki ko Ogawa, Tomokazu Takase, Yasuko Yoshida, Mitsuo Kawase, Ken-Ichi Isobe, Tsutomu Kawabe, and Hiroyuki Honda. 2009. Development of peptide arrays for detection of IgE-binding epitopes in cow's milk allergens. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, no. 3 (March): 324-330. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.10.014.
- Mercer, N, L Guzman, E Cueto Rua, R Drut, H Ahmed, G R Vasta, M A Toscano, G A Rabinovich, and G H Docena. 2009. Duodenal intraepithelial lymphocytes of children with cow milk allergy preferentially bind the glycan-binding protein galectin-3. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 22, no. 1 (March): 207-217.
- Mittag, Diana, Stefan Vieths, Lothar Vogel, Wolf-Meinhard Becker, Hans-Peter Rihs, Arthur Helbling, Brunello Wüthrich, and Barbara K Ballmer-Weber. 2004. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, no. 1 (January): 148-154. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.030.
- Morafo, Vivian, Kamal Srivastava, Chih-Kang Huang, Gary Kleiner, Soo-Young Lee, Hugh A Sampson, and AndXiu-Min Li. 2003. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, no. 5 (May): 1122-1128.
- Moroz, L A, and W H Yang. 1980. Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *The New England Journal of Medicine* 302, no. 20 (May 15): 1126-1128.
- Mowat, Allan Md. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews. Immunology* 3, no. 4 (April): 331-341. doi:10.1038/nri1057.
- Natarajan, Savithry S, Chenping Xu, Perry Cregan, Thomas J Caperna, Wesley M Garrett, and Devanand Luthria. 2009. Utility of proteomics techniques for assessing protein expression. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 54, no. 3 (August): S32-36. doi:10.1016/j.yrtph.2008.12.003.
- Oberhuber, Christina, Yan Ma, Justin Marsh, Neil Rigby, Ursula Smole, Christian Radauer, Stefano Alessandri, et al. 2008. Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 Suppl 2 (November): S208-219. doi:10.1002/mnfr.200700522.
- Oezguen, Numan, Bin Zhou, Surendra S Negi, Ovidiu Ivanciuc, Catherine H Schein, Gilles Labesse, and Wemer Braun. 2008. Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes. *Molecular Immunology* 45, no. 14 (August): 3740-3747. doi:10.1016/j.molimm.2008.05.026.
- Ogawa, A, M Samoto, and K Takahashi. 2000. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 46, no. 6 (December): 271-279.
- Ogawa, T, N Bando, H Tsuji, K Nishikawa, and K Kitamura. 1995. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopical dermatitis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59, no. 5 (May): 831-833.
- Ogawa, T, N Bando, H Tsuji, H Okajima, K Nishikawa, and K Sasaoka. 1991. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopical dermatitis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 37, no. 6 (December): 555-565.
- Ogawa, T, H Tsuji, N Bando, K Kitamura, Y L Zhu, H Hirano, and K Nishikawa. 1993. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Bioscience,*



- Biotechnology, and Biochemistry* 57, no. 6 (June): 1030-1033.
- Osborn, D A, and J Sinn. 2004. Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, no. 3: CD003741. doi:10.1002/14651858.CD003741.pub2.
- . 2006. Formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, no. 4: CD003664. doi:10.1002/14651858.CD003664.pub3.
- Osborn, Mark J, Patricia L Ryan, Nicole Kirchof, Angela Panoskaltis-Mortari, Frank Mortari, and Kim-Sue R S Tudor. 2004. Overexpression of murine TSLP impairs lymphopoiesis and myelopoiesis. *Blood* 103, no. 3 (February 1): 843-851. doi:10.1182/blood-2003-05-1557.
- Osterballe, M, T K Hansen, C G Mortz, A Høst, and C Bindslev-Jensen. 2005. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 16, no. 7 (November): 567-573. doi:10.1111/j.1399-3038.2005.00251.x.
- Osterballe, M, C G Mortz, T K Hansen, K E Andersen, and C Bindslev-Jensen. 2009. The prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 20, no. 7 (November): 686-692. doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00842.x.
- Palmer, Krida, and Wesley Burks. 2006. Current developments in peanut allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 6, no. 3 (June): 202-206. doi:10.1097/01.all.0000225161.60274.31.
- Pequet, S, L Bovetto, F Maynard, and R Fritsché. 2000. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, no. 3 (March): 514-521. doi:10.1067/mai.2000.103049.
- Peeters, Kim A B M, Julie A Nordlee, André H Penninks, Lingyun Chen, Richard E Goodman, Carla A F M Bruijnzeel-Koomen, Sue L Hefle, Steve L Taylor, and André C Knulst. 2007. Lupine allergy: not simply cross-reactivity with peanut or soy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, no. 3 (September): 647-653. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.032.
- Perrier, C, A-C Thierry, A Mercenier, and B Corthésy. 2010. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40, no. 1 (January): 153-162. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03329.x.
- Perrigoue, Jacqueline G, Steven A Saenz, Mark C Siracusa, Eric J Allenspach, Betsy C Taylor, Paul R Giacomini, Meera G Nair, et al. 2009. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nature Immunology* 10, no. 7 (July): 697-705. doi:10.1038/ni.1740.
- Petrucelli, S., F.G. Chirido, and M.C. Añón. 2005. Immunochemical reactivity of soybean  $\beta$ -conglycinin subunits. *Food and Agricultural Immunology* 16, no. 1: 17-28.
- Pons, Laurent, Usha Ponnappan, Renée A Hall, Pippa Simpson, Gael Cockrell, C Michael West, Hugh A Sampson, Ricki M Helm, and A Wesley Burks. 2004. Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: modulation of the peanut-allergic response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, no. 4 (October): 915-921. doi:10.1016/j.jaci.2004.06.049.
- Prak, Krisna, Kazuyo Nakatani, Tomoyuki Katsube-Tanaka, Motoyasu Adachi, Nobuyuki Maruyama, and Shigeru Utsumi. 2005. Structure-function relationships of soybean proglycinins at subunit levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, no. 9 (May 4): 3650-3657. doi:10.1021/jf047811x.
- Pumphrey, Richard S H, and M Hazel Gowland. 2007. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, no. 4 (April): 1018-1019. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.021.
- Radauer, Christian, and Heimo Breiteneder. 2007. Evolutionary biology of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, no. 3 (September): 518-525. doi:10.1016/j.jaci.2007.07.024.

- Rancé, F, X Grandmottet, and H Grandjean. 2005. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35, no. 2 (February): 167-172. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02162.x.
- Rancé, Fabienne. 2009. Novel approaches in treating food allergy using allergens. *Nestlé Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme* 64: 157-163; discussion 164-167, 251-257. doi:10.1159/000235789.
- van Ree, Ronald. 2004. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 4, no. 3 (June): 235-240.
- Riffelmann, F. 2008. [Anti IgE therapy (off label use) in severe peanut allergy with recurrent anaphylaxis]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 62, no. 6 (June): 337-339. doi:10.1055/s-2008-1038114.
- Rimoldi, Monica, Marcello Chieppa, Valentina Salucci, Francesca Avogadri, Angelica Sonzogni, Gianluca M Sampietro, Angelo Nespoli, Giuseppe Viale, Paola Allavena, and Maria Rescigno. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the cross talk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology* 6, no. 5 (May): 507-514. doi:10.1038/ni1192.
- Rona, Roberto J, Thomas Keil, Colin Summers, David Gislason, Laurian Zuidmeer, Eva Sodergren, Sigurveig T Sigurdardottir, et al. 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, no. 3 (September): 638-646. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.026.
- Rosa, Daniela Santoro, Susan Pereira Ribeiro, and Edecio Cunha-Neto. 2010. CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 58, no. 2 (April): 121-130. doi:10.1007/s00005-010-0067-0.
- Roux, Kenneth H, Suzanne S Teuber, and Shridhar K Sahe. 2003. Tree nut allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* 131, no. 4 (August): 234-244. doi:10.1159/000072135.
- Rozenfeld, P, G H Docena, M C Añón, and C A Fossati. 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clinical and Experimental Immunology* 130, no. 1 (October): 49-58.
- Ruiter, B, V Trégoat, L M'rabet, J Garssen, C A F M Bruijnzeel-Koomen, E F Knol, and E Hoffen. 2006. Characterization of T cell epitopes in alpha1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36, no. 3 (March): 303-310. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02436.x.
- Saarienen, K M, O Vaarala, P Klemetti, and E Savilahti. 1999. Transforming growth factor-beta1 in mothers' colostrum and immune responses to cows' milk proteins in infants with cows' milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, no. 5 (November): 1093-1098.
- Saarienen, Kristiina M, Anna S Pelkonen, Mika J Mäkelä, and Erkki Savilahti. 2005. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, no. 4 (October): 869-875. doi:10.1016/j.jaci.2005.06.018.
- Saarienen, U M, and M Kajosaari. 1995. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* 346, no. 8982 (October 21): 1065-1069.
- Saha, Sudipto, and G P S Raghava. 2006. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Research* 34 (July 1): W202-209. doi:10.1093/nar/gkl343.
- Samoto, M, K Takahashi, Y Fukuda, S Nakamura, and Y Kawamura. 1996. Substantially complete removal of the 34kDa allergenic soybean protein, Gly m Bd 30 K, from soy milk of a mutant lacking the alpha- and alpha'-subunits of conglycinin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60, no. 11 (November): 1911-1913.
- Samoto, M, Fukuda, Y, Takahashi, K, Tabuchi, K, Hiemori, M, Tsuji, H, Ogawa, T and Kawamura, Y (1997). "Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K, and the alpha-subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124." *Biosci Biotech Biochem* 21:2148-50.
- Sampson, H A. 1999. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103, no. 5 (May): 717-728.

- Savilahti, E, and M Kuitunen. 1992. Allergenicity of cow milk proteins. *The Journal of Pediatrics* 121, no. 5 (November): S12-20.
- Scurlock, Amy M, and A Wesley Burks. 2004. Peanut allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 93, no. 5 (November): S12-18.
- Schade, R P, A G Van Ieperen-Van Dijk, F C Van Reijssen, C Versluis, J L Kimpen, E F Knol, C A Bruijnzeel-Koomen, and E Van Hoffen. 2000. Differences in antigen-specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: relevance of TH2 cytokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, no. 6 (December): 1155-1162. doi:10.1067/mai.2000.110802.
- Schulmeister, Ulrike, Heidrun Hochwallner, Ines Swoboda, Margarete Focke-Tejkl, Beate Geller, Mats Nystrand, Annika Härlin, et al. 2009. Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 11 (June 1): 7019-7029. doi:10.4049/jimmunol.0712366.
- Shek, L P C, L Bardina, R Castro, H A Sampson, and K Beyer. 2005. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 60, no. 7 (July): 912-919. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00705.x.
- Sicherer, S H, and H A Sampson. 1999. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29, no. 4 (April): 507-512.
- Sicherer, Scott H, and Hugh A Sampson. 2006. 9. Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, no. 2 (February): S470-475. doi:10.1016/j.jaci.2005.05.048.
- . 2007. Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, no. 3 (September): 491-503; quiz 504-505. doi:10.1016/j.jaci.2007.07.015.
- . 2009a. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual Review of Medicine* 60: 261-277. doi:10.1146/annurev.med.60.042407.205711.
- . 2009b. 10. Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (December 28). doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042231>.
- Sicherer, Scott H, Robert A Wood, Donald Stablein, A Wesley Burks, Andrew H Liu, Stacie M Jones, David M Fleischer, et al. 2010. Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of Food Allergy Research) of food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, no. 5 (May): 1077-1083.e8. doi:10.1016/j.jaci.2010.02.038.
- Silvanovich, Andre, Margaret A Nemeth, Ping Song, Rod Herman, Laura Tagliani, and Gary A Bannon. 2006. The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 90, no. 1 (March): 252-258. doi:10.1093/toxsci/kfj068.
- Skripak, Justin M, Elizabeth C Matsui, Kim Mudd, and Robert A Wood. 2007. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, no. 5 (November): 1172-1177. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.023.
- Skripak, Justin M, and Robert A Wood. 2009. Mammalian milk allergy: avoidance strategies and oral desensitization. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, no. 3 (June): 259-264. doi:10.1097/ACI.0b013e32832b2218.
- Sokol, Caroline L, Gregory M Barton, Andrew G Farr, and Ruslan Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunology* 9, no. 3 (March): 310-318.
- Sordet, Camille, Raphaël Culerrier, Claude Granier, Alain Didier, and Pierre Rougé. 2009. IgE-binding epitopic peptide mapping on a three-dimensional model built for the 13S globulin allergen of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Peptides* 30, no. 6 (June): 1021-1027. doi:10.1016/j.peptides.2009.03.005.
- Soumelis, Vassili, Pedro A Reche, Holger Kanzler, Wei Yuan, Gina Edward, Bernhart Homey, Michel Gilliet, et al. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology* 3, no. 7 (July): 673-680. doi:10.1038/ni805.
- Spuergin, P, M Walter, E Schiltz, K Deichmann, J Forster, and H Mueller. 1997. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy* 52, no. 3 (March): 293-298.

- Staden, U, C Rolinck-Weminghaus, F Brewe, U Wahn, B Niggemann, and K Beyer. 2007. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 62, no. 11 (November): 1261-1269. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01501.x.
- Stadler, Michael B, and Beda M Stadler. 2003. Allergenicity prediction by protein sequence. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, no. 9 (June): 1141-1143. doi:10.1096/fj.02-1052fje.
- Takagi, Hidenori, Takachika Hiroi, Lijun Yang, Yoshifumi Tada, Yoshikazu Yuki, Kaoru Takamura, Ryotaro Ishimitsu, Hideyuki Kawachi, Hiroshi Kiyono, and Fumio Takaiwa. 2005. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, no. 48 (November 29): 17525-17530. doi:10.1073/pnas.0503428102.
- Takai, Toshiro, Takeshi Kato, Hiroshi Yasueda, Ko Okumura, and Hideoki Oga wa. 2005. Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, no. 3 (March): 555-563. doi:10.1016/j.jaci.2004.11.024.
- Takaiwa, Fumio. 2007. A rice-based edible vaccine expressing multiple T-cell epitopes to induce oral tolerance and inhibit allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 27, no. 1 (February): 129-139. doi:10.1016/j.iac.2006.11.001.
- Tanabe, Soichi. 2007. Epitope peptides and immunotherapy. *Current Protein & Peptide Science* 8, no. 1 (February): 109-118.
- Taneda, S, S Seegerer, K L Hudkins, Y Cui, M Wen, M Seegerer, M H Wener, C G Khairallah, A G Farr, and C E Alpers. 2001. Cryoglobulinemic glomerulonephritis in thymic stromal lymphopoietin transgenic mice. *The American Journal of Pathology* 159, no. 6 (December): 2355-2369.
- Taussig, Lynn M, Anne L Wright, Catharine J Holberg, Marilyn Halonen, Wayne J Morgan, and Fernando D Martinez. 2003. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, no. 4 (April): 661-675; quiz 676.
- Taylor, Betsy C, Colby Zaph, Amy E Troy, Yurong Du, Katherine J Guild, Michael R Comeau, and David Artis. 2009. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of Experimental Medicine* 206, no. 3 (March 16): 655-667. doi:10.1084/jem.20081499.
- Tokuriki, Nobuhiko, and Dan S Tawfik. 2009. Protein dynamism and evolvability. *Science (New York, N.Y.)* 324, no. 5924 (April 10): 203-207. doi:10.1126/science.1169375.
- Towbin, H, T Staehelin, and J Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, no. 9 (September): 4350-4354.
- Tsuji, H, N Bando, M Hiemori, R Yamanishi, M Kimoto, K Nishikawa, and T Ogawa. 1997. Purification and characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61, no. 6 (June): 942-947.
- Turck, Dominique. 2007. Soy protein for infant feeding: what do we know? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 10, no. 3 (May): 360-365. doi:10.1097/MCO.0b013e3280fa821b.
- Untersmayr, Eva, Giovanna Bises, Philipp Starkl, Charles L Bevins, Otto Scheiner, George Boltz-Nitulescu, Fritz Wrba, and Erika Jensen-Jarolim. 2010. The high affinity IgE receptor Fc epsilon R1 is expressed by human intestinal epithelial cells. *PLoS One* 5, no. 2: e9023. doi:10.1371/journal.pone.0009023.
- Upton, M N, A McConachie, C McSharry, C L Hart, G D Smith, C R Gillis, and G C Watt. 2000. Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults: the Midspan family study surveys of parents and offspring. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 321, no. 7253 (July 8): 88-92.
- Valenta, R, M Duchene, C Ebner, P Valent, C Sillaber, P Deviller, F Ferreira, M Tejkl, H Edlmann, and D Kraft. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of Experimental Medicine* 175, no. 2 (February 1): 377-385.

- Valenta, Rudolf, and Verena Niederberger. 2007. Recombinant allergens for immunotherapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, no. 4 (April): 826-830. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.025.
- Vandezande, L M, B Wallaert, P Desreumaux, A Tsicopoulos, C Lamblin, A B Tonnel, and A Janin. 1999. Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29, no. 5 (May): 652-659.
- Venter, Carina, Brett Pereira, Jane Grundy, C Bernie Clayton, Graham Roberts, Bernie Higgins, and Taraneh Dean. 2006. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, no. 5 (May): 1118-1124. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1352.
- Vieths, Stefan, Gerald Reese, Barbara K Ballmer-Weber, Kerstin Beyer, Peter Burney, Montserrat Fernandez-Rivas, Collin Summers, Ronald van Ree, and Clare Mills. 2008. The serum bank of EuroPrevall - the prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46 Suppl 10 (October): S12-14. doi:10.1016/j.fct.2008.07.020.
- Vila, L, K Beyer, K M Järvinen, P Chatchatee, L Bardina, and H A Sampson. 2001a. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31, no. 10 (October): 1599-1606.
- . 2001b. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31, no. 10 (October): 1599-1606.
- Wal, J M. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 56 Suppl 67: 35-38.
- Wal, Jean-Michel. 2004. Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 93, no. 5 (November): S2-11.
- Walker-Smith, John. 2003. Hypoallergenic formulas: are they really hypoallergenic? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 90, no. 6 (June): 112-114.
- Wang, Julie, and Hugh A Sampson. 2007. Food anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37, no. 5 (May): 651-660. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02682.x.
- Wangorsch, Andrea, Barbara K Ballmer-Weber, Paul Rösch, Thomas Holzhauser, and Stefan Vieths. 2007. Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen. *Molecular Immunology* 44, no. 10 (April): 2518-2527. doi:10.1016/j.molimm.2006.12.023.
- Wanich, Niya, Anna Nowak-Wegrzyn, Hugh A Sampson, and Wayne G Shreffler. 2009. Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, no. 4 (April): 789-794.e20. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.1128.
- Whitacre, Caroline C, Fei Song, Richard M Wardrop, Kim Campbell, Melanie McClain, Jacqueline Benson, Zhen Guan, and Ingrid Gienapp. 2004. Regulation of autoreactive T cell function by oral tolerance to self-antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029 (December): 172-179. doi:10.1196/annals.1309.033.
- van Wijk, F, S Hartgring, S J Koppelman, R Pieters, and L M J Knippels. 2004. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34, no. 9 (September): 1422-1428. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02062.x.
- Wilson, Shannon, Kristen Blaschek, and Elviragonzalez de Mejia. 2005. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. *Nutrition Reviews* 63, no. 2 (February): 47-58.
- Witte man, A M, J H Akkerdaas, J van Leeuwen, J S van der Zee, and R C Aalberse. 1994. Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *International Archives of Allergy and Immunology* 105, no. 1 (September): 56-61.

- Wood, Robert A. 2003. The natural history of food allergy. *Pediatrics* 111, no. 6 (June): 1631-1637.
- Xiang, Ping, Tom A Beardslee, Michael G Zeece, John Markwell, and Gautam Sarath. 2002a. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408, no. 1 (December 1): 51-57.
- . 2002b. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408, no. 1 (December 1): 51-57.
- Xiang, Ping, Eric J Haas, Michael G Zeece, John Markwell, and Gautam Sarath. 2004. C-Terminal 23 kDa polypeptide of soybean Gly m Bd 28 K is a potential allergen. *Planta* 220, no. 1 (November): 56-63. doi:10.1007/s00425-004-1313-7.
- Yang, M, C Yang, and Y Mine. 2010. Multiple T cell epitope peptides suppress allergic responses in an egg allergy mouse model by the elicitation of forkhead box transcription factor 3- and transforming growth factor-beta-associated mechanisms. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40, no. 4 (April): 668-678. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03442.x.
- Ying, Sun, Brian O'Connor, Jonathan Ratoff, Qiu Meng, Kirsty Mallett, David Cousins, Douglas Robinson, et al. 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, no. 12 (June 15): 8183-8190.
- Zeiger, R S, H A Sampson, S A Bock, A W Burks, K Harden, S Noone, D Martin, S Leung, and G Wilson. 1999. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *The Journal of Pediatrics* 134, no. 5 (May): 614-622.
- Zhang, Guo Yan, Yukako Hayashi, Shinya Matsumoto, Yasuki Matsumura, and Tomohiko Mori. 2002. Molecular species of glycinin in some soybean cultivars. *Phytochemistry* 60, no. 7 (August): 675-681.
- Zhang, T, W Pan, M Takebe, B Schofield, H Sampson, and X-M Li. 2008. Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, no. 11 (November): 1808-1818. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03075.x.
- Zoppi, G, and S Guandalini. 1999. The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 28, no. 5 (May): 541-543.
- Zuidmeer, Laurian, Klaus Goldhahn, Roberto J Rona, David Gislason, Charlotte Madsen, Colin Summers, Eva Sodergren, et al. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, no. 5 (May): 1210-1218.e4. doi:10.1016/j.jaci.2008.02.019.