

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis

**Caracterización del alergeno principal de soja
Gly m Bd 30K como proteína de reactividad
cruzada con caseínas bovinas y su potencial
aplicación en inmunoterapias**

Tesista: Bioquímica Candreva Ángela María

Directora: Dra. Silvana Petruccelli

Co-Director: Dr. Guillermo H. Docena

2013

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 de la Dra. Silvana Petruccelli y la co-dirección de Dr. Guillermo H. Docena en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) y en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La Plata, Marzo de 2013.

Agradecimientos

Este como muchos trabajos de tesis es el resultado de años de trabajo y dedicación que sin el apoyo, la ayuda y colaboración de muchas personas no podría haber concretado.

Gracias a mis padres (los doritos) Dora y Omar porque sin ellos no sería quien ahora yo soy, por estar siempre, por enseñarme a ser libre, por enseñarme a defender lo que pienso lo que creo y lo que quiero, por enseñarme a luchar por todo eso y por luchar ellos por todo, porque demostrando se enseña y ellos siempre me demostraron los mejores valores que uno puede aprender, porque sin ellos no sería nada, los amo.

A mis hermanos Marisa, Myrian y Fernando por estar siempre, porque sé que siempre cuento con ellos, los amo también. Mamu sos lo más sabelo! A mis sobrinas, todas mujeres! Mis chicas que amo mucho! Agus la más linda y reflexiva, Valen la más compañera, inteligente y colaboradora, Isa la rebelde, graciosa y por momentos cariñosa y a Cata la más chiquita y simpática. También quiero agradecerle a mis cuñados, a Roberto (papu) por todo el apoyo y consejos que sobretodo me dió en estos últimos tiempos (además de aguantarse a mamu!) y a Esteban por darme junto con mi hermana a esos tres soles que me iluminan. A mi tío Ardian que quiero tanto y que me aguantó en mi viaje por las Españas.

A todos mis amigos y compañeros de la vida que fui recopilando mientras transitaba la tesis y algunos desde mucho antes, principalmente a Carlitos por estar siempre, por escucharme (tarea difícil) y darme consejos, buenos consejos siempre, por los mates, por los asaditos por compartir su hermosa familia (Vane, Juan, Feli, Tade e Isa) conmigo y con todos los que lo queremos, por la capacidad de arrancarte risas cuando estás bajón, por ese humor que me encanta. A la Silvi, a Pau y a la Gallega (Elena) que desde que las conocí (y no hace mucho) me demostraron que "compartir es vivir".

A mis compañeros y amigos de los dos laboratorios (el LISIN y el labo de proteínas) porque aunque me peleen y me digan en uno que pertenezco al otro, yo me siento parte de los dos por igual! Lo lamento me van a tener que aguantar!!! A la familia del CIDCA: Pau, Ale, Cami, Silvi, Elena, Agus Nardo, Agustín, Cristian, Nachito, Bruno, el plomo de Jorge, Gaby, Pablo, Ceci C, Ceci O, Anita, Juli, Fran, Noe, Fabri, Charli, Yani, Vane, Gonza, Ila, Cristina, las Adrianas, Vale, Norita y Claudio. A la familia hermosa del LISIN: a todos los que forman el grupo hermoso

que me tocó compartir y principalmente a Reni y Pao por sus enseñanzas y catarsis cuando las cosas no andan! A Rodri el chiquitín, Lu, Ceci y Fer Trejo! Y a todo el LISIN entero: Nico, Beluga, Juancito, Agus, Romi C, Eze, Lolita, Romi Araya, Florcita, Vani, Herni, Amanda, Yani la colo, Gri, Costy la simpática! Dave, Agus Z, Dom, JC, Paula, Martín, Fer Chirido y Alberto.

A mis compas de la cátedra: Luciana, pobre Lu cuanto me aguantás! Gracias! Emi, Mica, Lari, Pedro, Patricia, el Chino, Héctor, los Lucas, Facu, Andrés, Mario, Vicki, Euge, Marce, Pau, Mauricio, Matías, Fabricio y Marcos. A mis amigos "del cuartito": Martín, Vero y Pili y a mis amigas del CEQUINOR: Bea, Anita y Bety.

Quiero agradecerles infinitamente a mis directores Silvana Petruccelli y Guillermo Docena que me dieron la oportunidad de poder desarrollar esta tesis, por todo lo que me enseñaron, porque confiaron en mí sin apenas conocerme, por sus consejos, por su constante apoyo y principalmente por darme libertad en el trabajo.

A Seba Trejo por recibirme en Barcelona, por ayudarme tanto, por aguanterme, a Silvia y Mario dos genios!

A Gustavo Parisi por aclararme dudas y darme ideas bioinformáticas.

A Alberto Fossati y a Cristina Añon por recibirme en los laboratorios que dirigen.

Al CIDCA y al LISIN por brindarme el lugar de trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y a CONICET y ante todo a la educación pública en todos los niveles en la que creo ciegamente, ya que si no existiera muchos no tendríamos oportunidades.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	5
ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	13
OBJETIVOS	17
1. Objetivo general	17
2. Objetivos Particulares	17
INTRODUCCIÓN.....	19
1. ALERGIA	21
1.1. Hipersensibilidad a los alimentos	24
1.2. La inflamación alérgica	30
1.3. Mecanismos de alergia y tolerancia	32
2. ALERGENOS ALIMENTARIOS.....	37
2.1. Proteínas alergénicas.....	37
2.2. Alergenos de la leche de vaca.....	39
2.3. Alergenos de la soja	41
3. PREVALENCIA	43
3.1. Epidemiología de la hipersensibilidad a los alimentos	43
3.2. Prevalencia de las alergias de leche de vaca y a soja.....	45
4. REACTIVIDAD CRUZADA.....	47
4.1. Reactividad cruzada, co-sensibilización y co-reconocimiento	47
4.1. Reactividad cruzada y alergia alimentaria a leche de vaca	48
5. Diagnóstico de las alergias alimentarias	50

Indice

6. Terapias para el tratamiento de las alergias alimentarias.....	52
6.1. Terapias alérgico-específicas.....	53
6.2. Terapias alérgico-no específicas.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. MATERIALES.....	63
1.1. Extractos de proteínas de soja	63
1.2. Proteínas de Leche Bovina	63
1.3. Proteínas puras comerciales.....	63
1.4. Oligonucleótidos	64
1.5. Sueros específicos.....	66
1.6. Péptidos sintéticos	67
1.7. Enzimas proteolíticas	67
1.8. Esferas superparamagnéticas	68
1.9. Ratones.....	68
2. MÉTODOS	69
2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR	69
2.1.1. Clonado del gen codificante para Gly m 5.0101 (subunidad α de la β -conglucina).....	69
2.1.2. Clonado de los genes codificantes para las proteínas Gly m Bd 30K y Gly m Bd 28K	69
2.1.3. Subclonado de secuencias codificantes para fragmentos de las proteínas de soja Gly m Bd 30K.....	70
2.1.4. Preparación de células competentes químicas empleando PEG.....	70
2.1.5. Transformación en bacterias competentes químicas	70
2.1.6. Amplificación y preparación de los plásmidos	71
2.1.7. Expresión de las proteínas recombinantes a baja escala y estudio de la cinética de expresión	71

2.1.8. Expresión a gran escala de las proteínas recombinantes	72
2.2. ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS	73
2.2.1. Inmunoblots de las caseínas bovinas, leche y soja con mAbs	73
2.2.2. ELISA indirecto de las proteínas recombinantes de soja con sueros de pacientes alérgicos a PS.....	73
2.2.3. Inmunoblots de las proteínas recombinantes de soja con mAbs y sueros de pacientes ALV	74
2.2.4. ELISA de competición	75
2.2.5. Mapeo de epitopes lineales de Gly m Bd 30K (P34) con péptidos solapados	76
2.3. INMUNOPROTEÓMICA.....	77
2.3.1. Medida de la afinidad Ag–Ab	77
2.3.2. Mapeo del epitopes de caseínas bovinas con anticuerpos monoclonales	78
2.4. MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA.....	82
Protocolos de Inmunización.....	82
2.4.1. Plan de sensibilización de los ratones	82
2.4.2. Plan de tolerización de los ratones	83
2.4.3. Evaluación de la respuesta inmune	84
Pruebas <i>in vivo</i>	84
Ensayos <i>in vitro</i>	86
2.4.4. Análisis estadístico	90
2.5. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	90
2.5.1. Análisis de reactividad cruzada utilizando el servidor SDAP	90
2.5.2. Predicción Computacional de epitopes de reactividad cruzada	91
2.5.3. Modelado por homología.....	92
2.5.4. Accesibilidad al solvente.....	92
2.5.5. Predicción computacional de epitopes B.....	93

2.5.6. Análisis secuencial y comparación de la composición aminoacídica	93
CAPÍTULO I – IDENTIFICACIÓN DE EPITOPES DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE PROTEÍNAS LECHE DE VACA Y SOJA EMPLEANDO TÉCNICAS DE INMUNOPROTEÓMICA	95
1. Generalidades	97
2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos	101
3. Diseño experimental	102
4. Resultados	103
4.1. Los mAbs–CB seleccionados reaccionan diferencialmente con las caseínas bovinas y reconocen proteínas de soja.....	103
4.2. Los valores de KD 1D5–caseínas ratifican la selectividad y la heteroespecificidad observada en los inmunoblots.....	105
4.3. El uso de técnicas de espectrometría de masas permite la localización de epitopes en las caseínas bovinas	106
4.4. Es factible el empleo de los mAbs específicos de caseínas como herramientas inmunológicas para estudiar la reactividad cruzada e identificar epitopes en proteínas de soja	114
5. Discusión	116
CAPÍTULO II – ANÁLISIS INMUNOQUÍMICO DE LOS ALERGENOS MAYORES DE SOJA Gly m Bd 30K y Gly m Bd 28K Y ESTUDIO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LA REACTIVIDAD CRUZADA CON CASEÍNAS DE LECHE DE VACA	123
1. Generalidades	125
2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos	127
3. Diseño experimental	128
4. Resultados	129
4.1. Las proteínas de soja Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd28K (P28) son reconocidas <i>in vitro</i> por anticuerpos específicos de proteínas de leche de vaca.....	129

4.2. La proteína de soja Gly m Bd 30K (P34) desencadena una respuesta de hipersensibilidad en un modelo murino de alergia a la leche de vaca	135
4.2.1. Los ratones sensibilizados desarrollan signos clínicos post desafío	136
4.2.2. La sensibilización de los ratones con PLV+TC promueve una respuesta de anticuerpos del tipo Th2 que además muestran reactividad cruzada.....	139
4.2.3. Esplenocitos estimulados con PLV, PS o proteínas recombinantes de soja secretan citoquinas del perfil Th2.....	140
4.2.4. Antígenos de soja producen pruebas cutáneas positivas en ratones sensibilizados con PLV.....	142
5. Discusión.....	145
 CAPÍTULO III – EMPLEO DE LA PROTEÍNA DE SOJA Gly m Bd 30K DE REACTIVIDAD CRUZADA CON LECHE DE VACA PARA EL DESARROLLO DE UNA INMUNOTERAPIA TOLEROGÉNICA EN EL MODELO MURINO DE ALERGIA A LECHE DE VACA.....	
1. Generalidades.....	151
2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos	155
3. Diseño experimental	156
4. Resultados.....	158
4.1. Los animales pretratados muestran una disminución de la sintomatología alérgica frente al desafío antigénico	158
4.2. Los tratamientos tolerizantes provocan una variación en los niveles séricos de los diferentes isotipos de anticuerpos	159
4.3. No se detectan niveles de interleuquinas del perfil Th2 en ratones pretratados	160
4.4. La prueba cutánea fue negativa en los ratones sometidos al tratamiento de tolerización.....	161
4.5. Se logró inducir linfocitos T regulatorios en las mucosas de los animales pre-tratados	163
5. Discusión.....	165

CAPÍTULO IV – ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LOS MAYORES ALERGENOS DE SOJA Gly m Bd 30K y Gly m Bd 28K – BÚSQUEDA DE UN PÉPTIDO HIPOALERGÉNICO DE SOJA PARA EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS ALIMENTARIAS	167
1. Generalidades	169
2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos	173
3. Diseño experimental	174
4. Resultados	175
4.1. Los métodos computacionales constituyen una herramienta eficaz para la predicción de epitopes de reactividad cruzada.	175
4.1.1. Los servidores disponibles no predicen la reactividad cruzada entre PLV y PS.....	175
4.1.2. Mediante alineamientos con epitopes de caseínas bovinas se localizaron dos zonas de similitud secuencial entre caseínas y Gly m Bd 30K	179
4.1.3. Los epitopes de reactividad cruzada predichos <i>in silico</i> se encuentran en la superficie de Gly m bd 30K	183
4.2. Los péptidos recombinantes que contienen las zonas I y II son reconocidos diferencialmente <i>in vitro</i> por anticuerpos específicos a proteínas de leche de vaca.....	186
4.3. Los mAbs anti-caseínas y sueros de pacientes alérgicos reconocen péptidos que se encuentran en las regiones predichas de reactividad cruzada <i>in silico</i>	191
4.3. Análisis secuencial y comparación de la composición aminoacídica	196
5. Discusión	199
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	205
GRÁFICOS Y TABLAS ADICIONALES.....	215
BIBLIOGRAFÍA.....	231

ABREVIATURAS

aas Aminoácidos

Ac Anticuerpo

ACN Acetonitrilo

Ag Antígeno

ALV Alergia a la leche de vaca

α -CTD Porción carboxilo terminal de Gly m 5.0101 (subunidad α de la β -conglucina)

β -Lg β -lactoglobulina

BSA Seroalbúmina bovina

CAN α -ciano-4-hidroxicinámico

CB Caseína bovinas

ConA Concanavalina A

CPA Célula presentadora de antígenos

CT-P34 Péptido recombinante carboxilo terminal, porción carboxilo terminal de Gly m Bd 30K

DBPC Desafío oral doble ciego con placebo

DO Densidad óptica

E.coli Escherichia coli

EAST Enzyme Allergo-Sorbent Test – Ensayo enzimático de alérgeno adsorbido

ELISA Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas

EDTA Ácido etanolaminotetraacético

FAL Fosfatasa Alcalina

FE Fracción eluído

FI Fracción insoluble

FNR Fracción no retenido

FS Fracción soluble

GALT Tejido linfóide asociado al intestino

HRP Horseradish peroxidase – Peroxidasa de rábano picante

IFN- γ Interferón gama

Ig Inmunoglobulina

Abreviaturas

ig Administración intragástrica

IL Interleuquina

ip Administración intraperitoneal

IPTG Isopropil-b-D-thiogalactopiranosido

iv Administración intravenosa

LB Linfocito B

LPS Lipopolisacárido

LT Linfocito T

mAb Anticuerpo monoclonal

mAb-CB Anticuerpo monoclonal específico de caseínas bovinas

MBP Maltosa Binding Protein

Medio/ágar LB Medio de cultivo Luria Bertani

NT-P34 Péptido recombinante amino terminal, porción amino terminal de Gly m Bd 30K

OPD o-fenilendiamina

OVA Ovoalbúmina

ON Overnight - “durante toda la noche”

PBS Buffer fosfato salino

PC Prueba cutánea

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDVF Membrana de polivinilidenedifloride

PLV Proteínas de leche de vaca

PNPP p-nitrofenilfosfato

PS Proteínas de soja

P28 Gly m Bd 28K

P34 Gly m Bd 30K

rpm Revoluciones por minuto

RT Temperatura ambiente

sc Administración sub-cutánea

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SE Suero equino

SF Solución fisiológica

SFB Suero fetal bovino

sl Administración sublingual

TBS Tris Buffer Sodio

TBS-T Tris Buffer Sodio con el agregado de 0.1% de Tween 20

TC Toxina colérica

TFA Ácido trifluoroacético

TGF- β Factor de crecimiento transformante- β

Th Linfocito T helper (colaborador)

Treg Célula T reguladora

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis fue desarrollar diferentes metodologías que permitan explicar las bases moleculares de las alergias alimentarias a proteínas de leche de vaca y a soja e identificar potenciales proteínas de reactividad cruzada entre ambos sistemas, con el fin último de aplicar estos nuevos conocimientos para el desarrollo de técnicas de inmunointervención destinadas a establecer tolerancia oral a leche de vaca.

2. Objetivos Particulares

- ✓ Empleando técnicas de inmunoproteómica, identificar los epitopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales contra caseínas bovinas utilizados para la detección de proteínas de soja de reactividad cruzada.
- ✓ Obtener de forma recombinante y caracterizar *in vitro* mediante distintas herramientas inmunológicas los dos alérgenos mayoritarios de la soja Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28).
- ✓ Estudiar la relevancia clínica de las proteínas de soja caracterizadas en un modelo animal de alergia alimentaria a leche de vaca.
- ✓ Aplicar la información obtenida en el diseño de una terapia tolerogénica en un modelo animal de alergia alimentaria.
- ✓ Evaluar las características secuenciales y estructurales de los alérgenos de soja estudiados y elaborar un modelo o estrategia computacional que permita predecir epitopes de reactividad cruzada con leche bovina.
- ✓ Obtener un péptido candidato para el potencial desarrollo de una terapia tolerogénica para el tratamiento de alergias alimentarias.

INTRODUCCIÓN

1. ALERGIA

Las enfermedades alérgicas como la rinitis alérgica, el asma, las alergias alimentarias y el eccema atópico se encuentran entre las causas más comunes de enfermedades crónicas. Estas enfermedades se caracterizan por una falla en la respuesta inmune frente a antígenos inocuos. Estas respuestas adversas se denominan reacciones de hipersensibilidad y fueron clasificadas en cuatro tipos diferentes por Gell y Coombs (Gell et al., 1963).

El término "atopía" (del griego *atopos*, significa fuera de lugar) se utiliza a menudo para describir enfermedades mediadas por IgE. Los pacientes atópicos tienen una predisposición hereditaria para producir anticuerpos IgE contra el común de los alérgenos ambientales y manifiestan una o más enfermedades atópicas (Kay, 2001). Frente a la exposición a un antígeno desencadenante de una reacción alérgica, los individuos normales o no alérgicos desarrollan los mecanismos de tolerancia y producen anticuerpos alérgeno-específicos de los isotipos IgG1 e IgG4 que no desencadenan reacciones inflamatorias, a diferencia de la IgE, dado que no tienen receptores en mastocitos, basófilos o eosinófilos. Las personas atópicas, por el contrario, montan una respuesta exagerada frente al alérgeno caracterizada por la producción de anticuerpos alérgeno-específicos del isotipo IgE. Estos anticuerpos se encuentran elevados en circulación, pero principalmente están unidos a sus receptores de alta afinidad en las células antes mencionadas. Frente a sucesivas exposiciones al alérgeno, éste se une a las moléculas de IgE en la superficie celular induciendo la activación de las células y un foco inflamatorio. La presencia de IgE indica la activación de linfocitos T (LT) específicos que se han expandido, los cuales mediante colaboración con los linfocitos B (LB) inducen la secreción de IgE ("switch" de isotipo). Por lo tanto en un individuo atópico es posible detectar IgE específica en el suero (se evidencia mediante inmunoensayos tipo ELISA o EAST), mastocitos sensibilizados en la piel (pruebas cutáneas) y LT específicos en circulación. Estas células se evidencian *in vitro* al expandirlas con el alérgeno específico y a través del análisis de la proliferación celular o secreción de citoquinas, en este caso citoquinas Th2: IL-4, IL-5 e IL-13. Como característica inmunopatológica de las enfermedades alérgicas es común observar un infiltrado celular con eosinófilos, mastocitos y LT, en los casos que es posible acceder al tejido

blanco del proceso inflamatorio (Romagnani, 1991; Till et al., 1997). También es posible detectar niveles aumentados de quimoquinas provenientes de la activación de la inmunidad innata (RANTES, eotaxina, CCL20, MIP-1 α , MDC, etc) (Kay, 2001).

La respuesta inmune de prácticamente todos los niños recién nacidos está dominada por las células Th2, dado que en el microambiente interno predomina un entorno Th2 para evitar reacciones inflamatorias durante la embriogénesis producto de la presencia de antígenos no histocompatibles (Prescott et al., 1998). Se propuso que posterior al nacimiento el sistema inmunológico del niño debe madurar y aprender a “manejar” los antígenos. Para ello necesita contactar los antígenos del medio ambiente, principalmente microorganismos, para así activar la rama del sistema inmune Th1, contra-regulatoria de la Th2. Este proceso denominado “desviación inmune” (Holt et al., 1999) es consecuencia de la interacción del organismo con los antígenos del medio ambiente, principalmente los microorganismos, que presentan agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) a las células de la inmunidad innata generando una respuesta Th1-mediada. Sin embargo, en individuos atópicos existe una mayor prevalencia de células Th2 que fueron iniciadas en el útero y que no han sido reguladas correctamente durante los primeros años de vida en que se produce la maduración del sistema inmune. Este fenómeno se ha intentado comprender desde hace muchas décadas, y recién la postulación de la “hipótesis de la higiene” permitió ensayar una explicación para interpretar la mayor prevalencia de estas células en los individuos alérgicos (Strachan, 1989). Sin embargo, esta hipótesis actualmente resulta controversial dado que no permite explicar porque otras patologías Th1-mediadas también se encuentran en franco incremento en las últimas décadas (Diabetes mellitus Tipo I, enfermedad de Crohn, etc) (Bach, 2002) (**figura 1**). Por lo tanto, actualmente se postula que estas patologías serían la consecuencia de fallas en la regulación de la activación de mecanismos inmunológicos, principalmente por deficiencias a nivel de los mecanismos de tolerancia. Existen evidencias experimentales que permiten apoyar esta hipótesis tanto en modelos animales como en humanos.

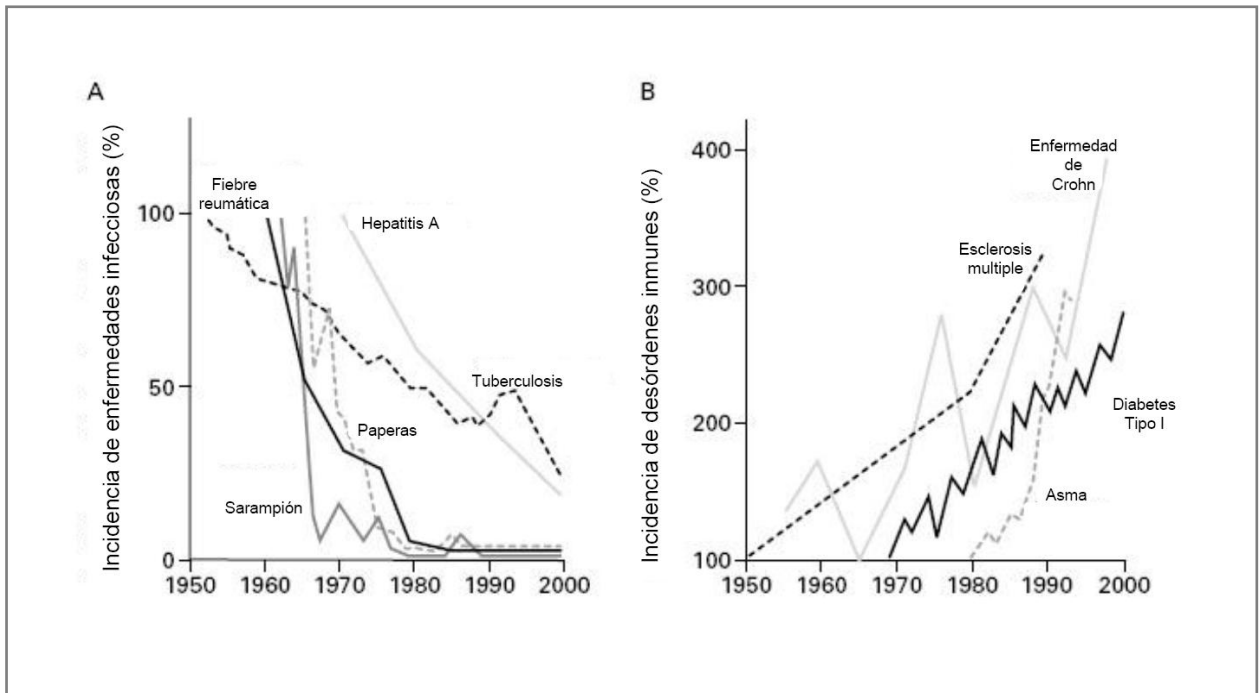


Figura 1. Relación inversa entre la incidencia de enfermedades infecciosas y la incidencia de trastornos inmunológicos (Bach, 2002). En el panel A: datos relativos a las enfermedades infecciosas que se derivan de los Centros para el control y prevención de enfermedades a excepción de los datos de la Hepatitis A que se derivan de Joussemet et al (Joussemet et al., 1999). En el panel B, los datos sobre trastornos inmunitarios se derivan de Farrokhyar et al., (Farrokhyar et al., 2001) Dubois et al., (Dubois et al., 1998) Tuomilehto et al., (Tuomilehto et al., 1999) y Pugliatti et al. (Pugliatti et al., 2001).

Factores adicionales que podemos mencionar y que influyen en la activación de la inmunidad son la cantidad de alérgeno a la que se expone el individuo, la duración de la exposición al alérgeno, la edad de exposición, la frecuencia de exposición y la avidez de las interacciones alérgeno-específicas entre los LT y las células presentadoras de antígeno (CPA) (**figura 2**).

Por lo tanto, el paradigma es la activación Th1-Th2, pero existen otras subpoblaciones T que se han identificado en los últimos años y que ejercen también un papel regulatorio sobre estas dos poblaciones celulares. Las citoquinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 influyen en una amplia gama de eventos asociados con la inflamación alérgica aguda y crónica. Las IL-4 e IL-13 estimulan la producción de IgE y la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares; IL-5 e IL-9 están implicadas en el desarrollo de los eosinófilos; IL-4 e IL-9 promueven el desarrollo de los mastocitos; y las IL-4, IL-9 e IL-13 promueven la sobreproducción de moco (Kay, 2001).

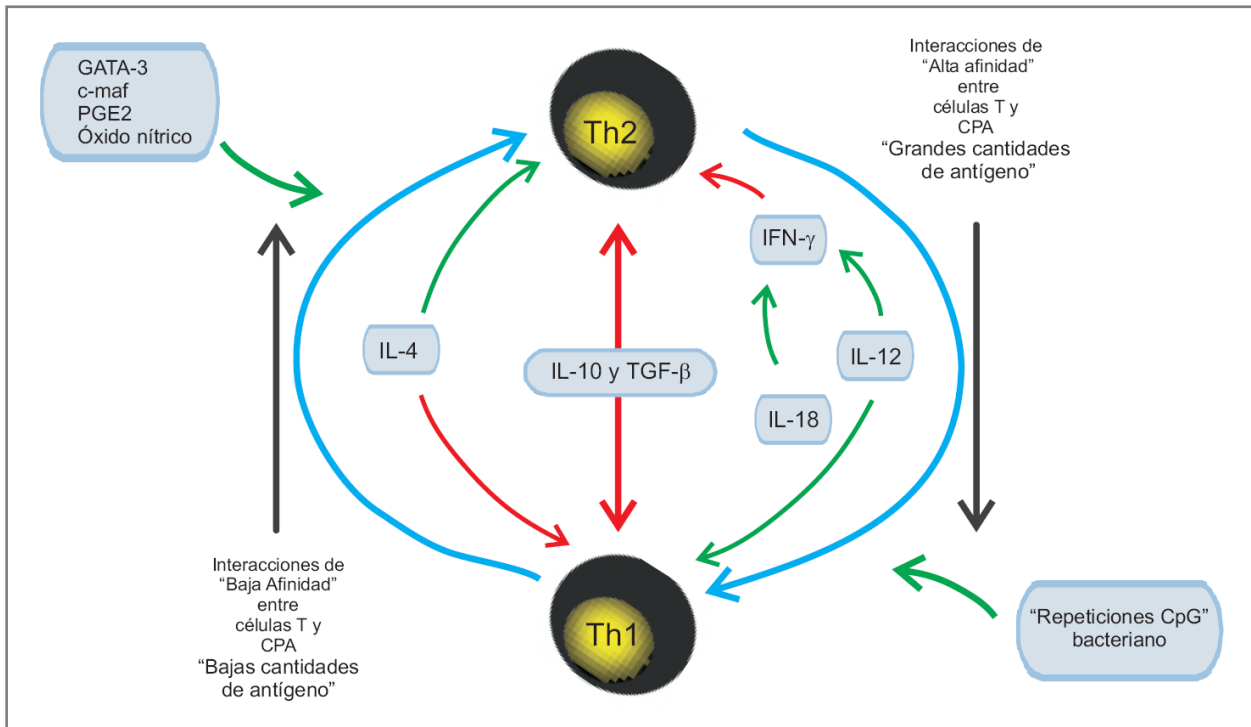


Figura 2. Factores inmunológicos y celulares que regulan la expresión de las células Th1 y Th2. La respuesta inmune Th1 o Th2 está dominada por IL-12 o por IL-4, respectivamente, también por la avidez de las interacciones entre las células T y las CPA y la cantidad de alérgeno (antígeno) al que el sistema inmune está expuesto (Rogers and Croft, 1999). La presencia de repeticiones de citosina-fosfato-guanosina (CpG) hipometilado de origen bacteriano favorece el fenotipo Th1, mientras que la presencia de factores de transcripción tales como GATA-3 son marcadores del fenotipo Th2. El óxido nítrico favorece la expresión de las células Th2 por inhibir menos las células Th2 que las células Th1, mientras que en los seres humanos la IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) generalmente amortiguan las respuestas de ambos tipos de células. El IFN- γ inhibe las respuestas mediadas por células Th2. La IL-12 y la IL-18 producen la liberación de IFN- γ por las células T. La IL-4 inhibe la expresión de las células Th1 y promueve las respuestas Th2-mediadas. Las flechas verdes indican efectos estimulantes, y las flechas rojas, los efectos inhibidores de las citoquinas (Kay, 2001).

1.1. Hipersensibilidad a los alimentos

La alergia alimentaria es una respuesta inmune adversa resultante de la ingestión de alimentos o aditivos alimentarios en la que participa el sistema inmune. Comprenden una amplia variedad de trastornos que pueden ser o no mediados por IgE, y además puede tratarse tanto de reacciones agudas como crónicas (Wang and Sampson, 2011). Sin embargo, comúnmente se las emplea como sinónimo de reacciones que involucran mecanismos mediados por IgE, siendo la anafilaxia un ejemplo clásico. Las alergias alimentarias incluyen entonces anafilaxia, el

“síndrome de alergia oral” (relacionado al polen), síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias, proctocolitis inducida por alimentos, gastroenteropatía eosinofílica y dermatitis atópica (**tabla 1**), y estos trastornos se distinguen de otras reacciones adversas a los alimentos con etiologías no inmunes como las intolerancias a los alimentos que están relacionadas con una respuesta fisiológica anormal, como por ejemplo la intolerancia a la lactosa. Finalmente se encuentran las reacciones tóxicas originadas por los alimentos que a diferencia de las antes mencionadas no dependen de una susceptibilidad individual, sino del alimento. Por ejemplo alimentos contaminados con microorganismos o con toxinas provenientes de microorganismos, o alimentos que contienen histamina (chocolate, banana, palta, pescados en descomposición, etc). En conjunto todas estas reacciones se denominan reacciones adversas por alimentos y se refieren a cualquier anomalía que un alimento puede causar en un organismo. La tendencia, inclusive reflejada por la literatura internacional, es confundir una reacción adversa, del tipo que fuere, con una alergia alimentaria. Esto motiva a definir correctamente los términos para luego abordar un correcto diagnóstico del paciente e instaurar un tratamiento específico.

1.1.1. Mecanismos inmunopatogénicos de las enfermedades alérgicas alimentarias

Las diversas manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias son el resultado en parte de diferentes mecanismos inmunes, respuestas de los órganos blanco y características de las proteínas desencadenantes. Por lo tanto al hablar de alergia alimentaria no nos estamos refiriendo a una única patología, sino que engloba diversas enfermedades (anafilaxia, urticaria, eccema, proctocolitis, gastroenteritis, síndrome de alergia oral, asma, rinitis, etc) con distintas manifestaciones clínicas y distinto origen. Conceptualmente, es importante la categorización de los mecanismos inmunes según tres tipos generales en base a medidas experimentales (**tabla 1**):

–Enfermedades IgE–dependientes

–Enfermedades mediadas por células (sin IgE detectable)

–Enfermedades mixtas (mecanismos IgE–dependientes e IgE–independientes)

Tabla 1. Bases inmunológicas de los trastornos alérgicos por alimentos.

Inmunopatología (presentación frente a la exposición al alimento)	Trastorno	Características claves	Inmunopatología adicional	Desencadenantes alimentarios
Dependiente de IgE (Iniciación aguda)				
	<i>Urticaria/Angioedema.</i>	Ronchas, eritemas y edemas. Iniciado por ingestión o por contacto directo con la piel. La ingestión es comúnmente causa aguda (20%) pero rara vez crónica (2%) de urticaria.		Varios alimentos.
	<i>Síndrome de alergia oral (relacionada al polen).</i>	Prurito, edema leve limitado a la cavidad oral.	Sensibilización a las proteínas del polen por las vías respiratorias resulta en la producción de IgE que se une a ciertas proteínas alimentarias homólogas, típicamente lábiles, (ciertas frutas y verduras).	Frutas frescas y verduras.
	<i>Rinitis, Asma</i>	Estos síntomas pueden acompañar una reacción de alergia alimentaria, pero son aislados o síntomas crónicos.		Pueden ser provocados por la inhalación de alimentos en forma de aerosoles formados por proteínas alimentarias (ej. Leche hervida, harina de maní) o por ingestión.
	<i>Anafilaxia</i>	Progresar rápidamente, afecta múltiples órganos, puede inclusive provocar colapso cardiovascular.	Liberación masiva de mediadores.	Maní, nueces, pescado, mariscos, semillas, y la leche entre otros.
	<i>Anafilaxia asociada a los alimentos, inducida por ejercicio</i>	Anafilaxia desencadenada por alimentos sólo si luego de la ingestión temporal se realiza ejercicio.	Se cree que el ejercicio altera la absorción intestinal y/o la digestión del alérgeno.	Los más comúnmente descritos son trigo, apio y mariscos.

Tabla 1. *Bases inmunológicas de los trastornos alérgicos por alimentos. Continuación.*

Inmunopatología (presentación frente a la exposición al alimento)	Trastorno	Características claves	Inmunopatología adicional	Desencadenantes alimentarios
Mixta-Asociada a IgE/mediada por células (Inicio retardado/crónica)				
	<i>Dermatitis atópica</i>	Asociada a los alimentos en el ~35% de los niños con erupción moderada a severa.	Relacionada al homing en piel de los linfocitos T sensibles a los alimentos.	Huevo, leche, trigo, soja, entre otros.
	<i>Gastroenteropatías eosinofílicas</i>	Los síntomas varían de acuerdo con el sitio(s)/grado de inflamación eosinofílica. Esófago: disfagia, dolor generalizado: ascitis, pérdida de peso, edema, obstrucción.	En el sitio los mediadores activan eosinófilos que desarrollan su rol, por ejemplo, eotaxina, IL-5.	Múltiples alimentos.
Mediada por células (Inicio retardado/crónica)				
	<i>Proteínas de la dieta Enterocolitis</i>	Afecta principalmente a los bebés. Exposición crónica: vómitos, diarrea, crecimiento defectuoso, letargo. Re-exposición después de la restricción: vómitos, diarrea, hipotensión (15%) 2h después de la ingestión.	Aumento de la respuesta TNF- α , disminución de la respuesta a TGF- β .	Leche de vaca, soja, granos.
	<i>Proteínas de la dieta Proctitis</i>	Moco y sangre en las heces de los niños.		Por alimentación con leche de vaca.

Las alergias alimentarias mediadas por IgE son las más comunes en la población general, mientras que las alergias alimentarias no mediadas por IgE representan una proporción significativa de alergias a los alimentos en los lactantes y los niños pequeños. Sin embargo, esto puede reflejar la forma experimental de evidenciarlas y puede no reflejar la realidad. Las primeras son más fáciles de diagnosticar dado que existen métodos *in vitro* e *in vivo* para evidenciar la presencia de IgE específica (se desarrollará más adelante), mientras que los mecanismos celulares son extremadamente difíciles de testificar. En general se debe recurrir al órgano blanco, que es donde se concentran las células patogénicas, y limitaciones éticas

imposibilitan, en la mayoría de los casos, el acceso a las mismas. Actualmente no está completamente dilucidado que es lo que determina que en un individuo alérgico se presenten reacciones mediadas por IgE y/o células, pero existen factores individuales y ambientales que juegan un papel central. La hipótesis de la higiene y los factores genéticos identificados permiten comprender, al menos parcialmente, porque existen individuos que en determinado momento de la vida desarrollan una enfermedad alérgica frente a la exposición a ciertos alérgenos.

Por lo tanto hay factores asociados al individuo, al alérgeno y a la exposición al mismo que determinan la instauración de una alergia. De este modo, la especificidad y el grado de la respuesta inmune afectan la expresión de la enfermedad. Por ejemplo, algunos individuos poseen niveles detectables de IgE específica a cierto alimento pero no manifiestan síntomas luego de su ingestión (Hill et al., 2008). Sin embargo, el aumento de la cantidad de IgE específica al alimento en suero, y también en mastocitos y basófilos, está asociado con una mayor sensibilización del individuo, y por lo tanto, con un mayor riesgo de generar manifestaciones clínicas luego de una exposición al alérgeno.

Así como se ha determinado en numerosas reacciones alérgicas que existe un componente hereditario, en las alergias alimentarias existe una asociación genética. Por ejemplo, la alergia al maní es 10 veces más probable en niños con hermanos alérgicos comparado con el riesgo de la población en general (Wang and Sampson, 2011). Dado que se trata de una enfermedad multifactorial los distintos polimorfismos descritos en distintos cromosomas sólo pueden asociarse a una susceptibilidad individual. Para que estos alelos se manifiesten es necesaria la participación de factores desencadenantes. Luego de muchas décadas de estudios se ha llegado a la conclusión que estos factores son ambientales. Estudios recientes identifican las potenciales **influencias del medio ambiente** sobre el sistema inmune para favorecer la instauración de las reacciones alérgicas. Además de la “hipótesis de la higiene “como se mencionó anteriormente, también se observó que favorecen el desarrollo de alergias el aumento en el consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 y la disminución de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, la dieta reducida en antioxidantes, y el exceso o deficiencia de vitamina D (Sicherer and Sampson, 2009).

Las **características de las proteínas desencadenantes o alergen**os también afectan la expresión de la enfermedad. Proteínas que son fácilmente degradadas por el calor y la digestión (variaciones en el pH o degradación enzimática en el tracto gastrointestinal), no son capaces de desencadenar reacciones severas. Por el contrario, proteínas resistentes, como las proteínas de reserva en semillas, son más proclives a desencadenar reacciones alérgicas (Steckelbroeck et al., 2008). Los carbohidratos asociados a proteínas también pueden influir en la alergenidad. Por ejemplo, las modificaciones que sufren los glicanos al ser tostadas las proteínas del maní aumentan su estabilidad y la alergenidad (Wang and Sampson, 2011). Además, la presencia de epitopes IgE específicos lineales o conformacionales parecen distinguir entre los fenotipos de alergias alimentarias. Varios estudios muestran que la unión de anticuerpos IgE predominantemente con epitopes discontinuos o conformacionales (aminoácidos lejanos en la secuencia de la proteína, pero próximos en la proteína plegada) está asociada con alergias transitorias a leche de vaca o huevo. En cambio cuando la IgE se une principalmente epitopes lineales, secuenciales o continuos (aminoácidos consecutivos en la secuencia de una proteína) las alergias son persistentes (Wang and Sampson, 2011). Pero además se ha demostrado que entre los alergen

os (principalmente los vegetales) existe una relación estructural. Esto ha posibilitado agrupar los alergen

os en familia por su similitud de estructura primaria y conformación. Es así que podemos hablar de los alergen

os pertenecientes a las cupinas, prolaminas, profilinas, etc por citar los ejemplos más importantes (Jenkins et al., 2005). Sin embargo, aplicando técnicas de proteómica se ha demostrado que la mayoría de los alergen

os principales de diferentes sistemas muestran una reactividad cruzada con antígenos de microorganismos, principalmente helmintos, la cual se basa en una relación estructural entre sus antígenos: tropomiosinas de dermatofagoides y cucarachas con *Ascaris* y filarias *Wuchereria*; la quitina de pared de hongos, parásitos e insectos y antígenos de dermatofagoides; las lipocalinas (aeroalergen

os en epitelio de roedores, perros, caballos y cucarachas) con antígenos de *Schistosoma*. Pero lo más sorprendente de este análisis surgió de la relación funcional entre estos antígenos procarióticos y los alergen

os: numerosos inmunógenos helmínticos son proteasas que le permiten al parásito invadir, migrar y alimentarse del huésped, y además tienen capacidad de inducir IgE (*Fasciola hepática* inhibe la producción de IL-12). Del mismo modo se ha demostrado la actividad proteásica en diversos alergen

os y se ha asociado esta función a su capacidad de penetrar las mucosas y contactar las

células del sistema inmune para activar el inflammasoma (Der p1 de *Dermatofagoides pteronissimus*) (Fitzsimmons and Dunne, 2009). Trabajos posteriores han demostrado que la mayor similitud se da con protozoarios, luego hongos y en menor medida bacterias (Santiago et al., 2012, 2011). Estos hallazgos no hacen más que confirmar aspectos evolutivos del sistema inmune y su regulación por antígenos presentes en el medio ambiente. Actualmente se han logrado importantes avances en el conocimiento de la regulación endógena (sistema endócrino y nervioso) y exógena (antígenos presentes en el universo de los procariotas) del sistema inmune. Se ha postulado que los mecanismos IgE-dependientes (inmunidad innata y adaptativa) se han generado en el proceso evolutivo por la presencia en el medio ambiente de antígenos, principalmente de parásitos que se alojan en cavidades huecas (helmintos). La persistencia de estos macroparásitos ha determinado que los mecanismos mediados por la IgE persistan hoy en día, pero debido a alteraciones en la regulación del sistema inmune estos mecanismos se activan frente a antígenos inocuos o alérgenos que no guardan relación con los parásitos. Por esta razón las reacciones alérgicas corresponden a reacciones de hipersensibilidad. Estos antígenos alérgicos, que no son procarióticos, inducen mecanismos de tolerancia en individuos normales o no atópicos o no alérgicos, mientras que en individuos susceptibles inducen las reacciones alérgicas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente existe una relación estructural y funcional entre alérgenos y antígenos procarióticos.

1.2. La inflamación alérgica

Los alérgenos alimentarios, aeroalérgenos, drogas y venenos de insectos son los principales alérgenos responsables de la inducción de las reacciones de hipersensibilidad inmediata después de la sensibilización inicial (**figura 3**). Las reacciones alérgicas a las proteínas de la dieta se deben a una respuesta inmune que resulta en la producción de IgE específica con polarización de células T helper tipo 2 (Th2) en la mucosa gastrointestinal (**fase sensibilización**). La unión de IgE al FcεR1, el receptor de alta afinidad en mastocitos, seguido del entrecruzamiento de al menos dos complejos IgE-FcεR1 provoca la activación y degranulación celular (**fase efectora**). Este proceso implica la liberación inmediata de sustancias preformadas en los gránulos citoplasmáticos, como la histamina, y la inducción de la síntesis de sustancias pro-inflamatorias, tales como leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas, quimoquinas y factores de crecimiento. Sin embargo los gránulos de mastocitos, basófilos y

eosinófilos contienen numerosas enzimas, citoquinas y quimoquinas. Por lo tanto, la rápida liberación de sustancias con actividad farmacológica pro-inflamatoria genera un foco inflamatorio inmediato, mientras que la inducción de la síntesis de otras sustancias pro-inflamatorias perpetúa el proceso inflamatorio en el tiempo. Estos eventos determinan que exista una reacción inflamatoria inmediata y otra tardía en el órgano o tejido donde el alérgeno activa estas células.

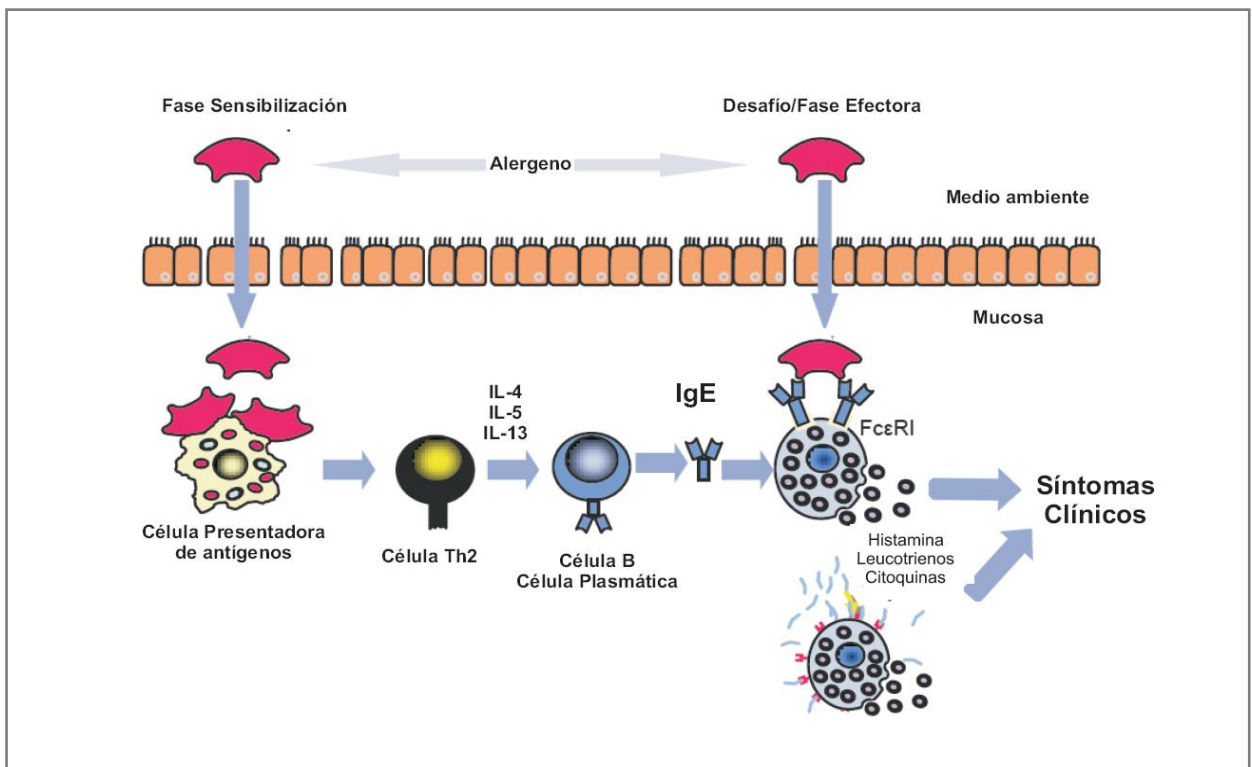


Figura 3. Esquema general de la fase de sensibilización y fase efectora en la respuesta inmunológica a alérgenos alimentarios. Durante la sensibilización, los alérgenos atraviesan la barrera mucosal y son muestreados por las CPA y presentadas a través del complejo mayor de histocompatibilidad MHC II a las células T naive que se diferencian en células Th2. Las citoquinas producidas por las células Th2 inducen el cambio de isotipo en las células B, dando como resultado la producción de anticuerpos IgE que se unen al receptor FcεRI en mastocitos. Tras un segundo encuentro con el mismo alérgeno unido a la célula IgE, el entrecruzamiento conduce a la degranulación y la liberación de mediadores (histamina) que causan la sintomatología clínica.

Si el entrecruzamiento por el alérgeno ocurre en los basófilos en circulación el proceso inflamatorio se denomina anafilaxia. Cuando este proceso de activación celular se produce en formas repetitiva y sobre un órgano blanco, es posible que se produzca un infiltrado celular cuyas características dependerán del tejido y tipo de células que se hayan activado. Si persiste

la activación celular (inclusive de las células atraídas) se produce el remodelamiento tisular con la posible pérdida de la función del órgano. Esto ocurre por ejemplo en la insuficiencia respiratoria en el asma debida a la acumulación y activación de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En general para llegar a un cuadro de este tipo se requieren años de propagación del foco inflamatorio y sus características, como así también su respuesta al tratamiento dependerá del tipo de proceso inflamatorio instaurado. En estos casos estamos ante una inflamación crónica.

1.3. Mecanismos de alergia y tolerancia

La tolerancia inmune se define como la falta de respuesta de la inmunidad adaptativa a un antígeno y puede estar mediado por distintos mecanismos tales como delección, inactivación o modulación de LT específicos del antígeno e inducción de LT con actividad regulatoria (Treg). Estos mecanismos son la base de la no respuesta hacia antígenos propios, cuya disrupción lleva a la autoinmunidad. Sin embargo, el sistema inmune tiene la capacidad de diferenciar antígenos no propios patogénicos (microorganismos patogénicos) de los no propios inocuos, tales como los antígenos procarióticos de la microbiota y los de la dieta o del medio ambiente (alergenos). Por lo tanto existe un solapamiento de los mecanismos inmunológicos en el reconocimiento de los antígenos no propios, lo cual indica que los mecanismos de regulación de la activación inmunológica son muy precisos. En particular la tolerancia oral es el proceso por el cual el sistema inmune no reacciona frente a antígenos que ingresan por la vía oral, que inducirían la activación inmunológica si ingresaran por otra vía (subcutánea por ejemplo). Este mecanismo prevalece en la mucosa gastrointestinal, y también en la bronquial, y da origen no sólo a la tolerancia local, sino también a la tolerancia sistémica. En el intestino es un proceso clave y complejo dado que permite mantener lo que se denomina homeostasis intestinal, que permite que el tejido cumpla con sus funciones específicas (intercambio de nutrientes), aún en un medio donde la carga antigénica es altísima, y la inflamación sería la situación permanente si no existiera la tolerancia. En otras palabras, el gran desafío antigénico (microorganismos que componen la microbiota, antígenos del medio ambiente y antígenos dietarios) al que está sometida la mucosa gastrointestinal sería determinante para activar al sistema inmune y generar un foco inflamatorio persistente (inflamación crónica). Estos antígenos son en su totalidad antigénicos y algunos inclusive son portadores de potentes componentes con

actividad adyuvante (agonistas de TLR presentes en microorganismos). Por lo tanto, si no fuera por la compleja red de células y moléculas que montan los mecanismos de tolerancia el tracto gastrointestinal no podría controlar la inflamación y cumplir con sus funciones específicas. De esta manera, el sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT) en un individuo normal desarrolla mecanismos de tolerancia frente a aquellos antígenos que desea conservar, y al mismo tiempo tiene la capacidad de montar rápidos y efectivos mecanismos inmunológicos para controlar a los patógenos. En los individuos con alergia alimentaria este delicado equilibrio se encuentra alterado, se observa un desbalance en la microbiota, y una activación aberrante del sistema frente a determinados antígenos dietarios (Chehade and Mayer, 2005; Peron et al., 2009). Las causas que dan origen a estos cambios no se conocen en su totalidad. Se ha demostrado en modelos animales y en patologías originadas por mutaciones en humanos (IPEX o síndrome de enteropatía, poliendocrinopatía e inmunodesregulación ligado al X, y APECED o distrofia ectodérmica con candidiasis y poliendocrinopatía, donde están mutados AIRE y Foxp3 respectivamente) que alteraciones a nivel de la regulación en la generación de los Treg da origen a enfermedades autoinmunes (algunas severas) con manifestaciones alérgicas.

Se ha demostrado que la activación de la inmunidad adaptativa frente a un antígeno en ausencia de la activación de la inmunidad innata (ausencia de PAMPS o patrones moleculares asociados a patógenos, o DAMPS o patrones moleculares asociados a daño) da origen a la generación de células con actividad regulatoria (Treg inducibles). Esta es la respuesta fisiológica de la inmunidad adaptativa frente a un alérgeno. Sin embargo, en los alérgicos existe una activación inmunológica que da origen a los Th2 específicos, en lugar de los Treg específicos. Las células encargadas de presentar los antígenos a los LT (células presentadoras de antígenos o CPA) y el sitio anatómico donde esto se produce son claves para determinar la naturaleza de la respuesta.

El GALT está constituido por una amplia variedad de células inmunes innatas y adaptativas, como las células dendríticas, macrófagos, linfocitos intraepiteliales, LT efectoras, LT reguladores y LB. Estas células se agrupan en estructuras en los sitios inductivos de las placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y folículos linfoides que se encuentran dispersos a lo largo de la lámina propia (LP), la cual comporta como un compartimiento

efector. Epitopes intactos derivados de los alimentos que escaparon a la degradación gastrointestinal pueden ser capturados en el intestino a través de células M que recubren las placas de Peyer y folículos linfoides, o pueden ser absorbidos directamente en la LP a través de las células dendríticas que tienen capacidad de muestrear los antígenos del lumen intestinal extendiendo sus dendritas a través de la mucosa y así llegar a la luz intestinal. El tráfico posterior de las células dendríticas a los MLN es absolutamente necesario para la inducción de tolerancia hacia los antígenos alimentarios, aunque las respuestas regulatorias inducidas en las placas de Peyer también contribuyen a la tolerancia oral (Wang and Sampson, 2011). Como mencionamos anteriormente es muy importante el tejido donde se produce la presentación antigénica. Cuando esto ocurre en el tracto gastrointestinal bajo condiciones homeostáticas se genera una respuesta activa regulatoria llamada **tolerancia oral**. Este proceso es mediado principalmente por los Treg inducidos localmente por la influencia de factores específicos del tejido. Esto es lo que determina que el sitio de ingreso de un antígeno sea crítico para la inducción de tolerancia, lo cual va a ser el resultado de una compleja interacción entre distinto tipo de células (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, LT, LB y células del estroma). Varias subpoblaciones de LT se han caracterizado con capacidad regulatoria y que se generan en la mucosa gastrointestinal: células Th3 (LT CD4+ que secretan TGF- β), células Tr1 (LT CD4+ secretorios de IL-10), células Treg CD4+ CD25+ Foxp3, células T supresoras CD8+ y células T $\gamma\delta$. Cuando estas células, principalmente las Treg CD4+ CD25+ se transfieren a un animal naive no es posible inducir IgE o reacciones de hipersensibilidad, o inclusive en modelos de asma o alergia alimentaria la administración de antígenos por vía oral induce Treg y previenen la secreción de IgE y la inducción de síntomas (Russo et al., 2001; Smaldini et al., 2012; Tunis et al., 2012).

Previamente se ha caracterizado la inducción selectiva de los Treg en respuesta a los antígenos que ingresan por la vía oral. Este proceso está mediado por dos subpoblaciones especiales de células dendríticas: una que expresa CX3CR1, y están encargadas de muestrear antígenos del lumen intestinal en lámina propia y Placas de Peyer, y otra subpoblación de células dendríticas migratorias que expresan CD103, que presentan los antígenos a los LT bajo condiciones homeostáticas muy particulares (factores específicos producidos por el estroma, principalmente TGF- β y ácido araquidónico) en los ganglios mesentéricos. Por lo tanto, la

forma de muestreo antigénico y de presentación antigénica son factores críticos en el desarrollo de la tolerancia inmune (Bogunovic et al., 2009; Schulz et al., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que no sólo las células dendríticas intestinales participan en la inducción de Treg, sino que también pueden inducirse en otras mucosas y bajo el efecto de factores tisulares similares. Células dendríticas de la piel y del pulmón participan en la inducción de Treg Foxp3+ (Gomez de Agüero et al., 2012; Lambrecht and Hammad, 2012).

En diferentes enfermedades alérgicas se ha demostrado que existen factores tisulares del órgano blanco afectado que se encuentran alterados, y que podrían estar relacionados con fallas a nivel de tolerancia que originan un funcionamiento anómalo de los mecanismos inmunes. Dado que en individuos alérgicos existe una hiper-producción de IgE y se han detectado LT específicos del alérgeno alimentario, se postula que podrían ser fallas a nivel de regulación de los LT las responsables de la respuesta inmune aberrante. El factor más ampliamente descrito asociado a fallas a nivel de tolerancia en diferentes mucosas en alérgicos es TSLP (linfopoyetina asociada al estroma tímico). Esta quimoquina, inicialmente involucrada en el desarrollo tímico y en tolerancia central, actualmente ha sido descrita como un factor soluble que interviene en los mecanismos de tolerancia periférica, en particular en intestino. En pacientes con asma, dermatitis atópica y alergia alimentaria se ha hallado que se encuentra excesivamente expresada y secretada por células epiteliales de bronquios, piel e intestino, respectivamente (Comeau and Ziegler, 2010; Han et al., 2008; Ziegler, 2012). Sin embargo, es muy difícil estudiar en forma directa la respuesta celular asociada a mecanismos regulatorios en pacientes con alergia alimentaria y evidenciar efectos a nivel de Treg. Ha sido posible detectar en sangre periférica LT específicos de antígenos dietarios, a partir de los cuales pueden obtenerse líneas celulares y clones T específicos secretores de IL-4 e IL-13, y cantidades variables de IFN- γ . Ha resultado muy difícil aislar LT específicos de antígenos de la dieta de individuos no alérgicos, y en todos los casos son LT de fenotipos Th0 o Th1 (Campbell et al., 1998; Eigenmann et al., 1996; Flinterman et al., 2010; Schade et al., 2000; Schulten et al., 2009; Tordesillas et al., 2009). Se ha evidenciado en la mucosa gastrointestinal niveles elevados de mRNA de IL-5 (Vandezande et al., 1999) y LT Th2 específicos de proteínas de leche de vaca (Beyer et al., 2002). Pero al momento de estudiar Treg se encontró que LT periféricos de individuos no alérgicos no son capaces de secretar IL-10/TGF- β , mientras que

LT de lámina propia secretan IL-10/TGF- β . Por el contrario, en pacientes alérgicos sólo es posible detectar LT productores de citoquinas inmunosupresoras sólo cuando han desarrollado tolerancia y superado la alergia alimentaria (Shreffler et al., 2009). Existen muy pocos trabajos que demuestran deficiencias a nivel de Treg, tanto en la producción de citoquinas (Krogulska et al., 2011), como en la respuesta quimioattractante (Nguyen et al., 2009). Pero esto se debe a las dificultades para caracterizar y aislar Treg, dado que el principal marcador de los Treg es Foxp3, mientras que los marcadores de membranas son compartidos con otras subpoblaciones celulares.

En conjunto, estos resultados experimentales permiten inferir que en los individuos alérgicos existen fallas en los mecanismos inmunoregulatorios subyacentes en las mucosas, y constituyen la base experimental para sostener que la re-instauración de estos mecanismos pueden re-direccionar la inmunidad adaptativa, y corregir el defecto inmunológico en estos pacientes. Las actuales inmunoterapias se basan en la expansión *in vivo* de los Treg, o en la inducción de Treg inducibles, mediante la administración mucosal de antígenos dietarios en forma controlada. Se están realizando esfuerzos para lograr una mejor caracterización de los Treg (Hoffmann et al., 2009), y de esta manera poder aislarlos y procesarlos *ex vivo* (expansión clonal) de manera de poder desarrollar terapias celulares para restaurar la tolerancia inmune. Esto ha sido posible en modelos animales y demuestra que la hipótesis planteada puede ser un sólido argumento para enfocar los estudios al desarrollo de este tipo de terapias en el futuro. Se ha demostrado que ratones alérgicos presentan niveles reducidos de TGF- β y Foxp3 (Ganeshan et al., 2009) y que el bloqueo de CTLA-4 (proteína inhibitoria de los Treg) incrementa la sensibilización y los síntomas alérgicos frente al desafío antigénico (Van Wijk et al., 2005). Además, la delección de células que expresan Foxp3 en ratones origina una inflamación intestinal, que puede ser revertida por transferencia adoptiva de Treg Foxp3+ (Boehm et al., 2012).

Por lo tanto es importante investigar si todas las formas de alergias alimentarias están asociadas a defectos en los Treg, lo cual podría tener importantes implicancias en la respuesta a las inmunoterapias.

2. ALERGENOS ALIMENTARIOS

2.1. Proteínas alergénicas

Los alergenios son inmunógenos que desencadenan las reacciones alérgicas. Pueden ser proteínas o glicoproteínas, y a priori cualquier inmunógeno, se puede comportar como un alergenio, dependerá de la susceptibilidad individual. La nomenclatura de los alergenios fue establecida por el subcomité de nomenclatura de alergenios de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (<http://www.allergen.org>). Son designados de acuerdo al nombre taxonómico de sus fuentes de la siguiente manera: las primeras tres letras del género, espacio, la primera letra de la especie, espacio, y un número. Ejemplos: Der p 1 para el antígeno mayor de *Dermatofagoides pteronissimus*. Esto fue posible a partir de la clonación y secuenciación de los principales alergenios conocidos, lo cual permitió un mejor conocimiento de las fuentes, funciones y característica de los mismos.

Los principales alergenios alimentarios, responsables del 80% de las reacciones alérgicas han sido agrupados en el denominado grupo de los “grandes 8” y son: leche, huevo, maní, frutas secas, pescados, mariscos, soja y trigo y los derivados de cada uno. Sin embargo este listado se ha ido modificando dependiendo de las regiones, de forma tal que por ejemplo Europa ha incorporado en los últimos años las semillas de mostaza. De esta manera del amplio espectro de alergenios alimentarios que pueden existir en la naturaleza, éstos resultan ser los más relevantes, principalmente por factores asociados a la edad de exposición y los hábitos dietarios. La mayoría de los alergenios alimentarios provenientes de animales pueden ser clasificados en tres grupos de proteínas, mientras que los vegetales pueden ser agrupados en cinco superfamilias (**tabla 2**).

Esta agrupación de los alergenios en familias ha sido posible a partir de los estudios de conformación estructural e identificación de funciones biológicas, de manera que la clasificación comúnmente empleada de los alergenios en función de la vía de ingreso al organismo y hábitos de exposición (alergenios alimentarios, inhalantes, inyectables, domiciliarios, estacionales, etc) está siendo desplazada con el tiempo por esta nueva clasificación. Esto permite diagnóstico más preciso, realizar un mejor pronóstico (por ejemplo

en base a reactividades cruzadas) y plantear inmunoterapias dirigidas a grupos de alérgenos, lo cual permitirá controlar un rango más amplio de reacciones alérgicas.

Tabla 2. Principales alérgenos alimentarios

Familia de alérgeno alimentario	Fuente	Ejemplo de alérgenos
Familias de proteínas alimentarias de animales		
Proteínas de la leche	Leches de mamíferos	α S1, α S2, β , κ -caseínas (Bos d 8); β -lactoglobulina (Bos d 5), α -lactoalbúmina (Bos d 4) de vaca
Paralbúmina	Pescados	Car p paralbúmina de carpa común; Gad c 1 de bacalao
Tropomiosina	Moluscos y crustáceos	Pen a 1 de camarón
Familias de proteínas alimentarias de plantas		
Superfamilia de Bet v1	Frutas, vegetales, soja	Gly m 4 de soja; Mal d 1 de manzana; Pru av 1 de cereza Bet v 1
Superfamilia de Cupinas		
Globulinas 7S	Maní, frutas secas, legumbres, semillas	Ara h 1 de maní; Gly m 5 (β -conglucina) de soja
Globulinas 11S	Maní, frutas secas, legumbres	Ara h 3 de maní; Gly m 6 (glicina) de soja
Superfamilia de Prolamina		
Prolaminas	Cereales	α - y γ -gliadinas de trigo
nsLTPs	Frutas y vegetales	Pru p 3 de durazno; Mal d 3 de manzana
Inhibidores de α -amilasa/tripsina	Cebada y arroz	Gly m TI de soja; Hor v 1 de cebada
2S Albumina	Maní, frutas secas, semillas	Ara h 2 de maní; Ber e 1 de nuez del Brasil
Superfamilia de Profilinas	Frutas, vegetales, legumbres	Ara h 5 de maní; Api g 4 de apio; Hev b 1 de látex
Proteínas del sistema de defensa		
PRs, proteasas, inhibidores de proteasas	Frutas	Mal d 2 de manzana; Pru av 2 de cereza

Nota: nsLTPs–transferencia no específica de lípidos; PRs–Patogénesis–Related proteins o proteínas de defensa.

Por ejemplo: síndrome de alergia oral originado por alérgenos del polen del abedul (Bet v 1) que ingresan por vías aéreas y presentan una reactividad cruzada con alérgenos de frutas, manzana (Mal d 1), que ingresa por el tracto digestivo. Inmunoterapias utilizando extractos

conteniendo Bet v 1 podrían ser usadas para el tratamiento de la alergia al abedul y al mismo tiempo a la manzana en aquellos pacientes que tengan el síndrome de la alergia oral (principalmente en el norte de Europa). En la **figura 4** se muestran las estructuras representativas de proteínas pertenecientes a las principales familias de alergenitos alimentarios animales y vegetales.

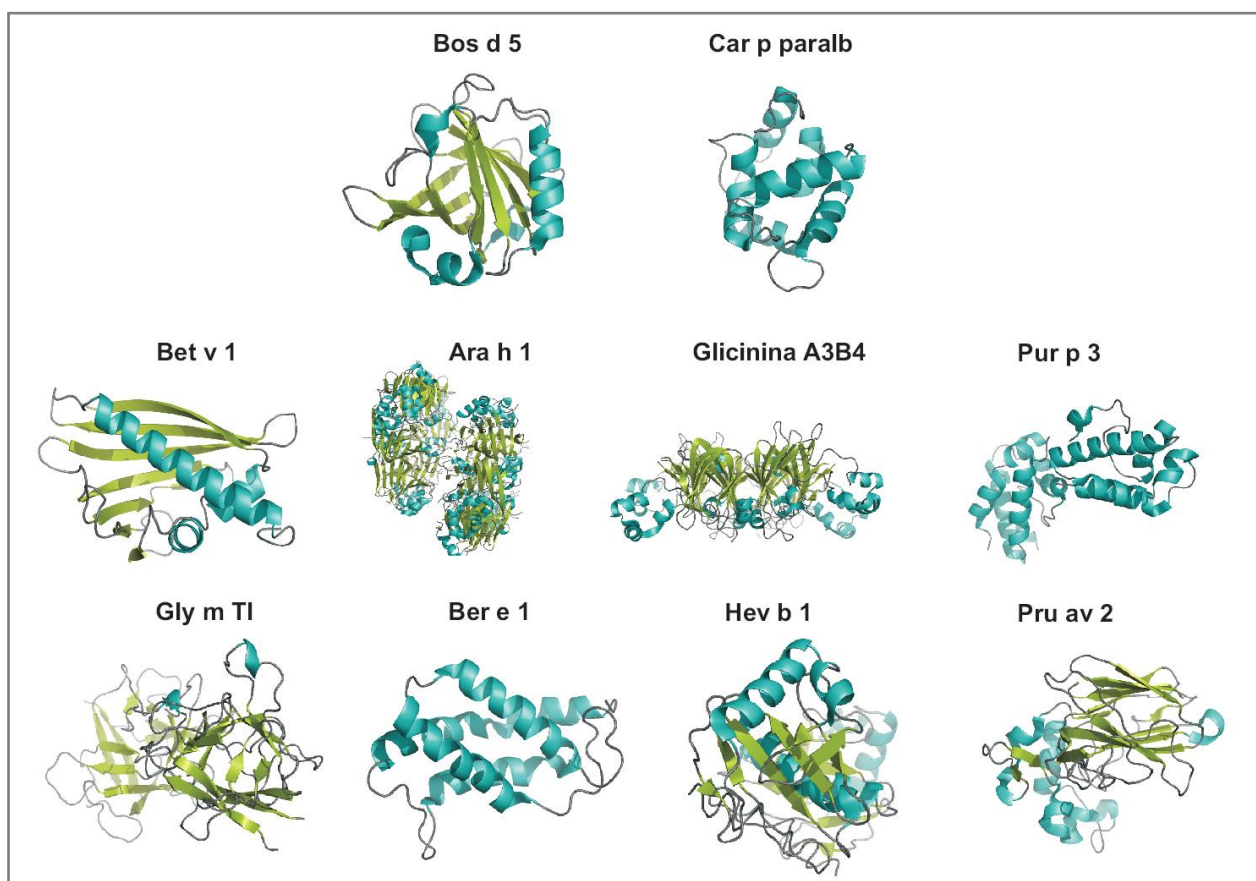


Figura 4. Estructuras 3D de las proteínas pertenecientes a las diferentes superfamilias de alergenitos alimentarios. Ejemplos de las estructuras de los principales alergenitos animales: *Bos d 5* (β -lactoglobulina) de la leche de vaca y *Car p paralb* (*Car p paralbumina*) de la carpa común. Ejemplos de las estructuras de los principales alergenitos de plantas: *Bet v 1* del polen (de reactividad cruzada), *Ara h 1* del maní, glicinina A3B4 de soja, *Pur p 3* del durazno, *Gly m TI* de soja, *Ber e 1* de la nuez brasilera, *Hev b 1* de del látex (de reactividad cruzada) y *Pru av 2* de la cereza.

2.2. Alergenitos de la leche de vaca

Las reacciones agudas originadas por la exposición a la leche pueden ser causadas por varias proteínas presentes en la leche de vaca. Las caseínas y las proteínas del suero constituyen

aproximadamente entre un 80% y un 20% del total de las proteínas de la leche, respectivamente (**tabla 3**) (Wal, 2004).

Las caseínas constituyen los principales alérgenos de la leche, e incluyen α 1, α 2, β y κ -caseínas (todas bajo la nomenclatura de alérgenos **Bos d 8**) que comprenden el 32%, 10%, 28% y 10% respectivamente del total de las proteínas. Del suero de la leche los alérgenos principales son la α -lactoalbúmina (**Bos d 4**) y β -lactoglobulina (β -Lg, **Bos d 5**) comprenden el 5% y el 10% de las proteínas de la leche, respectivamente (Docena et al., 1996; Natale et al., 2004; Wal, 2004).

Estas proteínas han sido ampliamente descritas como alérgenos y se han identificado numerosos epitopes lineales IgE en sus secuencias empleando péptidos sintéticos y sueros de pacientes alérgicos (Busse et al., 2002; Cerecedo et al., 2008; Chatchatee et al., 2001a, 2001b; Cocco et al., 2003, 2007; Han et al., 2008; Järvinen et al., 2001). Es importante resaltar que en las caseínas, principalmente la α 1-caseína, se han identificados epitopes IgE a lo largo de toda la proteína, lo que determina su elevada alergenidad. También fueron identificados otros alérgenos menores de la leche los que incluyen a la seroalbúmina bovina (BSA, **Bos d 6**), lactoferrina e inmunoglobulinas (**Bos d 7**), pero es muy infrecuente encontrar pacientes alérgicos a las mismas. En la **tabla 3** se listan las principales proteínas alérgicas que componen la leche de vaca.

Tabla 3. Principales proteínas alérgicas que componen la leche de vaca.

	Proteínas	Nomenclatura IUIS	Peso Molecular kDa
Caseínas	80% - Proporción en la leche de vaca		
	α 1-caseína	Bos d 8	23,6-25,2
	α 2-caseína		23,6-25,2
	β -caseína		24
	κ -caseína		19
Suero	20% - Proporción en la leche de vaca		
	α -lactoalbúmina	Bos d 4	14,1
	β -lactoglobulina (β -Lg)	Bos d 5	18
	seroalbumina bovina (BSA)	Bos d 6	69

Se han realizado marcados esfuerzos para tratar de disminuir la alergenicidad de estas proteínas y se determinó que la cocción y los diferentes procesamientos de la leche (fermentación de yogures) disminuyen la alergenicidad de las proteínas del suero. Esto permitiría explicar porque algunos pacientes alérgicos a las proteínas de la leche toleran los hidrolizados de leche vacuna (fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de suero) y los yogures (Ehn et al., 2004; Nowak-Węgrzyn et al., 2008).

2.3. Alergenos de la soja

Se ha observado que alrededor de 28 proteínas de soja son reconocidas por IgE de pacientes alérgicos a soja (Awazuhara et al., 1997; Shibasaki et al., 1980). Sin embargo sólo unas pocas de estas proteínas han sido reconocidas como alergenos y existen controversias sobre cuál es el alergeno principal de la soja, dado que distintos trabajos identifican a distintas proteínas (un alergeno principal o mayor es aquel que es reconocido por más del 50% de la población testeada) (Cinader, 1984). Oficialmente son aceptadas como alergenos de la soja por el Comité de Alergenos de la IUIS las siguientes proteínas: **Gly m Bd 30K** (proteasa cisteínica) (Helm et al., 1998, 2000a; Herman, 2005; Herman et al., 2003; Ogawa et al., 1991, 1993), **Gly m 3** (una profilina) (Rihs et al., 1999) y **Gly m 4** (una proteína PR-10) (Berkner et al., 2009; Kleine-Tebbe et al., 2002) como alergenos relacionados al síndrome de alergia oral; **Gly m 1** y **Gly m 2**, proteínas hidrofóbicas de la cáscara (Codina et al., 1997, 2000, 2002; González et al., 1995).

Otras proteínas de soja fueron también caracterizadas como alergenos, incluyendo las proteínas de reserva **Gly m 5** (β -conglucina) y **Gly m 6** (glicina) (Beardslee et al., 2000; Helm et al., 2000b; Ogawa et al., 1995), el inhibidor de tripsina (**Gly m TI**) y la albúmina de soja 2S (**Gly m 2S**) (Burks et al., 1994a; Gu et al., 2001; Moroz and Yang, 1980). Las dos principales proteínas de almacenamiento de la soja, β -conglucina y la glicina, son las globulinas 7S y 11S, y representan alrededor del 30% y 40% del total de las proteínas de la semilla, respectivamente. La sensibilización a ambos alergenos muestra ser un potencial indicador de reacción alérgica severa a la soja (Holzhauser et al., 2009). Los aeroalergenos identificados en soja son proteínas hidrofóbicas que se encuentran en la cáscara, entre las cuales las más importantes son la Gly m 1 y Gly m 2. Los perfiles de reactividad IgE para estos alergenos, y la patología que provocan, son diferentes al comparar la ingestión con la inhalación de los mismos (Codina et al., 1997, 2000, 2002; González et al., 1995) lo cual indica que la vía de

ingreso y las características del alérgeno son importantes en la instauración de las reacciones alérgicas. En la **tabla 4** se enumeran las principales proteínas alérgicas de soja.

Tabla 4. Principales proteínas alérgicas que componen la semilla de soja.

Proteínas de la semilla de soja		Alergenos	Peso Molecular kDa
Proteínas de la cáscara	Aeroalergenos Vinculadas a alergias respiratorias	Gly m 1.0101	7,5
		Gly m 1.0102	7
		Gly m 2	8
		Gly m 50kD	50
Proteasas y Proteínas de defensa	Alergenos alimentarios Vinculadas a alergias alimentarias y al síndrome de alergia oral	Gly m Bd 30K/P34 (proteasa cisteínica)	34
		Gly m 3 (profilina)	14
		Gly m 4 (PR-10)	16,6
		Gly m CPI (inhibidor de proteasas cisteínicas)	10
		Gly m TI (inhibidor de tripsina de Kunitz)	21
Proteínas de reserva	Alergenos alimentarios Globulinas 7S Vicilinas (30 % del total de la semilla)	Gly m 5/ β -conglucina:	140-170
		Gly m 5.0101 sub α	
		Gly m 5.0201 sub α'	
		Gly m 5.0301 sub β	
		Gly m Bd 28K/P28	26
	Alergenos alimentarios Globulinas 11S Leguminas (40 % del total de la semilla)	Gly m 6/glicina:	320-360
		Gly m 6.0101 sub G1	
		Gly m 6.0201 sub G2	
		Gly m 6.0301 sub G3	
		Gly m 6.0401 sub G4	
Gly m 6.0501 sub G5			
Otras	Lectinas (alérgeno alimentario)	Gly m aglutinina	12
	Albúmina 2S (alérgeno alimentario)	Gly m 2S albúmina	120
	Asociadas a lecitinas de soja (alérgeno alimentario)	Gly m 39kD	39
	Asociada a la fracción 7S (aeroalérgeno)	Lipoxigenasa	102

La alergia a la soja también se puede desarrollar secundariamente a la sensibilización inicial a otro alérgeno, como resultado de la reactividad cruzada. Un análisis retrospectivo en Alemania de IgE específica para aeroalérgenos y alérgenos alimentarios en 273 niños reveló que la sensibilización IgE a la soja en la infancia primaria (generada por la ingestión de alimentos) es poco común, es más frecuente la sensibilización IgE en la edad escolar, y es a causa de la sensibilización primaria a través de la inhalación de polen (Matricardi et al., 2008).

3. PREVALENCIA

3.1. Epidemiología de la hipersensibilidad a los alimentos

En las últimas décadas, los fenómenos alérgicos han aumentado en todo el mundo, incluyendo los cuadros provocados por alimentos y aditivos, de manera que en ciertas regiones, y para ciertos alérgenos, se puede hablar de epidemia. Las alergias en general son las inmunopatologías que con mayor prevalencia se presentan en el mundo. En las últimas décadas se ha observado un incremento muy marcado de las mismas (se duplican por cada década que transcurre) y en determinadas regiones afectan al 10–30% de la población, lo cual significa que afecta a cientos de millones de individuos (Fraser, 2011). Las alergias alimentarias, también han sufrido un fuerte incremento en su incidencia en las últimas décadas y constituyen un problema sanitario preocupante en muchos países, incluyendo el nuestro. Son altamente prevalentes en los primeros años de vida, y se cree que esto se debe a la alta exposición a ciertos alérgenos junto a la inmadurez del sistema inmune. En adultos las prevalencias son menores, sin embargo para ciertos alérgenos su persistencia parece ser más frecuente que lo que se pensaba (soja, maní, pescados, frutos secos, etc) con el agravante que pueden originar reacciones sistémicas graves (anafilaxia). Las alergias alimentarias afectan a más del 6% de los niños, y a un 3–4% de adultos, en los países industrializados o con hábitos de vida occidental. Un estudio reciente realizado en EE.UU. empleando varias bases de datos nacionales de salud y encuestas concluyó que el 3,9% de los niños estadounidenses padecen alergia alimentaria, con un aumento del 18% en la prevalencia entre los años 1997 y 2007. Un meta-análisis que se centró en alergias a la leche, huevo de gallina, maní y mariscos determinó

que la prevalencia de alergias a los alimentos es de aproximadamente 3,5% (Wang and Sampson, 2011).

Las alergias alimentarias incluyen un abanico de síndromes originados por mecanismos mediados por IgE y no mediados por IgE (Ferreira and Seidman, 2007; Sicherer and Sampson, 2010). Las mediadas por IgE son las responsables de inducir la anafilaxia y suelen ser las más frecuentes, lo cual puede deberse a que son más fáciles de evidenciar experimentalmente.

La evidencia acumulada en la última década sugiere que la alergia alimentaria, lejos de ser autolimitada y de corta duración (se resuelve espontáneamente dentro de los primeros 3–5 años de vida por la inducción de los mecanismos de tolerancia oral), puede tener una evolución más lenta y en algunos casos, como ya se mencionó, perdurar con la edad. Estudios realizados por Savage y colaboradores (Savage et al., 2007), y por Skripak y colaboradores (Skripak et al., 2007), demostraron que a los 4 años de edad sólo el 11% de las alergias al huevo, y el 19% de las alergias a la leche de vaca que cursan con IgE altas, se habían resuelto a edades tempranas, y que el 80% había desaparecido recién a los 16 años de edad.

Los niños atópicos tienden a tener una mayor susceptibilidad a alergias alimentarias; alrededor del 35% de los niños con dermatitis atópica moderada a severa sufren alergias alimentarias IgE–mediadas, y entre el 6–8% de los niños asmáticos tienen sibilancia (vías respiratorias congestionadas) inducida por alimentos (Sampson, 2004).

Estudios recientes en el Reino Unido y en los Estados Unidos indican que durante los últimos diez años se ha duplicado la prevalencia de la alergia al maní en los niños jóvenes. Algunos autores han intentado explicar este aumento de las alergias por los cambios de las dietas y el uso de antiácidos que elimina el procesamiento proteico estomacal y por lo tanto determina que mayor cantidad de alergenos lleguen en forma intacta al intestino para ser absorbidos. Son interesantes también los datos que sugieren que el retraso de la introducción de ciertos alimentos puede ser más perjudicial que beneficioso, aunque este tema es muy debatible. Un estudio de niños judíos de 8–14 meses que habitaban en Israel o en Inglaterra, mostró que la alergia al maní era 0,2% en los primeros y 10 veces mayor en los segundos, mientras que el consumo de maní era de 7,1kg en Israel en comparación a los niños ingleses que no consumen maní en esas edades (Du Toit et al., 2008). Por lo tanto, no está absolutamente establecido

cuáles son los factores que determinan los incrementos observados en los últimos tiempos, ni como impacta la edad en la sensibilización alérgica.

3.2. Prevalencia de las alergias de leche de vaca y a soja

La prevalencia de la alergia a la leche de vaca (ALV) en los niños en su primer año de vida es de 2,2–2,8%, y alrededor del 80% desarrollan tolerancia clínica en su quinto año (Sampson, 1999). Alrededor del 60% de los niños con alergia a leche de vaca experimentan reacciones mediadas por IgE, y aproximadamente 25% de estos niños conservan dicha sensibilidad en la segunda década de la vida, y un 35%, pasan a tener otro tipo de alergia alimentaria.

En cuanto a las reacciones alérgicas severas, la leche de vaca comprende 10–19% de los casos de anafilaxias inducida por alimentos. La leche de vaca es el tercer alimento que más comúnmente causa anafilaxia en el mundo luego del maní y las nueces. Este es un punto importante a resaltar dado que hasta hace unos años eran muy escasos los trabajos que reportaba casos de anafilaxia por leche de vaca. Actualmente no sólo se ha incrementado su prevalencia, sino también la severidad con que se presenta la alergia a leche bovina (Rona et al., 2007).

En general, la alergia a la soja (AS) no es tan común como la ALV, incluso en niños atópicos (Kattan et al., 2011). Varios autores informaron la reactividad cruzada clínica entre leche de vaca y soja, y los datos varían según los autores. Bruno y colaboradores (Bruno et al., 1997) encontraron una prevalencia de 1,2% en un grupo de 505 niños que sufren de enfermedades alérgicas, y el 0,4% en 243 niños que habían sido alimentados con fórmulas a base de PS en los primeros 6 meses de vida para la supuesta prevención de las enfermedades alérgicas. Además, observaron que un 10–14% de los pacientes con ALV presentan también alergia a AS (Bruno et al., 1997). Burks y colaboradores encontraron que el 50% de los pacientes con enterocolitis producida por leche de vaca también sufrían enterocolitis por la soja (Burks et al., 1994b). Cantani y colaboradores reportan empleando pruebas cutáneas o desafío oral doble ciego con placebo (DBPC) un 3–4% de incidencia de AS en pacientes alérgicos a leche de vaca cuando se les administraba fórmulas a base de soja (Cantani and Lucenti, 1997). En otro estudio realizado por Ahn y colaboradores en Corea se observó una prevalencia del 5,4% de sensibilización a soja en niños atópicos y que la prevalencia de sensibilización a la soja disminuye con la edad

(36,8% en el primer año de vida, el 16,4% en el segundo año, y el 13,7% en el tercer año) (Ahn et al., 2003). También determinaron que de los 21 pacientes con ALV el 42,9% (n = 9) sufrían además de AS (edad media de 10,3 meses), concluyendo que las fórmulas a base de soja deben ser utilizadas cuidadosamente como un sustituto de la leche de vaca en los pacientes con ALV (Ahn et al., 2003). Sin embargo, otros autores tienen otra perspectiva como se muestra en el trabajo realizado por Klemola y colaboradores (Klemola et al., 2002) en donde las reacciones adversas a la soja se observaron con mayor frecuencia en individuos ALV menores de 6 meses. En este estudio, se realizó un seguimiento de 2 años y observaron que la sensibilización a las PS no fue mayor en los lactantes alimentados con fórmula de soja, que en los alimentados con hidrolizados de proteínas de leche. Los autores concluyen que la fórmula de soja fue bien tolerada por la mayoría de los niños con ALV, independientemente que las reacciones sean o no mediadas por IgE, concluyen también que las AS primarias son raras, y por lo tanto proponen que las fórmulas a base de soja pueden ser una alternativa como una primer sustituto lácteo para los niños mayores a 6 meses de edad con diagnóstico de ALV (Klemola et al., 2002). Aún así, otros trabajos recomiendan como sustituto lácteo a las fórmulas a base de soja por su bajo costo y por su mejor aceptación en niños mayores a los 6 meses de vida después de haber establecido por desafío clínico la tolerancia a sus proteínas (Agostoni et al., 2006).

En nuestro país no existen trabajos científicos que reflejen la realidad en cuanto a la prevalencia de las alergias alimentarias. Sólo existen los datos surgidos de una encuesta telefónica realizada en el año 2007 por el médico alergista Dr. César Martín Bózzola, que fue contestada por 1000 personas de las cuales un 2,5% tenía un diagnóstico médico de alergia alimentaria, y un 2,5% creía tener alergia alimentaria. Este estudio reflejó un gran incremento en la incidencia ALV, ocupando la leche de vaca el primer lugar como alérgeno alimentario en la población pediátrica (80%), y la soja, el segundo (33%).

Sabemos que la exposición alimentaria a la leche, a la soja y a los productos que contienen a uno o a ambos varía en diferentes partes del mundo. Por ejemplo la cocina asiática tradicional incluye menos leche que la cocina occidental, pero incluye varias fuentes naturales de soja. Mientras tanto, el consumo de los aditivos alimentarios que contienen soja (aislados, concentrados, harinas y lecitinas de soja) es cada vez mayor en las dietas occidentales. Esta

divergencia geográfica interesante puede llevar a una diferencia en la prevalencia de la alergia a la soja y leche entre las diferentes poblaciones, pero esto no se ha confirmado (Kattan et al., 2011). Lo que sí es llamativo es que a pesar de la gran exposición a las PS no se observan reacciones alérgicas en la misma proporción que como ocurre por ejemplo con el maní o con la leche bovina.

4. REACTIVIDAD CRUZADA

4.1. Reactividad cruzada, co-sensibilización y co-reconocimiento

Las características estructurales de los antígenos protéicos (principales alérgenos), son las que definen la naturaleza de la reactividad cruzada. Por lo tanto actualmente se considera que las reactividades cruzadas a nivel de IgE se dan principalmente entre proteínas con características comunes a nivel de estructura primaria y terciaria. Frente a una sospecha clínica de reactividad cruzada entre dos sistemas alérgicos no relacionados, generalmente es muy difícil definir la naturaleza exacta de la estructura antigénica que induce la respuesta inmune IgE primaria o la sensibilización primaria. Esto lleva a la necesidad de definir el término de “reactividad cruzada” para describir las situaciones clínicas que muestran una reactividad a una fuente claramente definida sin exposición previa. Por el contrario si el individuo se encuentra sensibilizado a dos alérgenos no existe forma de determinar si la reactividad clínica es originada por una reactividad cruzada o no. En esta situación se define la “co-sensibilización” que se da cuando el paciente se encuentra sensibilizado a más de un alérgeno los cuales no reflejan un patrón común de moléculas alérgicas y anticuerpos IgE específicos. Un hallazgo frecuente es la co-sensibilización por fuentes alérgicas detectadas por medio de extractos alérgicos (por ejemplo, césped y ácaros).

El término más amplio, “co-reconocimiento” incluye la definición de reactividad cruzada, podría ser útil adoptarlo para definir la gran mayoría de la reactividad IgE donde la co-exposición a un número de fuentes que posean moléculas homólogas no permite la identificación precisa del agente sensibilizador. Hay unas pocas excepciones donde la fuente sensibilizante se puede identificar con un alto grado de certeza y poder definir entonces cual

es el agente primario que provoca la sensibilización y cuál es el alérgeno de reactividad cruzada (Ferreira et al., 2004).

4.1. Reactividad cruzada y alergia alimentaria a leche de vaca

Se ha descrito ampliamente la reactividad cruzada en pacientes ALV que ingieren leches de otras especies. Esta reactividad cruzada se basa en la alta homología que existe entre las caseínas (principales alérgenos de la leche) presentes en la leche de las distintas especies de mamíferos (Docena 1996, Rozenfeld 2002). La significativa homología entre la leche de vaca y las leches ovinas y caprinas son las principales responsables de la reactividad cruzada clínica observada en pacientes con ALV, que frecuentemente reciben durante el tratamiento leche de oveja y cabra como sustituto lácteo. No obstante, las leches de yegua o leche de burra son toleradas por algunos pacientes y esto se debe a la menor homología estructural entre sus alérgenos (Docena et al., 2002; Järvinen and Chatchatee, 2009).

La reactividad cruzada entre maní y soja, ambas leguminosas, no se observa clínicamente, a pesar que es posible detectar IgE específica de maní que reconoce (*in vitro* e *in vivo*) alérgenos de la soja (Bock and Atkins, 1989; Sicherer, 2001). Green y colaboradores encontraron que el 7% de 140 pacientes alérgicos al maní eran alérgicos a la soja, resultado obtenido a partir de una combinación de los datos de las historias clínicas, IgE específica en suero, pruebas cutáneas y desafío oral (Green et al., 2007). Consistentemente con esto, Bernhisel–Broadbent y Sampson mediante la prueba de desafío oral doble ciego con placebo DBPC (prueba confirmatoria) en 69 niños atópicos con al menos una prueba cutánea positiva para una legumbre, encontraron que el 6,5% de los niños alérgicos al maní reaccionaron con la soja. En este estudio, aproximadamente el 43% de los pacientes tenían una prueba cutánea positiva para soja, y de estos sólo el 11,5% eran reactivos a la soja. Otro estudio encontró también que sólo 6% de los individuos con pruebas cutáneas positivas para soja era reactivo a soja (Bernhisel–Broadbent and Sampson, 1989; Magnolfi et al., 1996). A pesar de estos resultados no es común en la clínica que un paciente alérgico al maní desencadene una reacción de hipersensibilidad frente a la exposición natural a la soja (como alérgeno alimentario o aeroalérgeno). Por lo tanto, los resultados de las pruebas cutáneas o determinaciones de IgE no deben utilizarse para determinar dietas de restricción de alimentos prolongadas a menos

que se observen intolerancias clínicas. El co-reconocimiento de proteínas observado entre soja y maní ha sido confirmado a través de estudios *in vitro* por Beardslee y colaboradores y por Xiang y colaboradores (Beardslee et al., 2000; Xiang et al., 2002) quienes demostraron la homología entre epitopes IgE de la glicininas G1 y G2 (cadenas ácidas) y del alergeno Ara h 3 del maní (Rabjohn et al., 1999). La posición de estos epitopes IgE en las estructuras secundarias y terciarias de soja, y proteínas de almacenamiento de semillas de maní, sugiere que esa parte de las moléculas puede representar un dominio alergénico particular entre la familia de las leguminosas. La homología entre estas proteínas puede ser la base para el desarrollo de nuevas estrategias de intervención terapéuticas para la alergia al maní. Pons y colaboradores han utilizado con éxito soja como inmunoterapia (administración de dosis específicas de soja) para desensibilizar/inhibir la respuesta específica en ratones alérgicos al maní (Pons et al., 2004). Por lo tanto, es necesario realizar estudios *in vivo* dado que en general la reactividad inmunoquímica es más amplia que la clínica.

Las PS también pueden provocar reacciones alérgicas orofaríngeas o sistémicas en pacientes adultos sensibilizados al alergeno principal del polen Bet v 1 provocando el “síndrome de alergia oral”. Esta reactividad cruzada ha sido ampliamente estudiada y se ha establecido que la PS perteneciente a la familia de proteínas del sistema de defensa (PR-10), designada más recientemente como Gly m 4, presenta reactividad cruzada con el alergeno mayor del abedul, Bet v 1. El contenido de Gly m 4 en productos alimenticios de soja depende fuertemente del grado de procesamiento de los alimentos. Se puede encontrar en la bibliografía que un 10% de los pacientes alérgicos al polen de abedul presentan el síndrome de alergia oral con la soja, mediado por Gly m 4 (Kleine-Tebbe et al., 2002; Mittag et al., 2004).

Nuestro grupo ha trabajado en la reactividad cruzada entre alérgenos de la soja y la leche bovina (hallazgo que no ha sido descrito hasta el momento) a partir de las observaciones clínicas en nuestro medio que refieren que numerosos pacientes con ALV al recibir fórmulas a base de proteínas o hidrolizados de soja como sustituto lácteo, desarrollan una intolerancia inmediata. Este problema ha surgido en nuestro país a partir de la escasa disponibilidad comercial de fórmulas hipoalérgicas a base de hidrolizados de PLV, y por su elevado costo, y la frecuente prescripción médica de fórmulas de soja. Existen en el mercado local numerosas marcas que ofrecen estas fórmulas, a un costo muy inferior en comparación con los

hidrolizados de proteínas de leche, y que son aceptadas por los pacientes (pediátricos en su gran mayoría). Sin embargo con el tiempo se ha observado que son rechazadas, lo cual complica marcadamente el tratamiento ya que las opciones terapéuticas son muy reducidas principalmente en pacientes lactantes. La bibliografía internacional también refleja este hecho y existen varios trabajos que indican que la coexistencia clínica de AS en pacientes con ALV (Agostoni et al., 2006; Ahn et al., 2003; Bruno et al., 1997; Burks et al., 1994b; Cantani and Lucenti, 1997; Klemola et al., 2002, 2005; Zeiger et al., 1999; Zoppi and Guandalini, 1999).

En primera instancia nuestros estudios demostraron que no existe una contaminación cruzada con leche bovina en las fórmulas a base de soja, por lo cual la única explicación posible para comprender lo que se observa en los pacientes es la existencia de una reactividad cruzada entre ambos sistemas alergénicos. Por lo tanto para confirmar este fenómeno recurrimos al análisis de los alérgenos de semillas de soja e identificamos que dos proteínas de soja, Gly m 6.0401 y Gly m 5.0101, tienen capacidad de unirse a anticuerpos específicos de proteínas de leche provenientes de antisueros policlonales específicos de leche de vaca (obtenidos en conejos, ratones y cabras), a anticuerpos monoclonales específicos a caseínas y a sueros de pacientes con ALV (globulina 7S) (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002). A partir de estos resultados continuamos con la caracterización inmunoquímica de los alérgenos de reactividad cruzada y de su relevancia clínica (Trabajos de Tesis Doctorales de la Dra. Rozenfeld y Dra. Curciarello, y presente trabajo).

5. Diagnóstico de las alergias alimentarias

El diagnóstico de una enfermedad alérgica se basa en primera instancia en una historia clínica realizada por un médico especialista, que incluya datos personales y familiares del paciente. Sobre la base de la misma el médico puede complementar el diagnóstico mediante la realización de pruebas *in vivo* e *in vitro*. Entre las primeras podemos mencionar el desafío antigénico y la prueba cutánea, mientras que las determinaciones de IgE sérica y de complementos son las pruebas de laboratorio más ampliamente difundidas. Para el caso particular de diagnóstico de alergia alimentaria es muy importante el desafío oral, ya sea en forma domiciliaria o bajo la supervisión de un profesional médico. En este caso la prueba

confirmatoria por excelencia es el desafío oral con placebo doble ciego (DBPC) realizado bajo las normas estandarizadas internacionalmente. Esta prueba no se realiza rutinariamente por ser muy engorrosa, requiere la internación del paciente, depende de la historia clínica (si existen antecedentes de severidad clínica frente a la exposición al alérgeno se descarta su realización) y principalmente por el riesgo que implica exponer al paciente, que se sospecha está sensibilizado, al alérgeno que le desencadena la sintomatología. Inclusive para el caso de la leche de vaca, esta prueba puede resultar significativamente riesgosa por la creciente descripción de este alérgeno como desencadenante de anafilaxias. Por lo tanto queda como recurso diagnóstico *in vivo* las pruebas cutáneas. A pesar de la facilidad para realizarlas en muchos pacientes no es posible su implementación porque se trata de pacientes de muy corta edad (días o meses de vida), y además en general la primera manifestación de la ALV es una urticaria generalizada por lo cual la piel se encuentra alterada. Esto determina que las pruebas *in vitro* sean las de elección ya que no ponen en riesgo la salud del paciente. Las mejoras en los distintos inmunoensayos que actualmente se disponen y la facilidad de su realización determinan que en el mundo se apliquen en forma masiva como pruebas complementarias al diagnóstico. Las determinaciones de complemento principalmente se realizan para confirmar los mecanismos de hipersensibilidad que implican consumo de componentes del sistema del complemento (mecanismos IgE-independientes).

Aunque altos niveles de anticuerpos IgE específicos de proteínas alimentarias y grandes tamaños en las ronchas de las pruebas cutáneas se correlacionan con una mayor probabilidad de que alérgeno ensayado sea el responsable de las reacciones alérgicas, estos resultados no sirven para predecir la severidad de las reacciones alérgicas. Sin embargo la disminución de los niveles de IgE específica y la negativización de las pruebas cutáneas se emplean como parámetros asociados a una reversión del cuadro alérgico como resultado del tratamiento aplicado.

Nuevos test diagnósticos como inmunoensayos de microarrays con péptidos y las pruebas de activación de basófilos pueden resultar tests diagnósticos con potencial aplicación asistencial. Actualmente sólo están disponibles para investigación. Los estudios preliminares mostraron que la activación de basófilos inducida por antígenos correlaciona con diferentes fenotipos de la alergia a la leche, pero resultan tests con baja sensibilidad, se observan numerosos falsos

negativos e implican contar con un citómetro de flujo. En un estudio que evalúa los efectos de ingerir proteínas de la leche desnaturalizadas por el calor en individuos alérgicos a la leche se observó que la reactividad de los basófilos fue sorprendentemente distinta entre tolerantes a la leche calentada y reactivos a la leche calentada (Wanich et al., 2009). Por lo tanto el test de activación de basófilos puede aportar información importante para el diagnóstico y seguimiento de la patología. Los ensayos con microarray se basan en el empleo de múltiples proteínas o péptidos para determinar sensibilización IgE a un número elevado de alergenos. La composición de estos ensayos se basa en la nueva clasificación de alergenos, antes mencionada, en superfamilias. Por lo tanto los resultados surgidos de estos ensayos no sólo pueden aportar información sobre la sensibilización del paciente, sino que además tienen un valor pronóstico.

Por lo tanto diagnosticar una alergia alimentaria significa establecer en el paciente una clara asociación entre la sintomatología observada, un alergeno alimentario desencadenante y la participación del sistema inmune. En este último punto hay que resaltar que el diagnóstico de las alergias IgE–mediadas es directo (a través de las pruebas cutáneas y determinaciones de IgE sérica), mientras que las no medidas por IgE son mas dificultosas por la carencia de ensayos dirigidos a identificar las células involucradas. De todas formas el hecho de identificar el alergeno nocivo resulta crucial para la implementación del tratamiento. La importancia de la identificación de los mecanismos mediados por IgE radica en que éstos son los responsables de inducir las reacciones anafilácticas.

6. Terapias para el tratamiento de las alergias alimentarias

El tratamiento más eficiente actualmente para las alergias alimentarias consiste en la dieta de restricción y evitar todo tipo de exposición al alergeno nocivo y sus derivados. Por lo tanto se requiere identificar al alimento alergénico y educar al paciente y su entorno familiar sobre qué alimentos son los permitidos, y cómo tratar al paciente en caso de una reacción originada por una exposición accidental. Dada la creciente prevalencia de las alergias alimentarias, las

hospitalizaciones asociadas a las mismas y la mayor incidencia de reacciones anafilácticas por alimentos alergénicos, se están realizando esfuerzos por desarrollar terapias correctivas del sistema inmune e incluso procedimientos preventivos. Actualmente varias estrategias de terapias alérgico-específicas y alérgico no-específicas están siendo desarrolladas y en conjunto se denominan inmunoterapias.

6.1. Terapias alérgico-específicas

La inmunoterapia alérgico-específica (SIT) consiste en la administración por vía mucosal de cantidades crecientes del alérgeno hasta conseguir una desensibilización (pérdida de la capacidad de respuesta) y/o la inducción de los mecanismos de tolerancia (no activación inmunológica) que determine que frente a la exposición natural al alimento alérgico no se induzca una reacción alérgica. Esto significa que luego del tratamiento correctivo se debe realizar un desafío oral del paciente con el alimento bajo la estricta supervisión de un especialista profesional. Este tipo de terapias se ha utilizado desde hace muchas décadas para el tratamiento de alergias respiratorias, a través de la **inmunoterapia subcutánea** (SCIT), y ha resultado altamente efectiva para el asma y la rinitis alérgica (Purkey et al., 2013). Sin embargo, en numerosas enfermedades alérgicas no ha resultado eficiente. Para el caso de las alergias alimentarias la inmunoterapia alérgico-específica ha sido investigada como un potencial tratamiento a pesar que la SCIT no arrojó resultados satisfactorios. Las frecuentes reacciones adversas, muchas de las cuales suelen ser graves, determinaron que los pacientes abandonen el tratamiento (Nelson et al., 1997). De todas formas los trabajos de investigación continuaron realizándose en forma sostenida, y el mejor conocimiento del sistema inmune de mucosas ha determinado que actualmente la **inmunoterapia oral** (OIT) sea una opción terapéutica promisoriosa. Aunque el primer informe sobre OIT se publicó en 1908 por Schofield, el primer estudio doble ciego controlado con placebo para el tratamiento de una alergia alimentaria fue realizado 100 años después por Skripak y colaboradores, quienes eligieron veinte niños al azar para recibir una OIT diaria de leche en 3 fases (Skripak et al., 2008). Los desafíos se realizaron antes y después de 13 semanas de la OIT para establecer los umbrales de la reactividad a la leche. Después del tratamiento, la dosis umbral para desencadenar reacciones alérgicas frente a la exposición controlada a la leche fue de más de 50 -100 veces

para todos los niños con OIT activa, mientras que se mantuvo sin cambios en el grupo placebo. Todos los niños con OIT activa experimentaron reacciones adversas, sin embargo la mayoría fueron leves y no afectó el desarrollo de la terapia. Aunque en el tiempo que duró el tratamiento no se observó un cambio significativo en los niveles de IgE específica a leche y en los resultados de las pruebas cutáneas, se produjo un importante aumento de IgG4 específica de leche en el grupo con tratamiento activo, que actúa como anticuerpo neutralizante (bloquea al alérgeno cuando éste ingresa y no permite que se una a los anticuerpos IgE).

En todos los trabajos que pueden encontrarse en la bibliografía sobre OIT en niños con ALV se encuentra que existen reacciones adversas, sin embargo sólo en un 20% de los mismos aproximadamente se observa un abandono del tratamiento. Casi la mitad de las dosis activas están asociadas con síntomas que van desde reacciones localizadas leves hasta reacciones sistémicas graves que requieren la administración urgente de epinefrina.

Por esta razón se han continuado la optimización de las OIT y actualmente la **inmunoterapia sublingual** (SLIT) constituye la terapia más promisorias. Aquí se requieren cantidades menores de antígeno, en comparación con la OIT oral, dado que no es necesario que el alérgeno llegue al intestino para su absorción, porque existe un sistema de mucosas asociado a la mucosa bucal encargado de absorber los alérgenos, activar células dendríticas y éstas inducir los mecanismos de tolerancia mediados por los Treg. Esta terapia ha sido estudiada para la alergia a la avellana (Enrique et al., 2005, 2008) y al durazno (Fernández-Rivas et al., 2009). Ambos estudios demostraron una mayor tolerancia después de 5-6 meses de tratamiento. Los pacientes que recibieron SLIT con frecuencia experimentan síntomas leves y reacciones adversas localizadas, pero rara vez se observaron síntomas sistémicos. Al igual que la OIT, la SLIT parece desensibilizar a los pacientes, y no está claro si conduce a una tolerancia permanente. Por lo tanto en este tipo de terapias también se observan reacciones adversas al exponer el individuo sensibilizado al alérgeno nocivo, pero son más leves y controlables.

En general, las inmunoterapias alérgeno-específicas parecen ser una opción prometedora para el tratamiento de las alergias alimentarias a pesar de las reacciones adversas observadas en las OIT. Es necesario profundizar los estudios para optimizar este tipo de estrategias terapéuticas e incluir estudios de DBPC para determinar la verdadera eficacia y seguridad de estos métodos. Por otro lado se requiere estandarizar los extractos alérgicos, establecer si los antígenos

recombinantes son útiles, y analizar los protocolos en función de las dosis, frecuencia, duración, y establecer la extensión en el tiempo de la administración del alérgeno antes de realizar el desafío oral. La determinación del umbral antigénico de inducción de una reacción de hipersensibilidad permite evaluar si el tratamiento ha resultado eficiente en la inducción de los mecanismos de tolerancia.

En cuanto al tipo de antígeno que puede emplearse en una OIT o SLIT se han estudiado numerosas variantes, desde las mezclas alérgicas naturales, alérgenos puros aislados de la fuente natural, alérgenos recombinantes, proteínas mutagenizadas (hipoalérgicas), péptidos que contienen epitopes B y/o T, péptidos o proteínas conjugados a adyuvantes, etc. Se denominan **vacunas recombinantes** a las que contienen componentes antigénicos recombinantes, modificados o no con el fin de disminuir los efectos adversos comúnmente inducidos en las inmunoterapias alérgeno-específicas. Dado que estas reacciones se originan por la activación de mastocitos y basófilos por los alérgenos en forma IgE-mediada, se han diseñado diversas estrategias de manera disminuir su capacidad de unión a la IgE en la superficie de las células. Para lograr estos antígenos hipoalérgicos se requieren mapear y caracterizar los epitopes alérgicos. Inclusive el mapeo de epitopes T puede brindar ventajas sustanciales si a los epitopes B modificados se los combina con péptidos capaces de activar LT (Hong et al., 1999, Chu et al., 1997, Morafo et al., 2003; Roy et al., 1999). Estudios de este tipo se han realizado con alérgenos modificados del maní (Ara h 1, 2, 3), los que mediante mutagénesis dirigida, pueden estimular la proliferación de células T de individuos alérgicos al maní, pero tienen disminuida la capacidad de unión a IgE en comparación con la proteína natural (Bannon et al., 2001).

Asimismo el desarrollo de modelos animales de alergia en distintas especies animales ha permitido profundizar estas investigaciones, dado que posibilita contar con una herramienta *in vivo* para evaluar la eficacia de estas estrategias terapéuticas, previo a su aplicación en pacientes. Las limitaciones que implican estudiar este tipo de inmunoterapias en humanos (requiere disponer de pacientes con diagnóstico de certeza de alergia IgE-mediada, incluir pacientes tratados con placebo, y el riesgo de reacciones adversas) determina que el empleo de modelos animales como complemento de los ensayos clínicos adquiera importancia en cuanto a la información que brindan sobre los mecanismos puestos en juego, y el estudio de variantes

a introducir en los protocolos para incrementar su eficiencia. De todos modos, los estudios en modelos animales también presentan limitaciones en cuanto al alcance de los resultados obtenidos, y no significan de ninguna manera una alternativa a los ensayos clínicos. Modelos murinos de alergia al maní han permitido confirmar la efectividad de los alérgenos modificados antes mencionados (Li et al., 2003). A través de la inducción de células Treg, la inhibición de las células Th2 y la disminución de la liberación de mediadores por parte de los mastocitos frente a una reexposición al antígeno (King et al., 2001).

Los mecanismos que subyacen a las inmunoterapias alérgeno-específicas se conocen cada vez más y el objetivo de la desensibilización es la disminución de los niveles de IgE, la negativización de las pruebas cutáneas y alcanzar umbrales de hipersensibilidad elevados. Los dos mecanismos actualmente aceptados como subyacentes en estas terapias son la **inmunomodulación** (desvío de la respuesta Th2 específica, por ejemplo hacia mecanismos Th1-mediados) y la **tolerancia** (inducción de Treg que suprime la activación de los LT Th2 específicos). Asimismo es importante resaltar la importancia de la inducción de anticuerpos IgG específicos (IgG1 o IgG4), como en las inmunoterapias primitivas, como un mecanismo que puede ser complementario a los mencionados. También se han hallado niveles aumentados de IgA2 en las SLIT lo que sugiere la activación del sistema inmune de mucosas y el rol protector de la IgA como anticuerpo bloqueante en el lumen intestinal.

En todos estos mecanismos lo que se pretende es controlar la activación de los LT Th2 y la activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, responsables en última instancia de generar el foco inflamatorio (**figura 5**). Dado que algunos grupos han demostrado que en los pacientes con alergias alimentarias los mecanismos tolerogénicos no funcionan adecuadamente, estas terapias mucosales permiten restablecer los mecanismos regulatorios que permiten controlar al activación inmune frente a estas sustancias antigénicas e inocuas (Krogulska et al., 2011; Shreffler et al., 2009). Inclusive se ha demostrado en modelos murinos de alergia alimentaria la inducción de Treg, Foxp3, IL-10 y TGF- β durante la SLIT, que permite controlar el cuadro clínico en los animales frente a un desafío oral (Adel-Patient et al., 2011; Rupa and Mine, 2012; Verhoef et al., 2005).

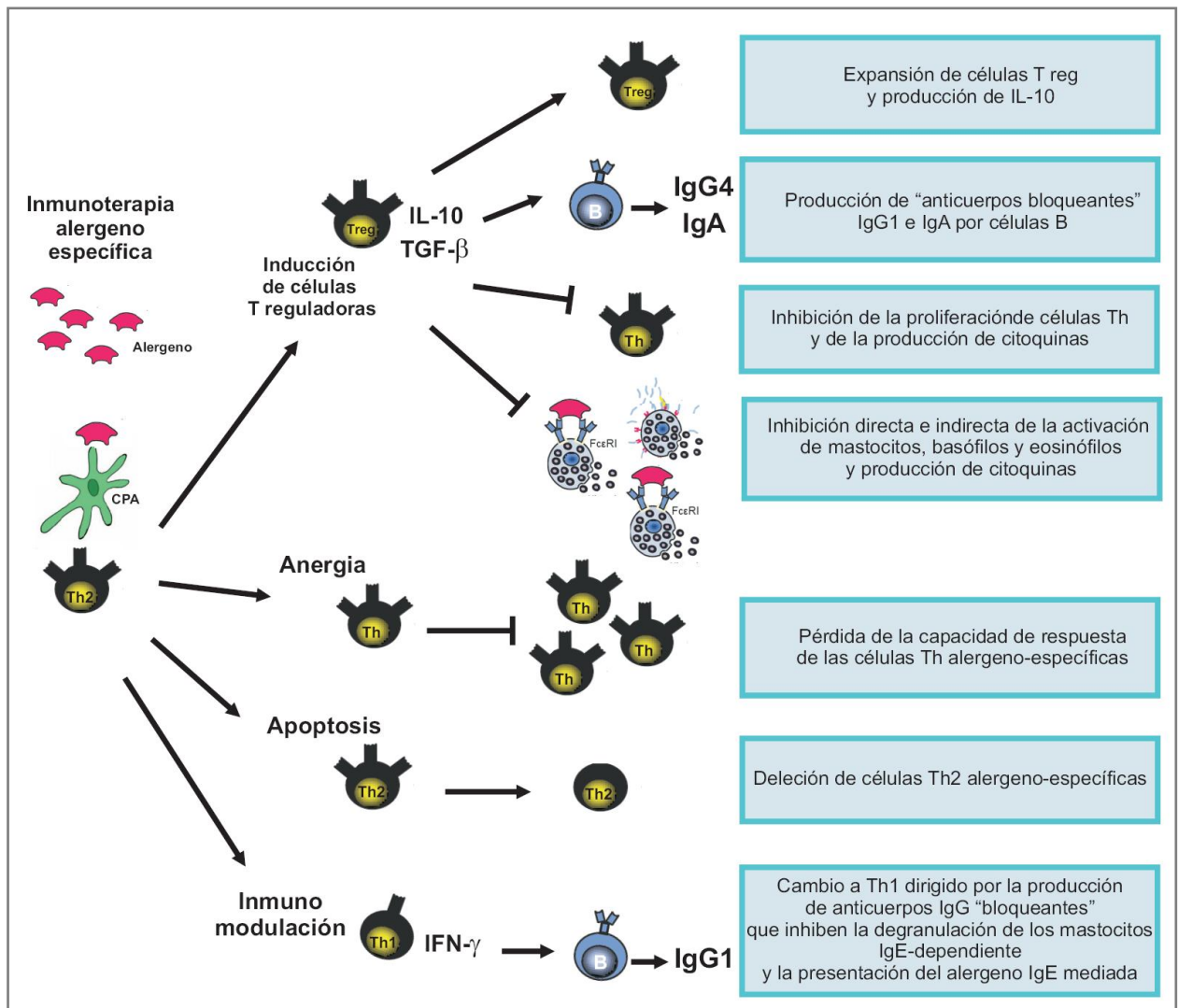


Figura 5. Mecanismos de inmunoterapias alérgeno-específicas. La administración de altas dosis de alérgeno durante la inmunoterapia cambia la respuesta de las células T. La SIT pueden inducir la actividad Treg con la producción de IL-10 y/o TGF β -. IL-10 suprime las respuestas de células T helpers (Th), induce la producción de IgG4 por las células B, e inhibe la activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos. TGF- β induce la producción de IgA por las células B, estimula la inducción de Treg y suprime la inflamación a distintos niveles. Durante SIT, células Th alérgeno-específicas también pueden sufrir anergia o ser eliminadas por apoptosis, lo que contribuye a la disminución de células T, proliferación y producción de citoquinas por el alérgeno. La inmuno-modulación también puede ocurrir con un cambio de perfil de citoquinas de Th2 a Th1 post SIT. El IFN- γ dirige la clase de células B cambiando a IgG1. Anticuerpos IgG1 e IgG4 específicos pueden actuar como "anticuerpos bloqueantes" inhibiendo la degranulación de mastocitos IgE mediada. CPA, célula presentadora de antígeno.

6.2. Terapias alérgeno–no específicas

Terapia anti-IgE. A partir del primer anticuerpo monoclonal que se aprobó para su uso en humanos (OKT3–1986) se han realizado importantes avances en el desarrollo de nuevos sistemas de inmunización pasiva. Así, desde los anticuerpos monoclonales obtenidos en ratón, se han logrado sorprendentes desarrollos biotecnológicos hasta lograr los actuales anticuerpos humanos. En el campo de la alergia el anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-IgE ha significado un importante aporte terapéutico principalmente en pacientes con asma alérgica moderada a severa, rinitis alérgica y más recientemente, alergia alimentaria (al maní). En 2003, se llevó a cabo un ensayo dosis–respuesta doble ciego, aleatorizado, en 84 pacientes alérgicos al maní (Leung et al., 2003). Los pacientes recibieron Hu–901 (Anticuerpo monoclonal IgG1 anti-IgE) o placebo durante cuatro meses. Los pacientes que recibieron la dosis más alta experimentaron una disminución significativa en los síntomas cuando se los desafiaba con maní en comparación con el grupo que recibió el placebo. El umbral medio de sensibilidad al maní aumentó, y aunque el 25% de los pacientes habían mejorado notablemente la tolerancia después del tratamiento, otro 25% no experimentó cambios en su umbral de reactividad, lo que indica que la respuesta al tratamiento puede ser variable.

El principal mecanismo de acción de este anticuerpo es el bloqueo de los anticuerpos IgE circulantes, sin embargo se ha observado que adicionalmente controla la expresión de los receptores específicos en mastocitos y basófilos. Este mecanismo es sumamente importante ya que permite reducir la hiper–reactividad bronquial y la sensibilización de este tipo de células, con lo cual se logra negativizar las pruebas cutáneas e incrementar el umbral de hipersensibilidad.

La terapia anti-IgE en general se aplica en forma combinada con los tratamientos farmacológicos dado que no ha resultado eficiente en episodios agudos.

También podemos mencionar con respecto a terapia no antígeno específicas el empleo de citoquinas y anticuerpos anti–citoquinas en pacientes con asma, rinitis y dermatitis atópica, aunque el resultado de estos protocolos ha sido muy poco satisfactorio. Se ha estudiado en humanos el uso de receptores solubles de IL–4, a–IL–5, a–IL–9, a–IL–13, a–eotaxina, rIFN– γ , rIL–12; mientras que en modelos animales también se ha estudiado el efecto de citoquinas

(rIL-10, rIFN- γ , rIL-12, rIL-18, etc) y anticuerpos monoclonales (a-IL-13R α , a-IL-4R α , a-CD80, a-CD86, a-CD28, a-CD23, a-IL4, a-IL-13, etc).

Un tratamiento adicional no específico de antígeno, y cada vez más en uso, es el empleo de hierbas medicinales. La Nineherb, fórmula basada en la **medicina tradicional china**, llamada fórmula a base de hierbas para alergia alimentarias (FAHF-2), ha demostrado ser eficaz en la prevención de la anafilaxia en un modelo murino de alergia al maní (Srivastava et al., 2005). Ratones alérgicos al maní tratados con FAHF-2 no mostraron signos de anafilaxia posteriores a la exposición oral al maní. Se logró evidenciar disminución en los niveles de IgE específica al maní y en los niveles de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), con aumento en la producción de IFN- γ . Estos efectos no son específicos del maní; pero se ha demostrado que el tratamiento modula la respuesta alérgica en un modelo murino de múltiples alergias alimentarias y no se observan reacciones adversas (Srivastava et al., 2012). También se ha estudiado el empleo de probióticos en alergia alimentaria, pero los resultados no son concluyentes en cuanto a su eficacia. Se ha demostrado que pacientes con ALV logran una recuperación pondo-estatural, disminución de síntomas cutáneos y gastrointestinales, disminución de reacciones a edades mayores, y recuperan la permeabilidad intestinal.

La alergia alimentaria sigue siendo un problema de salud creciente. Es necesario profundizar los estudios para obtener más información sobre los mecanismos inmunológicos de tolerancia oral, y las complejas interacciones entre factores del huésped y propiedades de los alimentos alérgicos, para poder desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico que permitan identificar con mayor precisión los mecanismos subyacentes en las alergias alimentarias, y plantear nuevas y más seguras inmunoterapia correctivas. También es importante establecer la duración de los efectos de estas terapias de manera de evitar reacciones accidentales al concluir el tratamiento. Además los estudios de nuevos procedimientos de inmunointervención permitirán avanzar en la comprensión de los mecanismos de tolerancia que operan fisiológicamente para evitar reacciones alérgicas o autoinmunes. Estas estrategias, ya sea solas o en combinación con otras terapias, deberían proporcionar una forma segura y eficiente de controlar estas enfermedades inflamatorias, pero además constituir una opción correctiva del sistema inmune para evitar la cronicidad de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Extractos de proteínas de soja

Para la preparación de los extractos proteicos crudos de soja (PS) (Curciarello et al., 2008) se trituraron las semillas de soja (*Glycine max.* L merr genotipo Asgrow, porotos de soja comercial) empleando un molinillo eléctrico y mortero, y se disolvieron en NaHCO_3 0,01 N a 90 °C (65 g de semillas molidas y 0,5 g de NaHCO_3 en 365 ml de agua destilada). Luego se homogeneizó (homogeneizador Ultraturrax UT 20.000) y al alcanzar la temperatura ambiente (RT) se centrifugó a 5000 g durante 20 min a 20 °C. Se tomó el sobrenadante y se realizó una nueva centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 4 °C. Seguidamente se procedió a la extracción de lípidos con cloroformo durante 8 hs a 4 °C, utilizando una relación solución acuosa: cloroformo 2:1. Finalmente los extractos se dializaron contra agua bidestilada durante toda la noche (ON) utilizando una membrana de diálisis de 2 kDa de punto de corte y se almacenaron a - 20 °C. El contenido total de proteínas se determinó con el método del Ácido Bicinconínico (Kit Pierce, Rockford, IL, USA), usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

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 proteínas de leche de vaca (PLV).

1.3. Proteínas puras comerciales

Se utilizaron las siguientes proteínas puras:

- **α -caseína bovina**, con una pureza de aproximadamente 85 % por electroforesis (Catálogo C-6780 SIGMA-ALDRICH, Germany);
- **β -caseína bovina**, con una pureza de aproximadamente 90 % por electroforesis (Catálogo C-6905 SIGMA-ALDRICH, Germany);
- **κ -caseína bovina**, con una pureza de aproximadamente 80 % por electroforesis (Catálogo C-0406 SIGMA-ALDRICH, Germany);

- **β -lactoglobulina (β -Lg) bovina**, con una pureza de aproximadamente 85 % por electroforesis (Catálogo L-0130 SIGMA-ALDRICH, Germany);
- **Ovoalbúmina (OVA)**, albúmina de huevo blanco de pollo, con una pureza de aproximadamente 98 % por electroforesis; (Catálogo A5503 SIGMA-ALDRICH, Germany).

1.4. Oligonucleótidos

En la **tabla 1** se presentan las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de proteínas de soja estudiados en este trabajo, a partir de una biblioteca de cDNA de semillas inmaduras de soja obtenida por la Dra. Petruccelli (Petruccelli et al., 2005), y también los oligonucleótidos empleados para construir mutantes codificantes de las zonas de interés.

Tabla 1. Oligonucleótidos (primers) empleados para la amplificación de genes de soja.

Primers	Secuencia 5'-3'	Numero de Acceso Genbank	Tamaño (pb)	Producto
Foward- α	ctagtctagagtatgatgagagcacggttccc	X17698	1632	Gly m 5.010 (sub α de la β -conglucina Proteína madura (sin péptido señal))
Reverse- α	cgcgatcctcagtaaaaagccctcaaaattg	Gly m 5.0101		
Foward-34	caccatgatatcaactcatcgttccatattg	DQ32485	1081	Gly m Bd 30K (P34) Proteína madura (sin péptido señal)
Reverse-34	tcaaagaggagagtgatcaac	Gly m Bd 30K		
Foward-28	caccatggccttccatgatgatg	AB046874	1541	Gly m Bd 28K (P28) Proteína madura (sin péptido señal)
Reverse-28	ttaaaaaacatcataaccacatc	Gly m Bd 28K		
Foward-34	caccatgatatcaactcatcgttccatattg	DQ324851	348	NT-P34 Delección -NH ₂ t de Gly m Bd 30K (P34)
Reverse-NT-P34	aggtggatggtcacaagaatattgttc	Gly m Bd 30K		
Foward-CT-P34	caccatggagggtagatgcaaagccaataagatac	DQ324851	456	CT-P34 Delección -COOHt de Gly m Bd 30K (P34)
Reverse-34	tcaaagaggagagtgatcaac	Gly m Bd 30K		

En la **tabla 2** se presenta un listado de los vectores de clonado 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
pENTR/D-TOPO (Invitrogen Argentina S.A)	Clonado direccional	-	-	TOPO Gateway	Kanamicina
pET 28a (Novagen, Wisconsin, USA)	Expresión direccional	T7 polimerasa	Tag de histidinas N y C Terminal, Sitio clivaje trombina	Tradicional	Kanamicina
pDEST-HisMBP (Addgene Inc, Cambridge, USA)	Expresión	T7 polimerasa	Tag His-Maltosa binding protein -NH ₂ t	Gateway	Ampicilina
pET200/D-TOPO® (Invitrogen)	Expresión	T7 polimerasa	Tag His- y sitio enterokinasa -NH ₂ t	TOPO	Kanamicina

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizadas en este trabajo y sus principales características se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* usadas.

Cepas	Genotipo/ Descripción	Aplicación	Promotor/ Inductor	Marcador de resistencia
DH5α	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Clonado general, propagación de plásmido	-	-
DH10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-	Clonado general, propagación de plásmido	-	-
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Clonado general de plásmidos	-	-
DB3.1	F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ- leu mtl1	Contiene el alelo gyrA462 que confiere resistencia al efecto tóxico del gen ccdB, huésped de propagación de vectores GATEWAY (contienen el gen ccdB)	-	Cloranfenicol
BL21 (DE3)	F- dcm ompT hsdS(rB - mB -) gal λ(DE3)	Huésped de expresión deficiente en proteasas lon y OmpT.	T7 polimerasa Inducción IPTG	-
BL21 Codon Plus (DE3)	F- ompT hsdS(rB - mB -) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Huésped de expresión, deficiente en proteasa lon y OmpT; contiene plásmidos codificantes para argU, ileY, leuW y proL 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

Cepas	Genotipo/ Descripción	Aplicación	Promotor/ Inductor	Marcador de resistencia
BL21 STAR (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)	Posee el gen RNE (rne131) mutado truncado que codifica una enzima RNasa E, carece de la capacidad para degradar ARNm, lo que resulta en un aumento de la estabilidad del ARNm además es deficiente en proteasa lon y OmpT	T7 polimerasa Inducción IPTG	-

1.5. Sueros específicos

1.5.1. Anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas

Se emplearon anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos de α -caseína (1D5), β -caseína (4C3) y κ -caseína (3B5) bovinas obtenidos por el Dr. Docena (Docena et al., 2002). Estos anticuerpos fueron preparados inoculando por vía intraperitoneal (ip) PLV a ratones Balb/c. Los hibridomas fueron obtenidos según la técnica desarrollada por Galfrè y Milstein (Galfrè and Milstein, 1981) Los mAbs fueron seleccionados para los ensayos mediante el estudio de alta especificidad frente a α -caseína (1D5), β -caseína (4C3) y anti κ -caseína (3B5). Para algunos ensayos, estos anticuerpos fueron purificados a partir de ascitis empleando cromatografía de afinidad con proteína G (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare Life Science, Sweden), siguiendo el protocolo del fabricante.

1.5.2. Sueros de pacientes

Se utilizaron muestras de suero humano de niños atópicos (con un rango de edades que van de 6 meses a 13 años con un promedio de 2,7 años), con diagnóstico de alergia a la leche de vaca (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 alergenicos según la historia del paciente (dermatofagoides, lolium, Ambrosia, etc), además de los controles positivo (histamina) y negativo (solución fisiológica). Asimismo en todos los pacientes se cuantificó los niveles séricos

de IgE total por ELISA de captura, e IgE específica para PLV y PS 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 ciudad de La Plata (Servicio de Alergia) y Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutierrez de la ciudad autónoma de Buenos Aires (Servicio de Inmunología). Además se incluyeron muestras de individuos normales, sin historia clínica o reacciones asociadas a la ingesta de leche de vaca poseen niveles normales de IgE sérica y muestras de pacientes alérgicos a aeroalergenos que no poseen IgE sérica específica a PLV, sin historial de alergias alimentarias ni manifestaciones clínicas luego de la ingesta de soja o leche de vaca. En todos los casos se incluyó en la historia clínica información posible exposición a alimentos que contienen soja.

(Se mostrarán oportunamente en los capítulos correspondientes las tablas donde se especifican las características de cada suero usado).

1.6. Péptidos sintéticos

La secuencia entera de la proteína of Gly m Bd 30K (P34) se sintetizó sobre una fase sólida de celulosa (JPT Peptide Technologies GMBH, Berlín, Alemania) como 15-mer péptidos lineales preparados superpuestos de a cinco (5) residuos del extremo amino terminal y del extremo carboxilo terminal, siendo un total de 36 péptidos.

1.7. Enzimas proteolíticas

- **Tripsina** (Trypsin, Sequencing Grade, Promega). La tripsina hidroliza específicamente los enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de los residuos de lisina (K) y arginina (R). La tripsina empleada fue de origen porcino y ha sido modificada por el fabricante por metilación reductora, haciéndola resistente a su propia digestión proteolítica (autoproteólisis),
- **Glu-C** (Glu-C, Sequencing Grade, Promega). Es una endoproteasa serínica que reconoce específicamente residuos de ácido aspártico (D) o glutámico (E) hidrolizando la unión peptídica del lado carboxilo de los mismos. Si la reacción se realiza en buffer bicarbonato de amonio o acetato de amonio la especificidad de la enzima es mayor en los residuos de

glutámico. En buffers fosfato el corte se produce en los residuos de aspártico y glutámico.

La actividad de Glu-C es óptima en el intervalo de pH de 4.0–9.0.

1.8. Esferas superparamagnéticas

Dynabeads Pan IgG de ratón (Invitrogen): Esferas superparamagnéticas de poliestireno de 4,5 μm de diámetro revestidas con mAbs monoclonales humanos específicos de inmunoglobulina G de ratón.

1.9. Ratones

Se emplearon ratones BALB/c machos (bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLP) con certificado de salubridad para gérmenes específicos, 5 semanas de edad que se emplearon en el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria. Se agruparon en distintos lotes de acuerdo con los experimentos diseñados.

2. MÉTODOS

2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1.1. Clonado del gen codificante para Gly m 5.0101 (subunidad α de la β -conglucina)

La construcción se obtuvo como se describió previamente (S. Petruccelli, F.G. Chirido, and M.C. Añón 2005) a partir de una biblioteca de cDNA de semillas inmaduras de soja, amplificando la secuencia codificante para la subunidad α de β -conglucina (número de acceso al Gen Bank X17698) por PCR con oligonucleótidos específicos (detallados en la **tabla 1**) tales que permitieran obtener la secuencia completa sin el péptido señal y su posterior clonado en un marco de lectura adecuado para fusionarla a un tag de histidinas en el extremo carboxilo terminal. Finalmente la secuencia codificante se introdujo en el vector de expresión pET28a (Novagen) y se denominó pET28a-His- α .

2.1.2. Clonado de los genes codificantes para las proteínas Gly m Bd 30K y Gly m Bd 28K

Las secuencias de cDNA codificante para Gly m Bd 30K (P34) (Genbank Número de Acceso DQ324851) y Gly m Bd 28K (P28) (Genbank Número de Acceso AB046874) se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizando como molde la biblioteca de cDNA de semillas de Glycine max L.Merr. (Petruccelli et al., 2005) y los primers (oligonucleótidos) Forward-34 (caccatgatatcaactcatcggtccatattg) y Reverse-34 (tcaagaggagagtgatcaac) y Forward-28 (caccatggccttccatgatgatg) y Reverse-28 (ttaaaaaacatccataaccacatc), respectivamente. Los primers fueron diseñados para amplificar las secuencias sin péptido señal de secreción y para poner en el marco las secuencias con una proteína de fusión MBP en el extremo N-terminal. Se clonó el fragmento de DNA amplificando por PCR con una enzima con corrector de errores (PFx o Pfu) direccionalmente en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogene, Argentina). Para la expresión de P34 y P28 las secuencias codificantes se transfirieron al vector de destino pDEST-His-MBP (Nallamsetty et al., 2005) utilizando LR clonasa (Life Technology, SA Buenos Aires, Argentina) para obtener pDEST-His-MBP-P34, pDEST-His-MBP-P28 y pDEST-His-MBP.

2.1.3. Subclonado de secuencias codificantes para fragmentos de las proteínas de soja Gly m Bd 30K

Se obtuvieron también plásmidos que expresan dos fragmentos de la proteína P34: la región amino terminal (NT-P34) y la región carboxilo terminal (CT-P34) para lo cual se amplifica por PCR la región de interés utilizando como molde pDEST-His-MBP-P34 y los oligonucleótidos: Foward-34 (caccatgatatcaactcatcgttccatattg) y Reverse-NT-P34 (agggtggatgggtcacaagaatattggttc) y Foward-CT-P34 (caccatggagggttagatgcaaagccaataagatac) y Reverse-34 (tcaaagaggagagatgatcaac), respectivamente. Se clonaron amplificado por PCR direccionalmente en el vector pET200/D-Topo (Invitrogene, Argentina) se obtuvieron entonces los vectores pET200-His-NT-P34 y pET200-His-CT-P34 que contienen las secuencias codificantes para ambas regiones de P34.

2.1.4. Preparación de células competentes químicas empleando PEG

Se partió de un cultivo de bacterias de 5ml en medio Luria Bertani (LB) (con el antibiótico adecuado según la cepa), el cual se creció toda la noche a 37 °C con agitación 200rpm. Se realizó una dilución del mismo 1:100 en 50 ml medio LB fresco y se incubó a 37 °C y agitación aproximadamente 2 hs hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,5-0,6. A continuación, el cultivo se incubó 10 min en hielo y luego se centrifugó en condiciones estériles a 1400 g por 10 min, luego de desechar el sobrenadante se resuspendió el precipitado con 5 ml de buffer TSS previamente enfriado [5 gr PEG, 1,5 ml de MgCl₂ 1 M, 2,5 ml de DMSO y medio LB hasta 50 ml, esterilizado por filtración y almacenado a - 20 °C] para luego fraccionar de a 100 µl en tubos estériles y almacenar a - 80 °C.

2.1.5. Transformación en bacterias competentes químicas

Para realizar la transformación por shock térmico en las cepas se descongelaron lentamente en baño de hielo las células competentes, se adicionaron 25 ng de DNA (o 1 µl de plásmido obtenido por miniprep o 5-10ul de mezcla de ligación) a 100 µl de bacterias, y se dejó en hielo por 30 min. Luego se calentó durante 30 seg a 42 °C, y rápidamente se pasó al baño de hielo por 2 min. A la mezcla de bacterias con el plásmido se le adicionó 1 ml de medio SOC fresco y se incubó a 37 °C con agitación durante 1 h. Luego se centrifugó el cultivo a 30.000 g, se descartó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió el precipitado bacteriano en 100 µl del sobrenadante residual, que fueron seguidamente sembradas en una placa de ágar LB suplementado con el antibiótico de

selección correspondiente, y plaqueados con rastrillo de Drigalsky. Luego de incubar ON a 37 °C se obtuvieron las colonias de bacterias transformadas.

2.1.6. Amplificación y preparación de los plásmidos

Para la amplificación de plásmidos pET28a, pENTR/D-TOPO y pET200/D-TOPO, se emplearon las cepas *E.coli* DH5 α , 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 durante 12 hs. Luego se centrifugaron a 13.000 g y a partir del precipitado bacteriano se realizó la extracción y purificación de plásmido empleando el kit comercial de Wizard Plásmid (Promega).

2.1.7. Expresión de las proteínas recombinantes a baja escala y estudio de la cinética de expresión

Con el objeto de determinar las condiciones óptimas de expresión de las diferentes proteínas recombinantes los plásmidos pET28a-His- α , pDEST-His-MBP-P34, pDEST-His-MBP-P28, pDEST-His-MBP, pET200-His-NT-P34 y pET200-His-CT-P34 fueron transformados en diferentes cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 CodonPlus (DE3) y BL21 STAR (DE3). Las cepas fueron crecidas en 5ml medio LB con los antibióticos correspondientes ON a 37 °C, estos fueron utilizados para inocular por duplicado 15 ml medio LB suplementados con antibióticos. Los cultivos fueron crecidos a 37°C con agitación a 200 rpm hasta una DO a 600 nm de aproximadamente 0,5 al llegar a esta DO se agregó Isopropil-b-D-thiogalactopiranosido (IPTG) de manera que resulte una concentración final de 1 mM. Luego del agregado de IPTG se crecieron los cultivos a 37 °C y a 26 °C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (cinética de expresión) y las células se colectaron por centrifugación a 13.000 g por 2 min a RT. Los precipitados conteniendo las bacterias que expresaban las distintas proteína y los controles fueron lisados por agregado de buffer Tris-HCl pH = 7,4 urea 8 M seguido de calentamiento a 100°C durante 1 min, luego se centrifugó a por 2 min a los sobrenadantes se analizaron por medio de electroforesis SDS-PAGE 12,5 % y visualizadas por tinción con Coomassie® Brilliant Blue.

2.1.8. Expresión a gran escala de las proteínas recombinantes

Para obtener mayor cantidad de proteína se llevó a cabo la expresión a gran escala, empleando *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus para la expresión de las proteínas α , P34, P28 y MBP; y BL21 STAR (DE3) para la expresión de los NT-P34 y CT-P34. Las bacterias se crecieron en medio LB suplementado con antibióticos durante ON a 37 °C. Los cultivos fueron utilizados para inocular 250 ml de medio LB suplementado con antibióticos, estos fueron crecidos a 37 °C hasta llegar a una DO a 600 nm de aproximadamente 0,5 y luego del agregado de IPTG los cultivos se crecieron a 26 °C con agitación durante 6 hs. Finalmente las bacterias se separaron por centrifugación a 3.800 g por 15 min a 4 °C.

Los precipitados de las células se resuspendieron en 5 ml de buffer lisis Co [50 mM fosfato de sodio, 300 mM cloruro de sodio, lisozima 0,5 mg/ml, pH = 7,4], se incubaron 30 min en hielo y luego fueron sonicados con 6 pulsos de 30 segundos cada uno con un output de 100 watts de potencia (Branson Sonifier® S-250A analog ultrasonic). Las soluciones resultantes fueron centrifugadas a 3800 g por 15 min a 4 °C, para la separación de la fracción soluble (FS) de la insoluble (FI). Se realizaron purificaciones tanto de las proteínas recombinantes solubles como insolubles. A partir de las FS se purificaron las proteínas recombinantes solubles empleando cromatografía de afinidad por unión a metal empleando columnas conteniendo el ión cobalto (HisPur Cobalt Spin, Pierce) en condiciones nativas. Para obtener las proteínas recombinantes que se acumulan como cuerpos de inclusión, las FI se resuspendieron con buffer lisis Ni [Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 mM pH = 8 urea 6 M] y se incubaron 10 min a 60 °C, luego se centrifugaron a 3.800 g por 20 min. Del sobrenadante se purificaron las proteínas recombinantes con la resina Ni-NTA His·Bind (Novagen) bajo condiciones desnaturizantes (urea 6 M). Las proteínas purificadas fueron dializadas contra 4 litros de buffer 1 mM Tris-HCl pH = 8, por 24hs con un cambio de buffer. El contenido total de proteínas se determinó con el método del Ácido Bicinconínico (Kit Pierce, Rockford, IL, USA), usando BSA como estándar. Las proteínas también se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las proteínas recombinantes His- α (70kDa), P34 (His-MBP-P34, 81,6 KDa), P28 (His-MBP-P28, 94 KDa), MBP (His-MBP, 42 KDa), péptidos NT-P34 (His-NT-P34, 19 kDa) y CT-P34 (His-CT-P34, 22 kDa) se disolvieron en buffer muestra sembrándose 2-3 μ g de proteína total por cada calle. Luego de la corrida electroforética los geles fueron teñidos con Coomassie® Brilliant Blue.

Una fracción de las proteínas recombinantes purificadas (P34, P28, MBP, péptido NT-P34 y péptido CT-P34) a ser empleada en los ensayos de proliferación celulares se detoxificaron con el kit Detoxi-Gel (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para eliminar endotoxinas (lipopolisacáridos (LPS) bacterianos).

2.2. ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS

2.2.1. Inmunoblots de las caseínas bovinas, leche y soja con mAbs

Las muestras (caseínas bovinas, leche vacuna y extracto de soja) se prepararon en buffer muestra en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol) y 2–3 μ g de proteína total fueron sembrados por cada calle. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE 12.5 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y luego fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH, USA) usando el equipo Fastblot B43 (Biometra). Las membranas se bloquearon con TBS-T (TBS-0.1 % Tween 20) con suero equino (SE) al 3 % por 2 h a 37 °C y posteriormente se incubaron con el primer anticuerpo (1 μ g/ml) por 1 h a 37 °C. En este paso se utilizaron los anticuerpos monoclonales que específicos de las caseínas bovinas α -caseína (1D5), β -caseína (4C3) y κ -caseína (3B5). Luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado: un anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulinas G de ratón conjugado con HRP (Biorad) (diluido 1:3000) durante 1 h a 37 °C. Las bandas de proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con luminol y la señal fue captada con una película de rayos X (Amersham Hyperfilm ECL).

2.2.2. ELISA indirecto de las proteínas recombinantes de soja con sueros de pacientes alérgicos a PS

Las placas de microtitulación de poliestireno (Nunc Maxisorp, Denmark) se sensibilizaron con 0,05 μ g/pocillo de P34, 0,05 μ g/pocillo de P28 o 0,025 μ g/pocillo de MBP. Luego se bloquearon con SE al 5 % en PBS pH = 7,4 durante 2 hs a 37 °C y se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a soja (sueros descriptos en la **tabla 1** mostrada en resultados del Capítulo II; diluidos 1:2 v/v en SE al 5 % en PBS) ON a 4 °C. Se incubó luego con anticuerpo monoclonal anti-IgE humana conjugado con Fosfatasa alcalina (FAL) (Sigma-Aldrich dilución) durante 2 hs a 37 °C. Finalmente, el color se desarrolló con 100 μ l p-nitrofenilfosfato (PNPP) en buffer pH = 9,6,

deteniéndose la reacción 30 min más tarde con 50 μ l de EDTA 0.1 M, finalmente se midió la DO a 405 nm en un lector de ELISA (SirioS SAECS, Radim Company, Italy).

Los valores de corte de IgE (*cut-off*) para cada proteína se obtuvieron estadísticamente de la siguiente manera: se analizaron mediante la técnica del ELISA a las PS, a las PLV y a las diferentes proteínas recombinantes, frente 20 sueros de individuos no alérgicos (negativo) por separado y un suero obtenido haciendo un pool de estos mismos 20 sueros.

El factor f se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$f = \frac{\overline{DO} + 2DS}{DO_{pool(-)}}$$

siendo

\overline{DO} Densidad óptica media; DS desviación estándar, $DO_{pool(-)}$ densidad óptica del suero pool negativo.

Este factor se utiliza para obtener los cut-off en cada corrida individual para cada proteína. Los valores obtenidos de $DO_{pool(-)}$ en cada ensayo se multiplica f .

2.2.3. Inmunoblots de las proteínas recombinantes de soja con mAbs y sueros de pacientes ALV

Las proteínas recombinantes de soja P34, P28 y MBP (como control negativo) y los péptidos recombinantes derivados de P34 (NT-P34 y CT-P34) se prepararon en buffer muestra y 2–3 μ g de proteína total fueron sembrados por cada calle. Las proteínas separadas por SDS-PAGE con geles de acrilamida 12.5 % se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell Bioscience, Keene, NH, EE.UU.) utilizando Fastblot B43 (Biometra). Las membranas se bloquearon en TBS-T (TBS-0,1 % de Tween 20) con SE al 3 % y se incubaron con el anticuerpo primario (1 μ g/ml): anticuerpos monoclonales de ratón **mAbs anti α -caseína (1D5), anti β -caseína (4C3) y anti κ -caseína (3B5)** durante 1 h a 37 °C, luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado: anticuerpo monoclonal específico anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Biorad) (diluido 1:3000) durante 1 h a 37° C. Las bandas de proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con luminol y expuestos a una película de rayos X (Amersham Hyperfilm ECL).

Las proteínas recombinantes también fueron estudiadas por inmunoblots enfrentándolas a sueros de pacientes ALV, sueros controles negativos de pacientes no alérgicos y sueros de pacientes alérgicos no relacionados a alergias alimentarias (las tablas con las características de los sueros utilizados para cada ensayo son mostradas en los capítulos correspondientes). Para el desarrollo de los inmunoblots, las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH, USA) usando el equipo Fastblot B43 (Biometra). Las membranas se bloquearon con TBS-T (TBS-0.1 % Tween 20) con SE al 3 % por 2 h a 37 °C e incubadas luego con el primer anticuerpo: sueros de pacientes (diluidos 1:5 v/v en TBS-T 1 % SE) ON a 4 °C. El anticuerpo secundario, anticuerpo monoclonal anti-IgE-humana biotilado (VECTOR Lab) fue agregado (diluido 1:3000 en TBS-T 1 % SE), por 4 h a 37 °C. Por último Streptavidina-HRP conjugada (Thermo®) diluida 1:3000, 30 min a 37 °C. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia con luminol y expuestas a X-ray film (Amersham Hyperfilm ECL).

2.2.4. ELISA de competición

Se sensibilizaron placas de microtitulación de poliestireno (Nunc Maxisorp, Denmark) con 0,25 µg/pocillo de α-caseína bovina, y bloqueadas luego con SE al 5 % en PBS. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-α-caseína (1D5) diluido 1:16000 para ser pre-incubado con volúmenes iguales (dilución final del anticuerpo 1:32000) de las diferentes concentraciones (ente 10^{-6} – 2,5 mg/ml dependiendo de la proteína) de proteínas α-caseína, P34, P28 y Ovoalbúmina (OVA) (como proteína no relacionada) por 2 hs a 37 °C. Se hicieron competir las proteínas con la α-caseína bovina unida a la placa por el anticuerpo 30 min a 37 °C. Luego se agregó el anticuerpo secundario (diluido 1:3000), anticuerpo monoclonal específico anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Biorad) durante 1 hora a 37 °C, se reveló mediante desarrollo de color agregando 100 µl de solución de sustrato 1 mg/ml de OPD y 0,1 µl/ml de 30 % H₂O₂ en buffer citrato 0.1 M pH = 5.0, se detuvo la reacción a los 15 min con 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Se midió DO a 492 nm en un lector de ELISA (SirioS SAECS, Radim Company, Italia).

2.2.5. Mapeo de epitopes lineales de Gly m Bd 30K (P34) con péptidos solapados

La secuencia completa de la proteína of Gly m Bd 30K (P34) (360aas, sin el péptido señal) fue sintetizada como péptidos lineales de 15 residuos de aminoácidos solapados de a cinco (5) residuos requiriéndose un total de 36 péptidos. Los péptidos se unieron covalentemente a un soporte de celulosa Whatman 50 (**PepSpot Peptides**, JPT Technologies GmbH, Berlin, Alemania). La membrana resultante fue ensayada frente a diferentes antisueros.

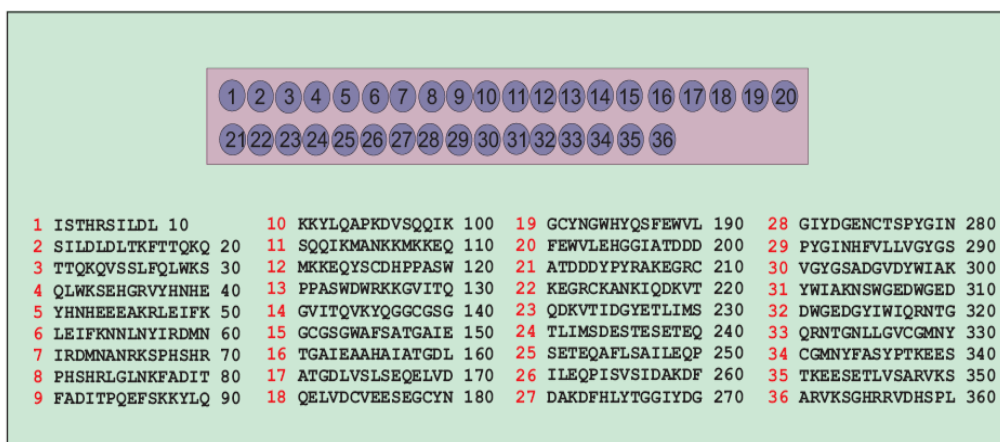


Figura 1. Representación esquemática de la membrana de celulosa conteniendo los péptidos solapados utilizados para el mapeo de epitopes de of Gly m Bd 30K (P34). En la figura se muestra el esquema de los spots y debajo se enumeran los péptidos (rojo) con sus secuencias (negro) al final de cada una se indica la posición del último aminoácido en la secuencia entera.

La membrana primeramente fue bloqueada con buffer TBS-T (TBS-0.1 % Tween 20) con 3 % SE por 2 h a 37 °C e incubada con el anticuerpo primario: pool de sueros de pacientes reactivos a soja (Pool nro1 de 4 sueros, números 1,2,3 y 4 descritos en la **tabla 4** mostrada en resultados del Capítulo IV; diluidos 1:5 v/v en 1 % SE en TBS-T) ON a 4 °C, luego se incubó con el segundo anticuerpo monoclonal anti-IgE- humano biotinilado (VECTOR Lab) diluido 1:4000 durante 4 h a RT. Finalmente, se incubó frente a Streptavidina-HRP (Thermo®) diluido 1:4000 por 1h a RT. Los spots se visualizaron con sustrato quimioluminiscente luminol y expuestos a una película de rayos X (Amersham Hyperfilm ECL).

La membrana fue sometida a procesos de *stripping* siguiendo las recomendaciones de JPT Technologies cada vez que se la reutilizó.

Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario: pool de sueros de pacientes reactivos a PLV y soja (Pool nro2 formado por 4 sueros numero 5, 6, 7 y 8 descriptos en la **tabla 4** mostrada en resultados del Capítulo IV; diluidos 1:5 v/v en 1 % SE en TBS-T) y frente al suero de paciente reactivo sólo a PLV (sueros numero 9 descripto en la **tabla 4** mostrada en resultados del Capítulo IV; diluidos 1:5 v/v en 1 % SE en TBS-T) y revelado como se detalló anteriormente.

Para completar la caracterización de la reactividad cruzada de los péptidos con leche bovina se enfrentó la membrana con los anticuerpos monoclonales hechos en ratón (1 µg/ml): **mAbs anti α-caseína (1D5), anti β-caseína (4C3) y anti κ-caseína (3B5)** (en experimentos independientes) por 3 h a RT, luego se incubó con el segundo anticuerpo monoclonal específico anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Biorad) diluido 1:3000 por 2 h a RT. Los spots se visualizaron por quimioluminiscencia con luminol y expuestos a una película de rayos X (Amersham Hyperfilm ECL).

2.3. INMUNOPROTEÓMICA

2.3.1. Medida de la afinidad Ag-Ab

2.3.1.1. Biotinilación del mAb 1D5

Primeramente se dializó ON la muestra que contiene el anticuerpo monoclonal purificado 1D5 contra buffer borato pH = 8,8 0,1 M. Se agregó biotina en una proporción 1:40 - 1:4 (25-250 µg por mg de anticuerpo), se mezcló bien y se incubó 4 h a RT. Luego, se incubó la muestra con 20 µl de NH₄Cl 1 M por cada 250 µg de biotina utilizada durante 10 min a RT. Finalmente, se dializó la muestra para eliminar la biotina libre contra buffer PBS 1X y se almacenó a - 20 °C.

2.3.1.2. Análisis de la cinética de unión utilizando el ensayo Biacore

Los experimentos de análisis de afinidad con sensores se llevaron a cabo con el equipo IAsys Plus (sensores de afinidad, Saxon Hill, Cambridge, UK). Se acopló covalentemente la streptavidina a los chips sensores de carboximetil dextrano (sensores de afinidad) (100 µg/ml en Buffer acetato, pH = 5,0) con 5,0 ng de proteína por cubeta. Luego, se agregó a la cubeta una solución de 20 µg/ml de mAb 1D5 biotinilado en PBS durante 10 min, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando con solución de 1 M NaCl y buffer acetato 10 mM a pH = 4,5. Las reacciones de unión se llevaron a

cabo en PBS – 0,05 % Tween 20 a 25 °C, con agitación constante. Los datos se recogieron a intervalos de 0,3 seg. La unión de ligando al anticuerpo inmovilizado se monitorizó a múltiples concentraciones de ligando, que van 10 veces por debajo a 10 veces por encima de las estimaciones preliminares de constantes de equilibrio de disociación (KD) para cada reacción. El análisis cinético se realizó utilizando el software FASTFIT (Sensores de Afinidad).

2.3.2. Mapeo del epitopes de caseínas bovinas con anticuerpos monoclonales

La parte experimental que se detalla a continuación fue llevada a cabo en el laboratorio del Servei de Proteomica i Biologia Estructural (sePBioEs) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), España.

Para llevar a cabo el mapeo de epitopes de las caseínas bovinas se utilizó el mAb 1D5 y para el mapeo de epitopes de la proteína recombinante de soja Gly m 5.0101 se utilizaron los tres anticuerpos monoclonales específicos de las tres caseínas bovinas antes mencionados (1D5, 4C3 y 3B5). Las caseínas fueron digeridas con las enzimas tripsina y GluC y la proteína de soja con solamente GluC.

Se procedió con el siguiente esquema general de trabajo.

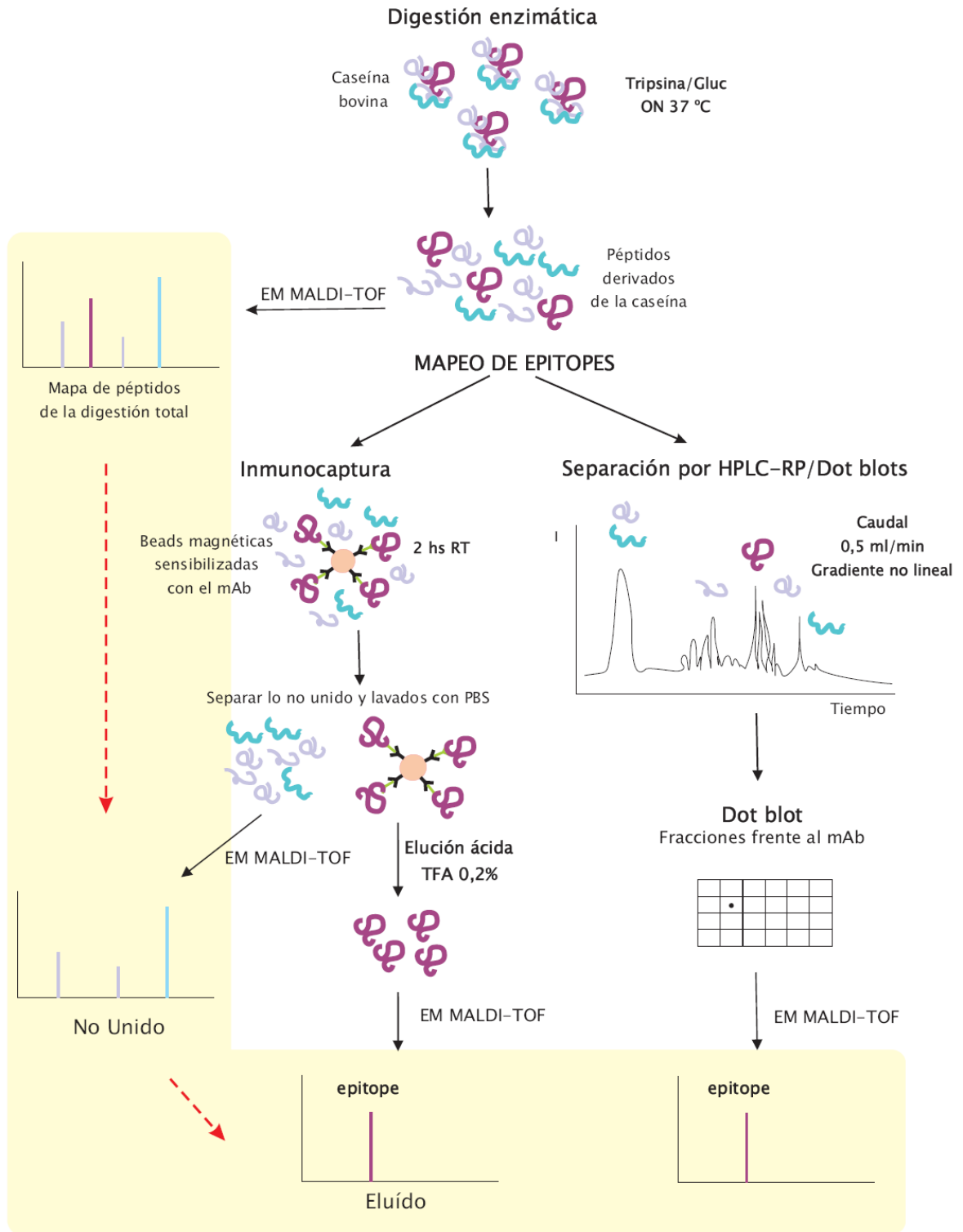


Figura 2. Esquema de la estrategia de trabajo realizada para el mapeo de epitopes de caseínas bovinas por inmunoproteómica.

2.3.2.1. Digestiones enzimáticas

Las mezclas de péptidos de las caseínas fueron obtenidas por digestión de 125 µg de las tres caseínas α -caseína, β -caseína y κ -caseína con tripsina y Glu-C (independientemente) en buffer bicarbonato de amonio 50 mM en una proporción de 20/1 y 25/1 respectivamente, ON a 37 °C. Se finalizaron las digestiones con ácido trifluoroacético (TFA) 2 % hasta acidez de la digestión con papel tornasol. Las seis digestiones obtenidas se evaluaron mediante EM MALDI-TOF.

Las mezclas de péptidos de la proteína de soja fueron obtenidas por digestión de 125 µg de la proteína recombinante de soja Gly m 5.0101 con Glu-C en buffer bicarbonato de amonio 50 mM en una proporción de 25/1 ON a 37 °C. Se finalizaron las digestiones con ácido trifluoroacético (TFA) 2 % hasta acidez de la digestión con papel tornasol. La digestión se evaluó mediante EM MALDI-TOF.

2.3.2.2. Inmunocaptura de péptidos

Siguiendo con el protocolo ya descrito por Soriani (Soriani et al., 2010) y haciendo aquellas modificaciones necesarias para optimizar las condiciones, se llevó a cabo la inmunocaptura de péptidos derivados de caseínas bovinas y de Gly m 5.0101 obtenidos por digestión enzimática del antígeno. Para capturar él o los péptidos que contienen él o los epitopes, se utilizó 25 µl de una suspensión de Dynabeads Pan IgG de ratón (esferas superparamagnéticas de poliestireno de 4,5 µm de diámetro revestidas con mAbs monoclonales humanos anti-ratón anticuerpos IgG). Las esferas se lavaron dos veces con PBS utilizando un imán para separarlas de la solución y se resuspendieron 175 µl de PBS. Se incubaron éstas con 3 µg de mAb **anti- α -caseína (1D5)** (y también con **anti- β -caseína (4C3)** y **anti- κ -caseína (3B5)** para el mapeo de la proteína Gly m 5.0101) en ensayos independientes durante 30 min a RT con rotación suave, las esferas se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso mAb. Se añadió 1 µl de mezcla de inhibidor de la proteasa (GE Healthcare), este se añadió antes de la mezcla de péptidos para evitar la posible degradación de los anticuerpos. Luego, se agregó la mezcla de péptidos correspondiente y se incubó durante 2h a RT con rotación suave. Después de la incubación, se tomó la fracción no retenida (FNR) de cada una, luego las esferas se lavaron diez veces con 1 ml de PBS, y él o los péptidos unidos se eluyeron con 50 µl de TFA 0,2 %. Las fracciones eluído (FE) y FNR se concentraron y se lavaron con ZipTips C18 (Millipore) y se eluyó en 3 µl de acetonitrilo (ACN) al 50 % y 0,1 % de TFA. Para el análisis por MALDI-TOF, 1 µl de muestra se mezcló con el mismo

volumen de matriz (solución α -ciano-4-hidroxicinámico (CAN) 0,3 mg/ml en H₂O/CAN/TFA en proporción 6/3/1), sobre una placa de MALDI (Bruker), y se dejó secar al aire a RT. El espectro de masas fue registrado en el modo de iones positivos en un espectrómetro de masas MALDI TOF UltrafleXtrem (Bruker). Todos los espectros de masas fueron calibrados externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar. Para el análisis MS/MS se utilizó the MASCOTsearch motor (Matriz de Ciencia, Londres, Reino Unido).

2.3.2.3. Separación de péptidos por HPLC de fase reversa – Dot blot

Separación

Siguiendo también el protocolo de Soriani (Soriani et al., 2010), se separaron mediante HPLC 60 μ g de cada una de las seis digestiones de las caseínas utilizadas para el mapeo. Los péptidos de cada digestión se separaron por HPLC en fase reversa en un aparato Waters Alliance: la mezcla de péptidos fue cargada en una columna Ascentis® Express HPLC C18 2,7 μ m tamaño de partícula, 160 Å diámetro de poro, 15 cm de largo y 4,6 mm de diámetro interior.

El caudal fue de 0,5 ml/min utilizando el siguiente protocolo de gradiente no lineal de ACN con TFA al 0,1 %:

1° 2 % ACN 5 min

2° 2 % a 40 % de ACN 5–40 min (35 min)

3° 40 % a 98 % ACN 40–55 min (15 min)

4° 98 % ACN 55–60 min (5 min)

Tiempo Total 60 min.

Se recogieron fracciones de 1 ml/min (60 tubos) para el caso de las digestiones con tripsina y 2 ml/min para el caso de las digestiones con GluC (30 tubos), luego cada fracción recogida se secó al vacío (SpeedVac) y se redisolvió en 10 μ l de TFA 0,1 %.

Dot blots

A las membranas de PDVF (Polivinildenedifluoruro) se les realizó con lápiz un grillado de manera de poder sembrar cada fracción de cada digestión conteniendo péptidos por cuadrado (una membrana para cada digestión separada mediante HPLC y por triplicado para ser enfrentada con

cada mAb anti-caseína, 18 membranas en total), las membranas así resultantes fueron pre-tratadas con 1 % de glutaraldehído durante 10 min. Se sembró 1 µl de cada fracción de manera puntual en la membrana, la cual se bloqueó con T-TBS con 3 % SFB ON a 4 °C. Las membranas se incubaron durante 1h a RT y luego 1h a 37 °C con los mAb anti-caseínas (1D5, 4C3 y 3B5), seguido del anticuerpo secundario monoclonal específico anti-IgG de ratón conjugado con FAL (Sigma) durante 1 h a 37 °C. Las membranas fueron reveladas con nitro azul tetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato. Las fracciones positivas se analizaron por EM MALDI TOF-TOF UltrafleXtrem (Bruker).

2.4. MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA

Protocolos de Inmunización

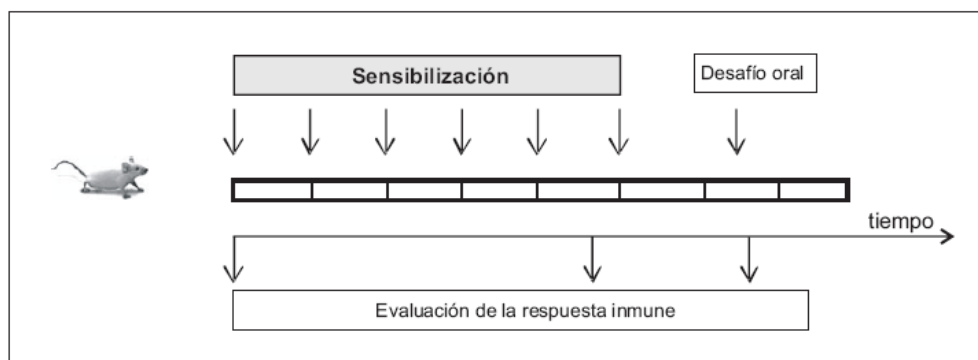


Figura 3. *Esquema general de inmunización empleado en los protocolos desarrollados en el modelo murino de ALV.*

2.4.1. Plan de sensibilización de los ratones

Se emplearon ratones de 4 á 6 semanas de edad de la cepa BALB/c para ser sensibilizados por vía intragástrica (ig). El protocolo de sensibilización se llevó a cabo como se describió previamente (Smaldini et al., 2012). Brevemente, los ratones fueron agrupados en dos lotes de 8 animales cada uno según el tratamiento a recibir, a cada animal del grupo de sensibilizado se le administraron 6 dosis ig semanales (una dosis por semana durante 6 semanas) de PLV (20 mg/dosis), además de la toxina del cólera (TC) (10 mg/dosis) (Sigma Aldrich, EE.UU.) en un volumen final de 200 µl de buffer de bicarbonato 3 % pH = 8 (**grupo sensibilizado**), a cada animal del grupo control se les administró con la misma frecuencia sólo PLV (20mg/dosis) en bicarbonato (**grupo control**). Los

ratones se mantuvieron en ayunas durante 2 h antes y después de la sensibilización, y 30 min antes de la inmunización se les administró 200 µl solución de bicarbonato de sodio 3 % pH = 8 para disminuir la acidez estomacal.

En todos los casos los ratones BALB/c libres de patógenos (Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLP) fueron mantenidos en el bioterio del LISIN con fotoperíodo natural, en ambiente con temperatura de entre 18 °C y 24 °C, con disponibilidad de agua y alimento estériles *ad libitum*. El alimento balanceado usado (Cooperación, para rata y ratón, Cooperativas Argentinas) poseía proteína bruta (mínimo) 10 %, extracto etéreo (mínimo) 5 %, fibra cruda (máximo) 6 %, minerales totales (máximo) 10 %, calcio 1,3 %, fósforo (disponible) 0,8 %, humedad (máxima) 12 %. Este alimento no contenía en su composición PLV.

2.4.2. Plan de tolerización de los ratones

Con el objetivo de desarrollar una inmunoterapia oral basada en la inducción de tolerancia (inducción de tolerancia oral antígeno específica y de reactividad cruzada) a fin de disminuir la respuesta alérgica a PLV, se llevó a cabo un protocolo al que denominamos de tolerización, para ello se administraron dosis bajas y diarias del antígeno (proteína recombinante P34) previo al plan de sensibilización (PLV + TC).

Se trabajó con ratones BALB/c de 5 semanas los cuales fueron agrupados en cuatro lotes de 6 animales cada uno según el tratamiento a recibir. Primeramente a 2 lotes, se les administró a cada uno por vía sublingual durante 5 días con una frecuencia diaria de 20 µg de PLV para el **grupo tolerizado con PLV (Tol-PLV)** y 20 µg de la proteína recombinante P34 para el **grupo tolerizado con P34 (Tol-P34)**. Luego se llevó a cabo el protocolo de sensibilización como se describió previamente (Smaldini et al., 2012). Los ratones recibieron 6 dosis ig semanales de PLV (20 mg/dosis), además de la toxina del cólera (TC) (10 mg/dosis) (Sigma Aldrich, EE.UU.) en un volumen final de 200 µl de buffer de bicarbonato 3 % pH = 8 (**grupo sensibilizado** y ambos **grupos tolerizados**), o PLV en bicarbonato para el grupo de animales control (**grupo control**). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 2 h antes y después de la sensibilización, y 30 min antes de la inmunización se les administró 200µl solución de bicarbonato de sodio 3% pH=8 para disminuir la acidez estomacal.

2.4.3. Evaluación de la respuesta inmune

Pruebas *in vivo*

Desafío oral

Una vez concluido el plan de inmunización los animales fueron desafiados con el antígeno en cuestión (PLV, PS u OVA) con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos como consecuencia de la sensibilización previa. Para esto se les administró únicamente el antígeno por vía ig. Los síntomas clínicos indicadores de la inducción de reacciones mediadas por IgE aparecen entre 15 y 30 min posteriores a la exposición al antígeno y alcanzan un pico aproximadamente 45 min después de la aparición del primer síntoma. Los animales fueron observados durante la hora y media siguiente al desafío oral por distintos observadores. Como se describe más adelante a cada signo clínico se le asignó un índice clínico de manera de semi-cuantificar la respuesta clínica al desafío oral.

Desafío sublingual

Una vez concluido el plan de inmunización los animales fueron desafiados con el antígeno en cuestión, proteínas recombinantes: P34 10 µg, P28 10 µg y MBP 10 µg y frente a OVA 10 µg y β-lactoglobulina (β-Lg) 5 µg con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos como consecuencia de la sensibilización previa. Para esto se les administró únicamente el antígeno por vía sublingual. Los síntomas clínicos indicadores de la inducción de reacciones mediadas por IgE aparecen entre 15 y 30 min posteriores a la exposición al antígeno y alcanzan un pico aproximadamente 45 min después de la aparición del primer signo. Los animales fueron observados durante la hora y media siguiente al desafío oral por distintos observadores. Como se describe más adelante a cada signo clínico se le asignó un índice clínico de manera de semi-cuantificar la respuesta clínica al desafío.

2.4.3.1. Evaluación de los signos clínicos inducidos post-Desafío

Para la evaluación de los signos clínicos, se definió una escala cuantitativa de "índice" de síntomas, asignándole de manera arbitraria un puntaje a cada signo clínico inducido en función de la intensidad de los mismos. Los signos se observaron por 2 investigadores independientes. Se califican con una escala de 0 a 5, de acuerdo a los siguientes criterios: 0 = sin síntomas, 1 =

rascarse y frotarse alrededor de la nariz y la cabeza, enrojecimiento en la misma zona 2 = hinchazón alrededor de los ojos y la boca, diarrea, pelo erizado, reducción de actividad, y/o disminución de la actividad con una tasa de aumento de la frecuencia respiratoria, 3 = Respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y la cola; 4 = ausencia de actividad después de un estímulo, o temblores y convulsiones, y 5 = muerte. Luego de asignados los índices clínicos se considera el valor más alto alcanzado por cada animal de cada uno de los lotes.

2.4.3.2. Prueba cutánea (PC)

Brevemente, esta prueba evalúa la presencia de IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel, para lo cual se inocula el antígeno por vía subcutánea (sc), y Azul de Evans en forma intravenosa (iv). Si el animal sensibilizado tiene anticuerpos IgE específicos en las células, la presencia del Ag específico induce la activación celular con la consiguiente liberación de mediadores pro-inflamatorios pre-formados en los gránulos citoplasmáticos. La zona inflamada se evidencia experimentalmente mediante la extravasación del Azul de Evans al tejido circundante (coloración azul de la piel). Este resultado es indicador de un proceso mediado por IgE sólo si la extravasación del colorante se produce a los minutos de inoculado el Ag por vía sc.

Un día antes de la prueba los ratones fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo. Posteriormente se inoculó por vía sc 50 µl de la solución del antígeno a evaluar, control negativo (solución fisiológica (SF) o MBP (10 µg)) o control positivo (histamina). La cantidad de antígeno a utilizar se determinó por titulación, encontrándose que para este modelo 4 mg/ml de PLV y 8 mg/ml de SP son las concentraciones óptimas que producen reacción positiva en animales sensibilizados, y negativa en los lotes control. Inmediatamente después de la inyección sc se procedió a la inoculación iv de 100 µl de Azul de Evans al 0,25 %. También se enfrentó a los ratones a las siguientes proteínas recombinante: P34 (10 µg), P28 (10 µg) y MBP (10 µg).

Luego de 15–30 min se observó la aparición de una roncha azul en la zona de inoculación que se consideró positiva cuando el tamaño del diámetro fue mayor a 3 mm.

Ensayos *in vitro*

2.4.3.3. Evaluación de la respuesta inmune humoral

Se midieron los niveles séricos de distintos isotipos de anticuerpos específicos para PLV, PS, P34, P28 y MBP mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos desarrollados en nuestro laboratorio (EAST y ELISA indirecto), en el suero proveniente de los animales de cada grupo.

Determinación en suero de IgE específica por EAST

La determinación sérica de anticuerpos IgE específicos se realizó mediante EAST para lo cual se preparó la fase sólida según Ceska (Ceska, 1981).

Activación de papeles con CNBr: 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 CNBr en 500 ml de agua destilada, bajo campana. Se llevo a pH = 10,5 con NaOH 1 M. Luego se realizaron lavados sucesivos utilizando las siguientes soluciones: NaHCO₃ 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.

Reacción inmunológica: 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, 0,5 mg/ml de PS, o 200 µg/ml P34, 200 µg/ml P28 y 100 µg/ml MBP en buffer 0,1 M carbonato/bicarbonato pH = 9.4 según el método de Ceska. Se incubaron los papeles con las proteínas ON a RT, luego estos fueron lavados con buffer de sensibilización (buffer carbonato pH = 9.4) y bloqueados con una solución 0.05 M de etanolamina durante 2 h con agitación a RT. Los papeles sensibilizados y bloqueados se guardaron en la heladera en PBS con azida sódica hasta su utilización.

Cada disco de celulosa sensibilizado y bloqueado se incubó con 50 µl de suero de ratón sin diluir durante 16 h a 4 °C. Luego de realizar los lavados, los papeles se incubaron con 50 µl del anticuerpo biotinilado anti-IgE de ratón (BD Pharmigen), llevado a una concentración de 8 µg/ml con diluyente SE 3 % en solución fisiológica (SE 3 % v/v en SF), durante 5 h a 4 °C. Se lavaron los discos nuevamente y se incubaron con streptavidina conjugada a FAL (SIGMA, 1:3000) durante 30 min a 37 °C. Finalmente se agregó 200 µl de solución de sustrato PNPP, deteniéndose la reacción

20 min más tarde con 100 µl de EDTA 0.1 M. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de ELISA (Sirios SAECS, Radim Company, Italia).

Determinación en suero de IgG1 e IgG2a específica por ELISA indirecto

Los isotipos de IgG fueron analizados por ELISA, para lo cual se sensibilizaron placas de microelisa de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 1 µg/fosa de PLV o de PS 1 µg/fosa de P34, 1 µg/fosa de P28 o 0,5 µg/fosa de MBP diluidos en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH = 9.4). Se bloqueo con SE al 5 % en SF y se incubó con 100 µl de los sueros diluidos 1:200 en diluyente 1h a 37 °C. Luego se incubó con el anticuerpo secundario específico correspondiente obtenido en oveja (Dako, 1:2000), durante 1h a 37 °C. Finalmente se empleó un suero obtenido en cabra específico de gamaglobulina de oveja conjugado con HRP (Jackson, 1:10000) durante 1 h a 37 °C. Se agregaron 100 µl de solución de sustrato 1 mg/ml de OPD y 0,1 µl/ml de 30 % H₂O₂ en buffer citrato 0.1 M pH = 5.0, se detuvo la reacción a los 15 min con 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Se midió DO a 492 nm.

2.4.3.4. Determinación de los niveles plasmáticos de histamina por ELISA

Se determinaron los niveles plasmáticos de histamina utilizando un ELISA competitivo directo de origen comercial (Immunotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Treinta minutos después del desafío oral con PLV o PS, se recolectó sangre del plexo retro-orbital en tubos conteniendo 20 µl de heparina sódica 5000 U/ml, Abbott) diluida 1/5 en SF, o 20 µl de EDTA 0.25 M. Para minimizar la degradación de la histamina las muestras se colocaron en baño de hielo inmediatamente después de la extracción, se separó el plasma de las células por centrifugación a 900 g durante 10 min a 4 °C dentro de los 20 min que siguen a la extracción, se recolectaron los 2/3 de la parte superior del plasma y se conservó a - 80 °C hasta su análisis.

Brevemente, el ensayo consiste en mezclar 50 µl de las muestras de plasma diluidas o de los controles (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm de histamina) previamente acilados con el reactivo provisto por el kit para aumentar la estabilidad de la histamina, con 200 µl del conjugado (histamina conjugada con FAL) en los pocillos sensibilizados con anticuerpos anti-histamina. La placa se incubó ON a 4 °C, luego de los lavados correspondientes se agregaron 200 µl del sustrato/cromógeno PNPP, y se detuvo la reacción a los 30 min con NaOH 1 N. Se leyó DO a 405 nm en lector de microplacas. A partir de los valores de DO de los estándares, se construyó una

curva de calibración DO 405 nm vs. concentración de histamina (nM), que permitió calcular la concentración de histamina en las muestras problema, mediante la aplicación de la función matemática logit p.

2.4.3.5. Evaluación de la respuesta inmune celular

Dosaje de citoquinas

Se evaluó la inducción de linfocitos T específicos durante la sensibilización mediante ensayos de proliferación celular y secreción de citoquinas a partir de células aisladas de animales provenientes de los distintos lotes. Para tal fin se extrajo el bazo de los ratones del **grupo control**, del **grupo sensibilizado** y de los **grupos tolerizados**, el día posterior al desafío oral con PLV. Los tejidos fueron disgregados, como se describe posteriormente, y se realizó recuento celular empleando Tripan blue para cuantificar células viables. Los cultivos celulares se realizaron en placas de cultivo celular de 48 fosas (Cell Star R, GBO) y empleando como medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5 % y antibióticos. Se optimizó para cada tipo de tejido el número de células a incubar, concentración de antígenos y tiempo de cultivo. De esta manera, se colocaron 500 µl de la suspensión celular 4×10^6 células/fosa y 500 µl de una solución 2X en RPMI de los siguientes estímulos antigénicos: PLV (350 µg/final por fosa), PS (200 µg/final por fosa), P34 (15 µg/final por fosa), P28 (15 µg/final por fosa) o MBP (7,5 µg/final por fosa) según la experiencia. Como controles del ensayo se empleó concanavalina A (Con A) 5 µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo.

Luego de 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ 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-γ (Mouse IFN-γ CytoSet™, BioSource, Invitrogen), interleuquina-5 (Mouse IL-5 CytoSet™, Invitrogen) e interleuquina-13 (IL-13 R&D Systems, UK). Se introdujeron algunas modificaciones técnicas al protocolo indicado por el fabricante para optimizar cada ensayo, en función de las concentraciones de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos. Brevemente, este inmunoensayo consistió en sensibilizar las placas de ELISA (NUNC, MaxiSorp) con 100 µl/fosa del anticuerpo de captura correspondiente a cada citoquina, en una concentración de 1,25 µg/ml para IL-5 e IFN-γ, y 4 µg/ml de IL-13 en buffer de sensibilización pH = 9.0, ON a 4 °C. Luego se realizó el bloqueo con 300 µl/fosa de

“Buffer Assay” (PBS con BSA 0.5 %, pH = 7.4) durante 1 h a 37 °C, y luego de los lavados correspondientes, se incubaron con 100 µl/fosa de sobrenadante de cultivo; paralelamente se procesaron los estándar de citoquinas de cada kit para construir la curva de calibración, junto con 50 µl/fosa del “anticuerpo de detección” (anti-IFN-γ-biotinilado 0,125 µg/ml o anti-IL-5 biotinilado 0,10 µg/ml o anti-IL-13-biotinilado 0,0625 µg/ml), ON a 4 °C. Finalmente, se realizó una incubación de 1 h a 37 °C con streptavidina-HRP 0,15 µg/ml. Se empleó OPD-H₂O₂ como sustrato cromógeno y luego de detener la reacción con H₂SO₄ 2 N se midió la densidad óptica a 492 nm. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se obtuvo de la curva de calibración (DO vs. concentración de citoquinas en pg/ml).

Proliferación celular con CFSE

Los cultivos celulares se realizaron en placas de cultivo celular de 96 fosas (Cell Star R, GBO) y empleando como medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5 % y antibióticos (idem a lo descrito anteriormente para la medición de citoquinas). Se optimizó para cada tipo de tejido el número de células a incubar, concentración de antígenos y tiempo de cultivo. De esta manera, se colocaron 100 µl de la suspensión celular 4x10⁶ células/ml y 100 µl de una solución 2X en RPMI de los siguientes estímulos antigénicos: P34 (5 µg/final por fosa), NT-P34 (5 µg/final por fosa) o CT-P34 (5 µg/final por fosa) según la experiencia. Como controles del ensayo se empleó concanavalina A (Con A) 5 µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo.

Luego de 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ se levó a cabo la medida de proliferación celular con CFSE. Rápidamente, se incubaron las células con una concentración final de CFSE 2M) durante 30 minutos a 37 °C. Las células luego se lavaron al menos 2 veces con PBS y se resuspendieron en el volumen deseado para ser analizadas con el citómetro de flujo.

Marcación intra-citoplasmática para la determinación de linfocitos Treg

A partir de la suspensión de esplenocitos, células de lámina propia, células de los ganglios mesentéricos ó células de ganglios sublinguales provenientes de ratones pertenecientes a los grupos control, sensibilizado, tolerizado con PLV y tolerizado con P34; se realizaron cultivos celulares en placas de 96 fosas (Cell Star[®], GBO), colocando 100 µl de la suspensión celular (2x10⁵ células/fosa) y 100 µl de solución 2X en RPMI de PLV 2000 µg/ml). Como controles del

ensayo se empleó Con A (5 µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo. Las últimas 4hs de incubación se realizaron en presencia de Brefeldina A (inhibidor del transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi) a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con buffer staining (PBS, 2mM EDTA, 2% de SFB), se bloquearon los receptores Fc con Fc Block o suero de ratón normal (SRN) durante 15 minutos a 4°C, para luego detectar las proteínas de superficie de interés con los anticuerpos específicos fluoresceinados, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer fijación/permeabilización (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial para tinción intra-citoplasmática. Brevemente, una vez fijadas y permeabilizadas las células, se incubaron con el anticuerpo anti-citoquina específico conjugado a un fluorocromo. Las células fueron analizadas por citometría de flujo multiparamétrica empleando un citómetro Becton Dickinson Calibur. Se hizo un gate en la región de los linfocitos y se analizó la presencia de Foxp3 en células CD4⁺ y CD8⁺.

2.4.4. Análisis estadístico

Los gráficos y el análisis de datos de los diferentes ensayos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (San Diego California USA). Los análisis realizados fueron Anova de dos vías, seguidos del test de Bonferroni para discriminar las diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos experimentales.

También se aplicó el test de Student pareado, no pareado y no paramétrico (Mann-Whitney) según los datos a analizar.

2.5. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

2.5.1. Análisis de reactividad cruzada utilizando el servidor SDAP

Para determinar si las proteínas de soja Gly m Bd 30K y Gly m Bd 28K son potencialmente de reactividad cruzada se utilizó la bases de datos SDAP: Structural Database of Allergenic Proteins (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>) diseñada para identificar alergenos de reactividad cruzada basándose en la similitud en las propiedades fisicoquímicas, que es un criterio más amplio que la búsqueda de identidad o de substituciones conservadas (aminoácidos del mismo grupo: polares, carga positiva, negativa, no polares e hidrofóbicos). Esta base emplea un

parámetro denominado PD (por distancia de propiedades), que se determina asignando a cada aminoácido un descriptor E1-E5 que proviene de un análisis multidimensional de 237 propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos (Venkatarajan and Braun, 2001). Cada secuencia estudiada es convertida en 5 matrices en base a estos descriptores y es comparada con las matrices correspondientes de las proteínas alergénicas del SDAP (Ivanciuc et al., 2003). Este servidor hace una alineación completa utilizando el programa FASTA para el alineamiento y cuanto más pequeño es el valor de PD más similares son las proteínas.

2.5.2. Predicción Computacional de epitopes de reactividad cruzada

Para llevar a cabo un análisis secuencial de Gly m bd 30K (P34) y de Gly m bd 28K (P28), se extrajeron de la base de datos Genbank las secuencias de estas proteínas y se alinearon empleando el servidor ClustalW2 (utilizando una matriz BLOSUM con el resto son las condiciones default (GAP penalty: Gap open = 10 y GAP extensión = 0,1)) (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) con los péptidos de caseína bovina (α S1, α S2, β y κ) descriptos como epitopes T y/o B (isotipos IgG e IgE) obtenidos de la base de datos IEDB "Immune Epitope Database and Analysis Resource" (<http://www.immuneepitope.org/>). Los 73 péptidos de caseínas bovinas descriptos al 1 de junio de 2010 en la base de datos empleados en los alineamientos se listan en la sección **gráficos y tablas adicionales**.

Con los resultados de estos alineamientos construimos gráficos que muestran a lo largo de cada secuencia de las proteínas de soja la distribución de hits o puntos en los que los aminoácidos de los péptidos de caseínas bovinas y la proteína de soja muestran similitudes. Rápidamente, para construir estos gráficos se alinearon de a uno los 73 epitopes de las caseínas con la proteína de soja (P34 ó P28), luego analizando los alineamientos se construyó un gráfico de distribución de hits en base a la acumulación de aminoácidos consenso en cada posición a lo largo de la secuencia de la proteína de soja (en las posiciones que los alineamientos tienen un aminoácido conservado (identidad) se le asignó **puntuación = 3**, cuando los aminoácidos alineados mantenían propiedades muy similares **puntuación = 2** (puntuación > 0,5 en las matrices de Gonnet o PAM 250) y cuando los aminoácidos alineados mostraban propiedades débilmente similares **puntuación=1** (puntuación = <0,5 en las matrices Gonnet o PAM 250)).

2.5.3. Modelado por homología

La secuencia de la proteína Gly m bd 30K (P34) (gi 195957142) fue obtenida a partir de la base de datos GeneBank. Utilizando esta secuencia (sin el péptido señal) como blanco se realizó la búsqueda en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2002). Elegimos utilizar como molde (template) la estructura PDB perteneciente a Carica papaya (Papaya) (Cadena A, gi 2098464 | AP | 1PCI | A). Ambas proteínas pertenecen a la familia de las papaínas y muestran un 39% de similitud secuencial, además poseen la misma función molecular (con actividad endopeptidasa, para el caso de P34 ya que no se ha demostrado que sea funcional). La secuencia molde es más corta que la secuencia de la proteína P34 por lo que el modelado no abarca toda la proteína quedando así del extremo amino terminal 14 aas y del extremo carboxilo terminal 25 aas, sin modelar. La comparación de ambas secuencias se realizó utilizando el servidor FFAS03 (utiliza el método de comparación profile - profile), el alineamiento se muestra en la **figura 10** en la sección **gráficos y tablas adicionales**. Luego se generó un modelo tentativo de la Gly m Bd 30K con el programa Modeller 9v7 (Pieper et al., 2002), finalmente se modelaron los loops (DOPE) y se evaluaron los modelos generados utilizando los programas PROSA y VERIFY 3D, en base a los resultados obtenidos se eligió el mejor modelo. Para representar la estructura se empleó el programa PyMOL 0.99rc6 (www.pymol.org).

2.5.4. Accesibilidad al solvente

Para estimar cuales residuos se encuentran accesibles al solvente se utilizó el programa DSSP (Kabsch and Sander, 1983) (*define secondary structure of proteins*) que permite, empleando la estructura PDB de la proteína, estimar el numero de moléculas de solvente (agua) ACC que se encuentran en contacto con cada residuo aminoacídico, este dato luego se relativiza al área de la superficie que ocupa cada aminoácido (SA) (Chothia, 1976) (calculada teniendo como referencia cuando el aminoácido X se encuentra en el tripéptido Gly-X-Gly, para tener así el dato de RSA (relative solvent accessibility). Luego de tener los valores de RSA se tomo como valor umbral arbitrario como <20% para desestimar los residuos “completamente enterrados” o no accesibles al solvente.

2.5.5. Predicción computacional de epitopes B

Se recurrió al servidor Disco Tope 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) para predecir epitopes B (Haste Andersen et al., 2006). Se representaron en la estructura PDB de la proteína mediante la esquematización de superficie los epitopes B propuestos.

2.5.6. Análisis secuencial y comparación de la composición aminoacídica

Se construyeron tres grupos de péptidos: un grupo de péptidos representado por secuencias de los péptidos que dieron positivos en el mapeo con péptidos sintéticos solapados de P34 (péptidos P34 positivos), un segundo grupo formado por péptidos no reactivos en el mismo mapeo (péptidos P34 negativos), y el tercer grupo compuesto por péptidos de caseínas provenientes de la base de datos péptidos que se alinearon en las zonas I y II de P34 (caseínas positivos). Luego, se compararon las composiciones de aminoácidos de los tres grupos.

**CAPÍTULO I – IDENTIFICACIÓN DE EPITOPES DE
REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE PROTEÍNAS LECHE DE
VACA Y SOJA EMPLEANDO TÉCNICAS DE
INMUNOPROTEÓMICA**

1. Generalidades

La prevalencia de las enfermedades alérgicas alcanza actualmente proporciones epidémicas en ciertas poblaciones y para ciertos sistemas proteicos (Linhart and Valenta, 2012). Aunque se han descrito cientos de moléculas capaces de inducir una respuesta inmune inapropiada – *la reacción alérgica* – se ha tratado de esclarecer cuáles son las características estructurales y funcionales que determinarían la capacidad de estas moléculas de interactuar y activar mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa. El conocimiento alcanzado en este campo es escaso y sólo para algunos alérgenos se han identificado porciones de la molécula capaces de activar la inmunidad innata (capacidad adyuvante) y la inmunidad adaptativa (epitopes B y T) (Wills–Karp et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de la leche de vaca y la soja han sido incluidos dentro del “grupo de los 8” por su importancia como alérgenos alimentarios. En particular la leche de vaca es actualmente el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones (Järvinen and Chatchatee, 2009), incluyendo nuestro país (Orsi et al., 2009). La alta exposición y la temprana edad de los pacientes parecen ser los dos principales factores que determinan su alergenidad, junto a la elevada inmunogenicidad de sus proteínas, especialmente las caseínas (Docena et al., 1996). Con respecto a las proteínas de soja, dado el elevado valor nutritivo de las mismas, su aceptabilidad por los pacientes y su reducido costo, determinan que las formulaciones a base de estas proteínas sean frecuentemente utilizadas como sustituto lácteo en el tratamiento de los pacientes alérgicos a leche de vaca con edades comprendidas entre los 6 meses y 2 años de edad. Sin embargo, son numerosos los trabajos que describen una intolerancia clínica al inicio del tratamiento (Ahn et al., 2003; Katz et al., 2008; Klemola et al., 2005; Szaflarska–Szczepanik and Gasiorowska, 2003; Zeiger et al., 1999). Esta situación también ha sido descrita en pacientes de nuestro país (Orsi et al., 2009), y complica marcadamente el tratamiento, dado que el médico debe utilizar un nuevo sustituto lácteo, y las opciones comerciales son muy restringidas. Por otro lado, las proteínas de la soja son muy utilizadas por la industria alimenticia y la no alimenticia, y esto ha determinado que la población en general se encuentre altamente expuesta a estos alérgenos. Llamativamente, no se ha observado hasta el momento que la alergia alimentaria a la soja sea un problema

sanitario importante, inclusive en niños durante la primera infancia, etapa en la cual se observa la mayor incidencia de las alergias alimentarias.

Las caseínas bovinas representan el 80% de las proteínas de la leche de vaca y están constituidas por cuatro moléculas: α S1-, α S2-, β - y κ -caseína cuya abundancia en la leche vacuna es del 32%, 10%, 28% y 10% respectivamente. Las caseínas han sido informadas como el principal componente alergénico de la leche de vaca (Docena et al., 1996). Las caseínas son proteínas fosforiladas, con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, que forman miscelas en suspensión con poca estructura terciaria. Además, la α S1-caseína no es sintetizada por la glándula mamaria humana y este puede ser un factor importante que determina su elevada inmunogenicidad y alergenicidad (Wal, 2004). Para el estudio de la alergia a leche de vaca en nuestro laboratorio se obtuvieron anticuerpos monoclonales del isotipo IgG1 específicos de caseínas bovinas (mAb-CB) (Docena et al., 2002) los cuales han sido empleados en este trabajo como una herramienta inmunológica para la identificación de proteínas de soja de reactividad cruzada (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002).

Teniendo en cuenta la complejidad de las alergias mediadas por IgE y la necesidad de contar con herramientas que permitan comprender las bases moleculares y celulares de los mecanismos subyacentes en este capítulo nos propusimos identificar epitopes de reactividad cruzada en proteínas de leche y soja. Inicialmente demostramos que las proteínas mayoritarias de la semilla de soja, las globulinas 7S y 11S, son reconocidas por los anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales específicos de caseínas bovinas obtenidos en conejos y cabras (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002). Posteriormente, evidenciamos experimentalmente la importancia *in vivo* de este reconocimiento inmunológico, empleando un modelo murino de alergia a proteínas de leche bovina (Smaldini et al., 2012).

Sobre la base de estos resultados decidimos profundizar en las bases moleculares que gobiernan este fenómeno. El estudio e identificación de epitopes inmunodominantes (B y/o T) lineales y conformacionales puede ser abordado mediante la aplicación de diferentes técnicas. Esta información resulta relevante al momento de caracterizar la inmunogenicidad de los alergenicos para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a la inmunomodulación del sistema inmune o la instauración de los mecanismos de tolerancia que permitan corregir la respuesta inmune inapropiada instaurada en el paciente. Para este fin el empleo de péptidos de baja o

nula capacidad de activación de basófilos y mastocitos (a través de epitopes B), pero con capacidad de activación de linfocitos T (a través de epitopes T) permite plantear terapias correctivas con una reducida capacidad de generación de reacciones adversas, las cuales constituyen la principal causa de fracaso o abandono del tratamiento (Linhart and Valenta, 2005). Para poder elegir un candidato peptídico a incluir en una estrategia terapéutica de este tipo (inmunoterapia) es necesario caracterizar los epitopes lineales en las proteínas alergénicas. Para el mapeo de epitopes, en general se suele recurrir al uso de péptidos obtenidos por síntesis química (por ejemplo SPOT síntesis) (Carter and Loomis-Price, 2004; Reineke et al., 2001), o de péptidos obtenidos en forma recombinante empleando bacteriófagos que expresan bibliotecas aleatorias de péptidos de 7–12 residuos de aminoácidos (*phage display de péptidos*) (Scott, 1992; Scott and Smith, 1990). También se suele recurrir a la expresión recombinante de fragmentos polipeptídicos de mayor longitud lo que permite estudiar epitopes lineales y conformacionales (Xia et al., 2010). El principal inconveniente en el desarrollo de estas técnicas suele ser su elevado costo y tiempo que insumen. Por esta razón para la identificación de los epitopes de reactividad cruzada decidimos recurrir a tecnologías de alto rendimiento como es la proteómica funcional, en una de sus disciplinas conocida como *inmunoproteómica*. Este término es utilizado para describir el empleo de técnicas de espectrometría de masas (EM) para estudiar interacciones de péptidos con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o con anticuerpos. Teniendo en cuenta la alta sensibilidad, la alta precisión en la determinación de las masas moleculares y la alta capacidad de análisis las técnicas de espectrometría de masas ocupan actualmente un lugar destacado en la identificación de moléculas biológicas, en el estudio de los mecanismos básicos inmunológicos, y en el desarrollo y seguimiento de tratamientos profilácticos y terapéuticos (Koehler et al., 2011; Lillehoj et al., 2007; Soriani et al., 2010).

De los métodos de espectrometría de masas se optó por emplear ionización MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* o desorción/ionización láser asistida por matriz) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga (m/z) tras ser acelerados en un campo eléctrico, método conocido como MALDI-TOF. Esta metodología es rápida (menos de 1 min para determinar masas moleculares de péptidos), sensible (detecta cantidades inferiores a 1 pmol) y precisa para la

determinación de la masa molecular, lo que permite una rápida identificación de proteínas proveniente de sus fuentes naturales y realizar estudios de las modificaciones postraduccionales (proteólisis, glicosilación, fosforilación y oxidaciones) sufridas por las proteínas. Esta técnica combinada con cromatografía de inmovilización de anticuerpos ha sido aplicada al mapeo de epitopes, habiéndose desarrollado variantes metodológicas para facilitar este tipo de análisis (Lu et al., 2009; Suckau et al., 1990; Zhao and Chait, 1994).

En este capítulo hemos aplicado esta metodología para el mapeo de epitopes lineales. Básicamente consiste en hidrolizar la molécula blanco empleando proteasas de distinta especificidad, seguido de una incubación con los anticuerpos (en nuestro caso los mAb-CB) cuyos epitopes específicos se desea mapear. Posteriormente se aíslan los complejos anticuerpo-péptido empleando esferas magnéticas y se analiza la composición de los péptidos capturados por desorción de su complejo a los anticuerpos. La comparación de los péptidos antes y después de la captura inmunológica permite la identificación de él o los péptidos reconocidos por el anticuerpo (Koehler et al., 2011; Soriani et al., 2010). Aquí se emplearon los anticuerpos monoclonales específicos de las distintas caseínas bovinas, las caseínas purificadas y una proteína recombinante de soja (Gly m 5.0101). Una vez identificados los epitopes reactivos los resultados de inmunoproteómica fueron complementados con biología computacional estructural para comprender las características estructurales de caseínas bovinas y de las proteínas de soja responsables de la reactividad cruzada.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos

El objetivo del presente capítulo es la identificación y caracterización de epitopes B de reactividad cruzada entre caseínas bovinas y globulinas 7S (β -conglucinininas) de soja empleando herramientas proteómicas. La caracterización *in vitro* de estos epitopes aportará información relevante para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la intolerancia IgE-mediada que se observa en pacientes alérgicos a la leche de vaca, tratados con fórmulas a base de proteínas de soja, y que no están previamente sensibilizados a la soja (ver sección 3.2. Prevalencia de las alergias de leche de vaca y a soja en Introducción).

La hipótesis general del trabajo se basa en la existencia de epitopes lineales compartidos entre los principales alérgenos de ambos sistemas, responsables del entrecruzamiento de los anticuerpos IgE específicos presentes en la superficie de los mastocitos, basófilos y eosinófilos de los pacientes alérgicos a la leche bovina, con la consiguiente activación de las mismas y la generación de un foco inflamatorio. El empleo de un panel de anticuerpos monoclonales específicos de caseínas permitirá identificar secuencias aminoacídicas comunes entre ambos sistemas y de esta manera mapear la presencia de epitopes B de reactividad cruzada. Además el conocimiento de la secuencia peptídica de estos epitopes B compartidos permitirá identificar motivos estructurales comunes entre estas proteínas que no guardan relación filogenética.

Con la finalidad de identificar los epitopes se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Seleccionar los anticuerpos monoclonales específicos contra caseínas bovinas a ser utilizados.
- ✓ Emplear métodos de inmunoproteómica de alto rendimiento para identificar los epitopes presentes en las caseínas bovinas y en la proteína de soja Gly m 5.0101 que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales seleccionados.
- ✓ Identificar los epitopes responsables de la reactividad cruzada entre proteínas de soja y caseínas bovinas y analizar su composición aminoacídica.

3. Diseño experimental

En el siguiente esquema se muestra el diseño experimental aplicado al análisis de epitopes en caseínas bovinas y proteínas de soja.

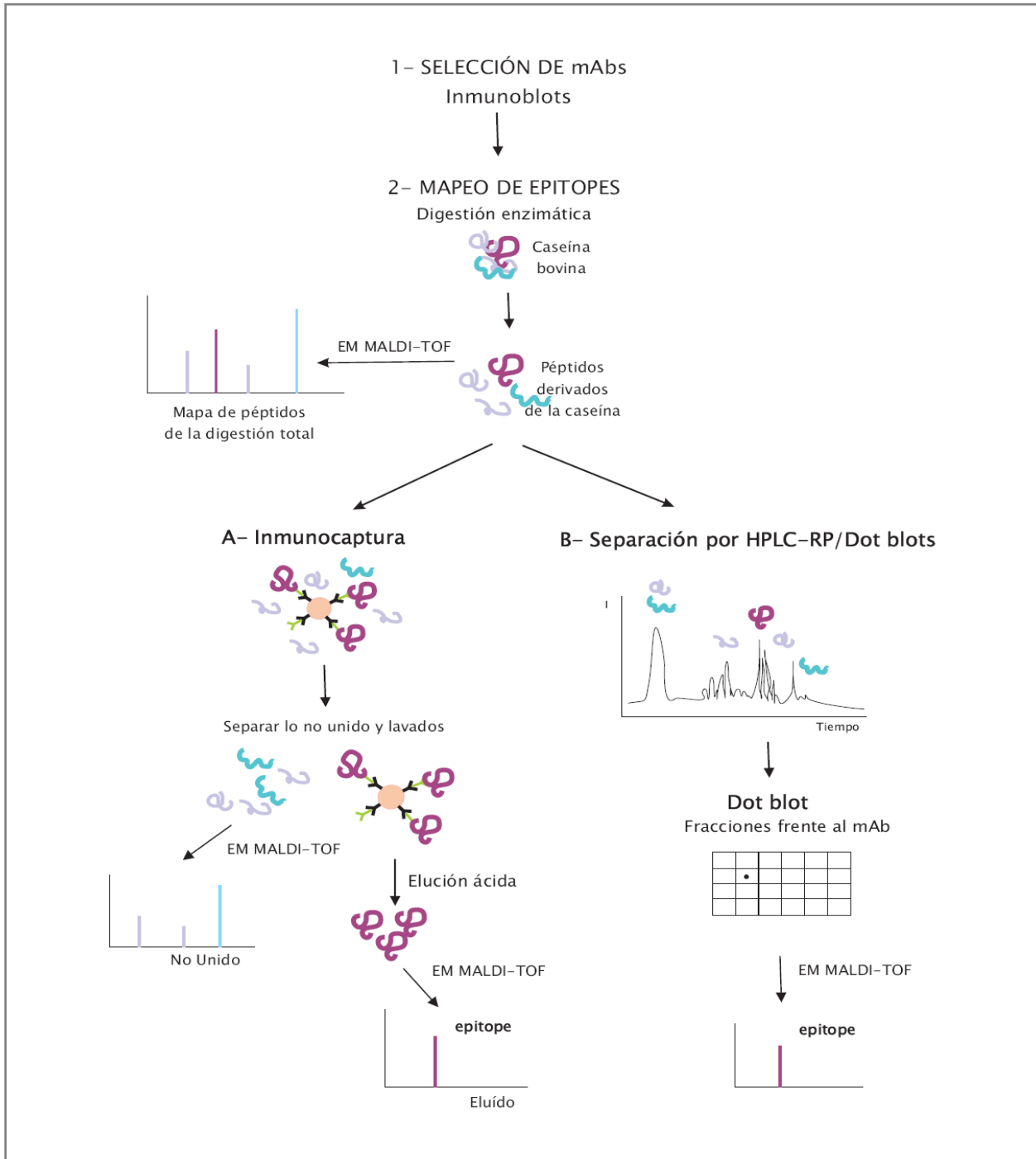


Figura 1. Esquema de la estrategia de trabajo utilizada en el mapeo de epitopes por inmunoproteómica. mAbs, anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas; EM MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI-TOF.

4. Resultados

Para identificar los epitopes de reactividad cruzada entre las proteínas de leche de vaca (PLV) y proteínas de soja (PS), inicialmente se caracterizó los epitopes que los diferentes mAb-CB reconocen en las caseínas.

4.1. Los mAbs-CB seleccionados reaccionan diferencialmente con las caseínas bovinas y reconocen proteínas de soja

Para seleccionar los anticuerpos monoclonales a ser utilizados en el mapeo de epitopes por inmunoproteómica, se separaron las caseínas bovinas α , β , y κ por electroforesis en geles de poliacrilamida disociantes (SDS-PAGE), y luego de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa se evaluó su reconocimiento empleando distintos anticuerpos monoclonales. En la **figura 2A** se presentan los resultados obtenidos luego de enfrentar tres mAb-CB (1D5, 4C3 y 3B5) con las principales caseínas bovinas (α -caseína, β -caseína y κ -caseína). Puede observarse que el **1D5** reconoce α -caseína, el **4C3** reconoce β -caseína y el **3B5** reconoce κ -caseína. Se observa también reactividad en las zonas de mayores pesos moleculares que corresponden a los agregados de las caseínas o miscelas.

Posteriormente, estos mAbs fueron utilizados en inmunoblots de extractos proteicos de leche (PLV) y de soja (PS) para evaluar su reactividad diferencial (**figura2B**). Si bien cada anticuerpo reconoce preferentemente una de las caseínas (**panel A**) se observa que cuando se los enfrenta a las proteínas totales de la leche y a las proteínas de la semilla de soja existe un reconocimiento de otras proteínas. Para el caso de PLV se observan reactividades en las zonas de alto PM que corresponde a agregados de las diferentes caseínas entre sí, y además se observan reconocimientos de los distintos monómeros de caseínas. Esto podría explicarse por el reconocimiento de epitopes lineales compartidos entre las distintas caseínas, dado que presentan una alta homología secuencial (Wal, 2001). La reactividad de los mismos frente a proteínas de soja sólo puede explicarse por una reactividad cruzada entre los distintos antígenos, y como podemos observar en la **figura 2** existen diferentes componentes de la soja (glicininas 7S y 11S) que presentan epitopes de reactividad cruzada con las caseínas bovinas. Tanto en la **figura 2A** como en la **figura 2B** se observa que el mAb **1D5** es el que produce una

reacción más intensa. Estos resultados validan el empleo de estos mAbs en los análisis inmunoproteómicos que a continuación se muestran.

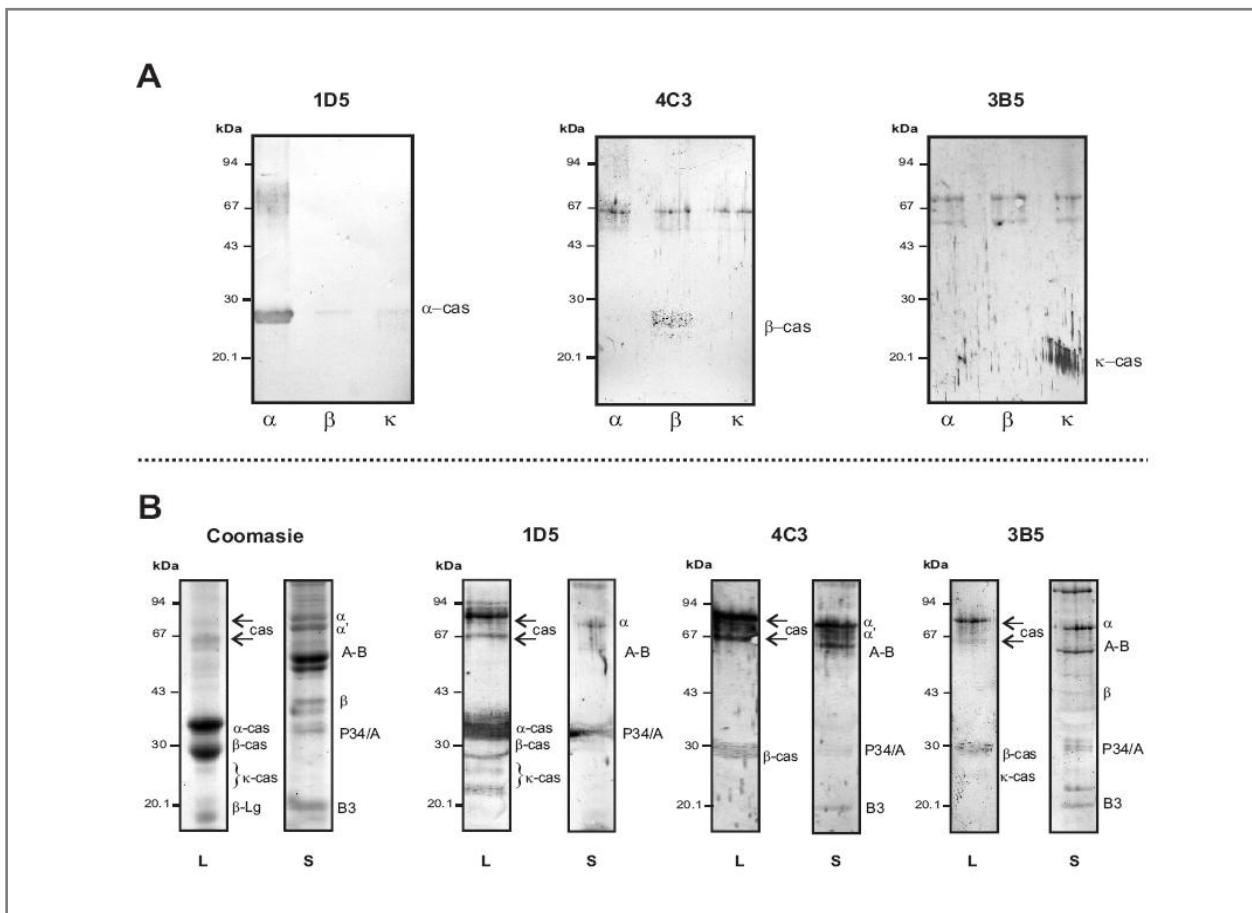


Figura 2. Inmunoblots de caseínas bovinas purificadas, proteínas de leche de vaca (PLV) y de soja (PS) con los mAbs-CB. Se resolvieron las proteínas mediante geles SDS-PAGE del 12,5% en condiciones reductoras (las muestras se trataron con β-mercaptoetanol al 5%). **Panel A:** en cada membrana se enfrentaron las tres caseínas bovinas contra los mAbs específicos a α-caseína (1D5), a β-caseína (4C3) y a κ-caseína (3B5). **Panel B:** en cada membrana se enfrentaron las PLV ó PS contra los mAbs específicos a α-caseína (1D5), a β-caseína (4C3) y a κ-caseína (3B5). A la izquierda de este panel se muestran los correspondientes geles coloreados con Coomasie de los extractos totales de leche bovina y soja. L, leche bovina; S, soja; α α' y β, subunidades de la β-conglicina de soja (globulina 7S); A y B, polipéptidos ácidos y básicos de la glicina (globulina 11S); P34, Gly m Bd 30K.

4.2. Los valores de KD 1D5–caseínas ratifican la selectividad y la heteroespecificidad observada en los inmunoblots

Para una mejor comprensión de la interacción antígeno–anticuerpo (Ag–Ac) se determinaron las constantes de afinidad del mAb 1D5 (anti α -caseína) con las distintas caseínas, realizando el ensayo de Biacore en un equipo IAsys Plus (Affinity Sensors, Saxon Hill, Cambridge, U.K.).

Tabla 1. *Constantes de interacción Ag–mAb (1D5) determinadas mediante biacore.*

	$k_{ass} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{diss} \text{ s}^{-1}$	$KA \text{ M}^{-1}$	KD nM
α -caseína	$1,05 \times 10^4$	$8,88 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^7$	84,4
β -caseína	$5,36 \times 10^4$	$2,22 \times 10^{-2}$	$2,41 \times 10^6$	415
κ -caseína	$3,75 \times 10^3$	$1,97 \times 10^{-2}$	$1,90 \times 10^5$	5250

$$KD = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$$

$$KD = \frac{1}{KA}$$

El análisis de estos parámetros cinéticos nos brinda información acerca de la especificidad y selectividad del anticuerpo (Ac) por el antígeno (Ag), y caracterizan la velocidad y la fuerza de la interacción. Con respecto a las constantes cinéticas sabemos que el valor de la k_{ass} (constante cinética de asociación) es proporcional a la velocidad de formación del complejo (relacionado con el reconocimiento Ag–Ac), y que el valor de la k_{diss} (constante cinética de disociación) se relaciona con la estabilidad del complejo, de modo que si su valor es bajo, entonces el tiempo de disociación del complejo Ag–Ac es bajo. Asimismo, cuanto menor es el valor de KD (constante de equilibrio de disociación) más afín es el Ac por el Ag.

En base a los resultados obtenidos para los sistemas 1D5–caseína se puede concluir que el mAb 1D5 tiene valores de KD diferentes para cada caseína (muestra selectividad), siendo más afín a α -caseína. Estos resultados se correlacionan con los previamente obtenidos con los inmunoblots (sección 4.1). Si bien el valor de KD de 1D5 con α -caseína es el menor (84,4 nM), en comparación con las otras caseínas, este valor corresponde a un número intermedio. Los valores de KD para anticuerpos monoclonales varían en un rango desde 10 mM hasta 0,1 nM,

por lo que valores bajos de KD del orden de 10^{-10} M (0,1 nM) (valores altos de KA 10^{10} M⁻¹) corresponderían a Ac altamente específicos por el Ag, con los cuales no se esperaría que exista reactividad cruzada con un Ag diferente. En cambio, una KD intermedia permitiría comprender cómo este Ac es capaz de reconocer diferentes Ag. Basados en los resultados hasta aquí mostrados decidimos emplear el mAb 1D5 como herramienta inmunológica en la identificación de epitopes de reactividad cruzada empleando técnicas de inmunoproteómica.

4.3. El uso de técnicas de espectrometría de masas permite la localización de epitopes en las caseínas bovinas

Se procedió al mapeo de los epitopes B de las caseínas bovinas mediante el empleo de la técnica de *Epitope Mapping MALDI-TOF-MS* (mapeo de epitopes mediante espectrometría de masas MALDI-TOF: EMap-MALDI). Para este estudio se utilizó el anticuerpo 1D5 específico de α -caseína empleando dos estrategias complementarias que se describieron en detalle en **materiales y métodos**, y que se resumen esquemáticamente en la **figura 1**. Brevemente:

- 1- **Inmunocaptura de péptidos en solución:** Consiste en tres pasos, en un primer paso, las caseínas α , β y κ (antígenos proteicos) fueron digeridas por tratamiento con diferentes proteasas (tripsina y GluC) para generar péptidos de diferentes tamaños; luego en un segundo paso, los péptidos en solución son seleccionados (capturados) por el mAb unido a esferas magnéticas en mezclas conteniendo todos los fragmentos peptídicos producidos por proteólisis de la caseína. Finalmente, los péptidos unidos a los anticuerpos inmovilizados en las esferas magnéticas son eluidos y caracterizados por EM MALDI-TOF y así identificada la región de la proteína que se une al anticuerpo.
- 2- **Dot blots de los péptidos digeridos:** Previo a la inmunodetección se procede al fraccionamiento de los péptidos generados por proteólisis de las distintas proteínas con tripsina o GluC (cada proteína individualmente) mediante HPLC de fase reversa. Las distintas fracciones recolectadas se siembran en una membrana, luego del bloqueo se enfrenta la membrana con el anticuerpo de interés (dot blot). Finalmente se revela y

aquellas fracciones que dieron una señal positiva (spots positivos) permiten seleccionar el péptido que se analizará por EM MALDI-TOF.

Se realizaron las digestiones de las caseínas con las proteasas tripsina y GluC, luego el análisis de cada muestra hidrolizada por EM MALDI-TOF permite obtener una distribución de péptidos de diferentes masas conocida como huella peptídica (**figuras 1 y 2 de gráficos y tablas adicionales**). Luego una comparación con la simulación de las digestiones enzimáticas *in silico* permite identificar la proteína de partida.

Con nuestro sistema proteico se obtuvieron los perfiles de péptidos esperados para α S1-caseína y κ -caseína en cada digestión (**figuras 1 y 2 de gráficos y tablas adicionales**), mientras que con β -caseína comercial se encontraron péptidos correspondientes a α - y κ -caseína que corresponden a impurezas presentes en la caseína comercial. La presencia de contaminación con α S1- y κ -caseína impidió la identificación de epitopes en β -caseína, por la mayor afinidad del mAb 1D5 por α -caseína.

Mapeo de epitopes B por inmunocaptura de los péptidos de caseína en solución

Los péptidos derivados de las caseínas (α S1-, β - y κ -caseína) digeridas con tripsina y GluC fueron enfrentados en ensayos independientes con el mAb 1D5 en fase soluble. En la **figura 3** se muestran a modo representativo los espectros de masas obtenidos en el mapeo de κ -caseína digerida con tripsina enfrentada al mAb1D5.

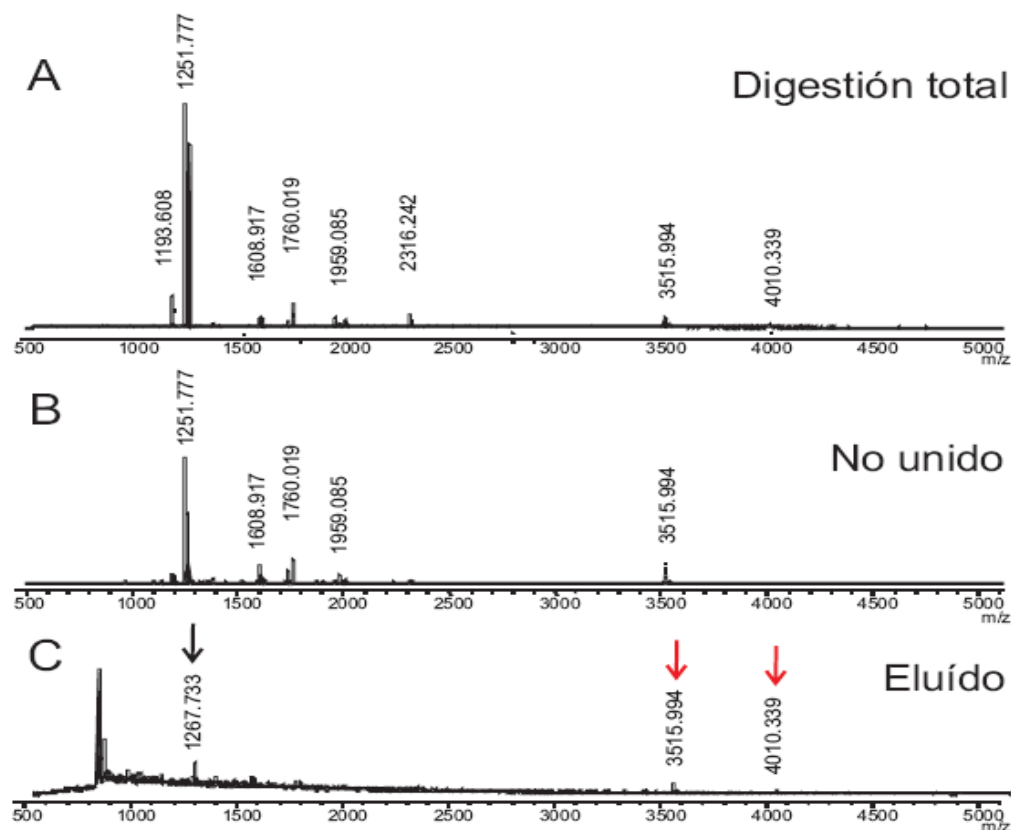


Figura 3. Espectros de masas correspondientes al análisis de κ -caseína con el mAb 1D5 (anti α -caseína). A: EM MALDI-TOF de la digestión total de la proteína κ -caseína con tripsina (huella peptídica). B: EM MALDI-TOF correspondiente a la fracción de péptidos de κ -caseína digerida con tripsina que no se unieron al mAb1D5 luego de la incubación. C: EM MALDI-TOF correspondiente al eluído de κ -caseína digerida con tripsina post inmunocaptura con mAb1D5. Se recuperaron los péptidos de masas 3515,994 Da y 4010,339 Da, ambos péptidos pertenecientes a κ -caseína (flechas rojas) y el péptido de 1267,733 Da correspondiente a α S1-caseína (flecha negra), presente como contaminante.

A partir de la comparación de los espectros de masas de las digestiones primarias (**figura 3A**) y de las fracciones eluídas (**figura 3C**), se pudieron identificar 3 péptidos (flechas rojas y negra) que fueron reconocidos y capturados por 1D5. De los péptidos caracterizados 2 corresponden a κ -caseína (flechas rojas): 3515,994 Da y 4010,339 Da, mientras que el de 1267,733 Da corresponde a α S1-caseína (flecha negra), que se encuentra como contaminante de la κ -caseína comercial.

También se capturaron y recuperaron péptidos a partir de la digestión de κ -caseína con GluC y de las digestiones de α S1-caseína con tripsina y GluC. En todos los casos los picos obtenidos en los eluidos fueron finalmente secuenciados *de novo* por EM MALDI-TOF.

Por lo tanto, se identificaron por inmunocaptura utilizando al mAb 1D5 anti α -caseína bovina los siguientes péptidos: a partir de α S1-caseína de la digestión con tripsina un péptido de 1267,6 Da (91YLGYLEQLLR100), y de la digestión con GluC se capturaron dos péptidos de 1.449,8 Da (19NLLRFFVAPFPE30) y 1756,1 Da (97QLLRLKKYKVPQLE110). A partir de κ -caseína de la digestión con tripsina dos péptidos de: 3515,8 Da (41YPSYGLNYYQKQPVALINNQFLPYPYYAK69) y 4010,1 Da (41YPSYGLNYYQKQPVALINNQFLPYPYYAKPAAVR69), y de la digestión con GluC se capturó un péptido de 2188,3 Da (22RFFSDKIAKYIPIQYVLS39).

La aplicación de inmunocaptura a β -caseína no nos permitió identificar péptidos que contengan epitopes B en este antígeno. Las características de los péptidos y los espectros de masas resultantes se muestran en la sección de gráficos y tablas adicionales (**figuras 3-8 y tabla 1**).

Mapeo de epitopes B de las caseínas por dot blots

Para validar los resultados obtenidos por inmunocaptura se realizaron dot blots como se mencionó anteriormente. Los péptidos obtenidos en las 6 digestiones que se analizaron por inmunocaptura fueron separados mediante HPLC-RP. Se obtuvieron 60 fracciones de cada muestra digerida con tripsina y 30 fracciones de cada muestra digerida con GluC. En función de las señales que se obtuvieron a 214 nm y a 280 nm (picos que contienen proteína) se sembró 1 μ l de cada fracción (que se consignan con números en los dots) en una membrana, para luego incubarla con el mAb 1D5 y finalmente revelarla con un anticuerpo anti- γ globulina de ratón conjugado a peroxidasa (**figura 4**).

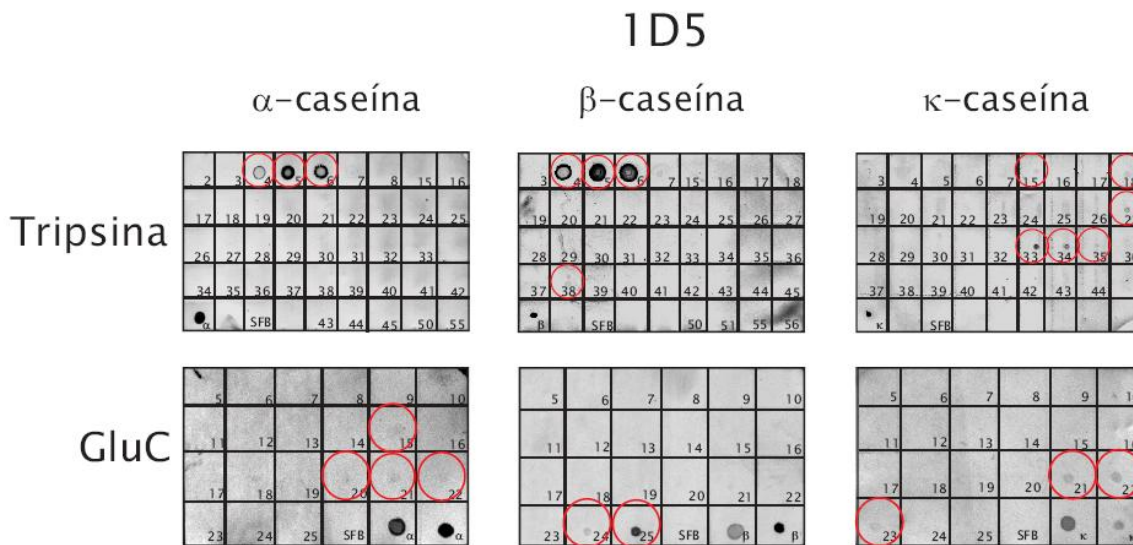


Figura 4. Dot blots de los péptidos de caseínas bovinas separados por HPLC-RP. Los péptidos de las caseínas digeridas enzimáticamente fueron separados por HPLC-RP y sembradas las fracciones conteniendo proteínas en membranas de PVDF. Se revelaron empleando el mAb 1D5 anti α -caseína bovina y el anticuerpo conjugado específico. En el panel superior se muestran los dot blots correspondientes a las digestiones de las caseínas con tripsina, mientras que en el panel inferior, los correspondientes a las digestiones de las caseínas con GluC. Con círculos rojos se indican los spots que resultaron positivos. En la última línea de cada membrana se sembraron como controles positivos las digestiones correspondientes a cada proteína y como control negativo suero fetal bovino.

Como puede observarse, se obtuvieron spots positivos para las tres proteínas con las dos digestiones. Estos péptidos secuenciados *de novo* por EM MALDI-TOF.

Por lo tanto, se identificaron por dot blots utilizando el mAb 1D5 anti α -caseína bovina los siguientes péptidos: a partir de α S1-caseína de la digestión con tripsina un péptido de 1267,6 Da (91YLGYLEQLLR100), y de la digestión con GluC se identificaron tres péptidos de 1449,8 Da (19NLLRFFVAPFPE30), 1756,1 Da (97QLRLKKYKVPQLE110) y 1120,2 Da (1RPKHPIKHQGLPQEV LNE18). A partir de la digestión de κ -caseína con tripsina se identificaron dos péptidos: 3515,8 Da (41YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK69) y 4010,1 Da (41YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPY PYYAKPAAVR74); mientras que la digestión con GluC permitió caracterizar dos péptidos: 2188,3 Da (22RFFSDKIAKYIPIQYVLS39) y 2930,5 Da (125IPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLE153

Mediante la aplicación de esta técnica se logró identificar un epítipo presente en un péptido de β -caseína (digestión con GluC): 2794,6 Da (185MPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV209).

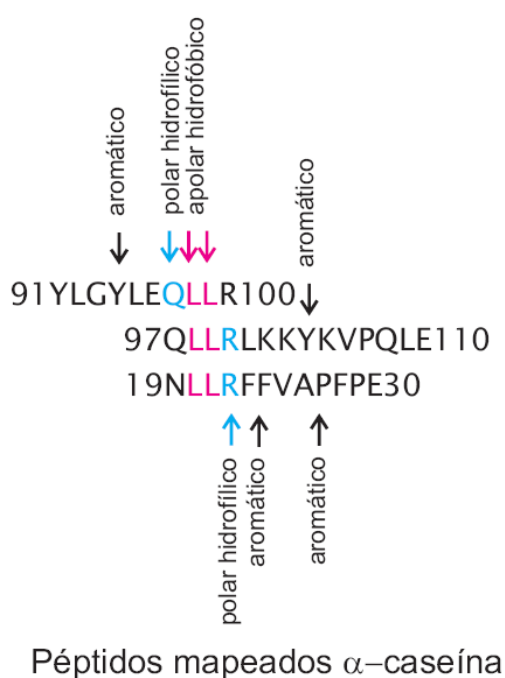
En la **tabla 2** de la sección de **gráficos y tablas adicionales** se muestran todos los péptidos identificados mediante la aplicación de esta técnica.

Por lo tanto, el análisis por EM MALDI-TOF de los dot blots arrojó resultados coincidentes con los obtenidos por inmunocaptura, dado que seis de los ocho péptidos mapeados por dot blots coinciden con los péptidos mapeados por inmunocaptura.

Resumen de los resultados obtenidos en el mapeo de las caseínas con mAb 1D5 utilizando la técnica EMap-MALDI

Mediante la aplicación de las técnicas de inmunocaptura y con la validación de los dot blots logramos identificar 5 péptidos que contienen epítipes que son reconocidos por el mAb 1D5: tres péptidos derivados de la α S1-caseína bovina con las siguientes masas: 1) 1.267,6 Da; 2) 1.449,8 Da y 3) 1.756,1 Da; y dos péptidos derivados de la κ -caseína bovina de masas moleculares: 4) 2188,3 Da y 5) 3.515,6 Da. Si bien en este último caso existe un péptido de mayor masa 6) 4.010,1 Da, éste contiene al anterior por lo cual totalizan 5 los péptidos que contienen epítipes B reconocidos por el mAb 1D5. En la **figura 5** se muestran las secuencias de las caseínas y las características de los péptidos identificados, con formato de tabla (secuencias, masas y las posiciones en la proteína).

Del análisis de las secuencias aminoacídicas de los péptidos identificados surge que de los péptidos mapeados para α S1-caseína, dos de ellos se encuentran superpuestos o solapados 91YLGYLE**QLLR**100 y 97**QLLR**LKKYKVPQLE110, uno recuperado a partir de la proteólisis con tripsina y el otro a partir de la proteólisis con GluC, mientras que a partir de esta última digestión también se recuperó el péptido 19**NLLR**FFVAPFPE30, que conserva un motivo estructural común con los péptidos anteriores (marcado en rojo).



En general, la longitud de los epitopes que se unen a los anticuerpos puede variar entre 3 y 15 aminoácidos. Por las características de los péptidos aquí mapeados principalmente en el sistema mAb1D5- α S1caseína podríamos proponer que son importantes estructuralmente entre 5-7 aminoácidos en los que la arginina (**R** aminoácido polar con carga positiva) o la glutamina (**Q** aminoácido polar neutro) sería el aminoácido central de “anclaje” flanqueado por 2-3 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica.

Secuencias similares se han descrito en otros trabajos en los que se ha analizado cientos de péptidos alergénicos y no alergénicos, concluyendo que esta disposición de aminoácidos es característica en epitope alergénicos (Asakawa et al., 2010). Asimismo, distintos trabajos empleando sueros de pacientes alérgicos identifican a estos tres péptidos como epitopes inmunodominantes tanto IgG como IgE. En el mismo sentido, Cocco y col. (Cocco et al., 2003) describe mediante análisis por mutagénesis de α S1-caseína que los aminoácidos críticos para la unión a IgE son los aminoácidos hidrofóbicos **F²³**, **F²⁴**, **F²⁸** y **L⁹⁸** presentes en los epitopes inmunodominantes en esta proteína.

El análisis de epitopes en κ -caseína no arrojó resultados similares a los obtenidos con α S1-caseína, lo cual podría explicarse por la menor afinidad de este mAb con este antígeno. Además, el mapeo de epitopes a partir de la digestión con tripsina mostró péptidos de mayor

longitud, lo cual indudablemente dificulta el análisis. Sin embargo, se observa que se capturan péptidos a partir de una hidrólisis intermedia o parcial con tripsina (ver tabla en **figura 5**) ya que los péptidos mapeados en este caso poseen sitios intermedios de corte. Se podría concluir que los péptidos de menor longitud, producto de una hidrólisis enzimática más intensa con tripsina, no se pueden recuperar dado que los epitopes están justamente en los sitios específicos de corte enzimático.

4.4. Es factible el empleo de los mAbs específicos de caseínas como herramientas inmunológicas para estudiar la reactividad cruzada e identificar epitopes en proteínas de soja

Se aplicó esta metodología de mapeo de epitopes lineales por inmunocaptura para identificar epitopes de reactividad cruzada en la subunidad α de la β -conglucina de soja (Gly m 5.0101) recombinante, alergeno previamente descrito como de reactividad cruzada con las caseínas bovinas (Curciarello et al., 2008; Petruccelli et al., 2005).

La proteína de soja recombinante pura se digirió con la enzima GluC y se incubó con las esferas magnéticas unidas a cada uno de los tres mAb-CB. Luego se analizaron los péptidos por EM MALDI-TOF en los eluidos y se compararon con la digestión total. Finalmente los péptidos mapeados fueron secuenciados *de novo* por EM MALDI-TOF y los espectros de masas resultantes se muestran con detalle al final de la tesis en la **figura 9** de la sección **gráficos y tablas adicionales**.

Se capturaron tres péptidos cuyas masa moleculares fueron las siguientes: 1) 2260,2 Da; 2) 4164,0 Da y 3) 1864,0 Da. Las secuencias aminoacídicas se muestran en la **figura 6**.

Gly m 5.0101 Glycine max

REPQQPGEKEEDEDEQPRPIPFPRPQPRQEEHEQREEQEWPRKKEEKRGEKGSEEEDEDEEEQDERQFFPRPPHQKEERKQEE
 DEDEEQRESESESEDESE**LRRHKKNKPNFLFGSNRFE**TLFKNQYGRIRVLQRFNQRSPQLQNLRDYRILEFNSKPNTLLLPNHADAD
 YLIVILNGTALSLVNNDDRDSYRLQSGDALRVPSTTYVYVVPDNNENLRLITLAI PVNKPRGFESFFLSSTEAQQSYLQGFSR
 NILEASYDTKFEEINKVLF SREEGQQGEQRLQESVIVEISKEQIRALS KRAKSSSRKT ISSSEDKP FNLRSDPIYSNKLGKFFE
 ITPEKNPQLRDLIDFLSIVDMNEGALLPHFNKAIVILVINEGDANIELVLGLKEQQQEQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIP
 AGYPVVVNATSNLNFFAIGINAENNQRNFLAGSQDNVISQIPSQVQELAFPGSAQAVEKLLKNQRESYFVDAQPKKKEE**GNKGRK**
GPLSSILRAFY*

Glu-C			
M+1/Da	Posición	Secuencia	mAb
2260,2	103-120	LRRHKKNKPNFLFGSNR E	1D5 4C3 3B5
4164,0	121-152	TLFKNQYGRIRVLQRFNQRSPQLQNLRDYRIL E	4C3
1864,0	505-521	GNKGRK GPLSSILRAF _Y (final de la secuencia)	1D5 4C33B5

Figura 6. Epitopes de reactividad cruzada mapeados de Gly m 5.0101 de soja con los distintos mAbs por inmunocaptura. Se muestra la secuencia de Gly m 5.0101 madura con la secuencia de los péptidos positivos (rojo) y la zona de continuidad de los péptidos mapeados de 2260,2 Da y 4164,0 Da (enmarcada en rojo). Se incluye en una tabla abajo la caracterización de los péptidos positivos.

Estos resultados permiten confirmar el reconocimiento cruzado de los 3 mAbs específicos de las caseínas bovinas con epitopes presentes en el alérgeno de la soja Gly m 5.0101. Analizando las secuencias de los péptidos: 1) de 2260,2 Da y 3) de 1864,0 Da, y teniendo en cuenta lo antes dicho para los epitopes mapeados en las caseínas podemos resaltar la importancia de la presencia de los aminoácidos polares: **lisina K¹⁰⁹** y **arginina R¹¹⁸** en el péptido de 2260,2 Da y **arginina R⁵¹⁸** del péptido de 1864,0 Da.

5. Discusión

En este primer capítulo se mapearon epítopes B en caseínas bovinas y Gly m 5.0101 empleando el anticuerpo mAb 1D5 específico de α -caseína bovina, utilizando el método EMapp MALDI que combina la purificación de péptidos por inmunocaptura con la determinación de las masas moleculares por espectrometría de masas EM MALDI-TOF. La combinación de ambos procedimientos resulta de mayor eficiencia y rapidez en comparación con los métodos usados convencionalmente. Este tipo de metodología no ha sido publicado para el análisis de epítopes alergénicos. La selección y análisis de los péptidos capturados por los anticuerpos proporcionan la base para la localización de sitios antigénicos y su mapeo en la molécula proteica. Este método fue aplicado con éxito para anticuerpos con una afinidad de unión intermedia a baja (KD entre 10^{-7} - 10^{-6} M) y por lo tanto puede ser aplicable a la mayoría de los anticuerpos que se unen a epítopes lineales. Una ventaja adicional de esta metodología es la sensibilidad de EM MALDI-TOF, lo cual significa que se requiere muy poca cantidad tanto de antígeno como de anticuerpo para evidenciar la interacción molecular. Además, representa en forma más ajustada o fisiológica la interacción epítope-paratope, ya que la inmunocaptura se realiza con el antígeno en solución, y además en este caso se emplearon caseínas bovinas purificadas a partir de su fuente natural (comerciales). Asimismo, utilizando diversas proteasas específicas se logra obtener de una manera rápida una gran variedad de fragmentos peptídicos, etapa comparable a la síntesis rápida de péptidos o a la expresión de genes recombinantes de deleciones mutantes. Las etapas de digestión (12 hs), inmunocaptura (aprox. 4 hs), y determinación de las masas moleculares de cada muestra (aprox. 1 min), permiten identificar epítopes inmunoreactivos, de 10-25 aminoácidos, en un solo día. Este punto es relevante al momento de analizar un elevado número de proteínas o de anticuerpos.

En nuestro trabajo, la aplicación de la técnica de EMapp MALDI con los anticuerpos mAb-CB permitió identificar epítopes de reactividad cruzada entre CB y PS: α S1-caseína bovina, κ -caseína bovina y en Gly m 5.0101 de soja.

Las caseínas (principalmente la α S1-caseína) están descritas como los principales alérgenos de la leche bovina. Son numerosos los trabajos que estudiaron los epítopes inmunogénicos en estas proteínas, por lo que buscamos en la base de datos "Immune Epitope Database and Analysis Resource" (www.immuneepitope.org) las publicaciones relacionadas con los epítopes

que aquí se identificaron. Se encontró que los cinco epitopes de las caseínas bovinas mapeados con nuestros mAbs se encuentran descritos en esta base de datos como epitopes inmunoreactivos, y que al menos 11 trabajos publicados caracterizan a los mismos como epitopes B y/o T. En estos trabajos se describe la capacidad de unión de los epitopes a anticuerpos IgE empleando diversas metodologías. Para ser más precisos, el epitope 19**NLLRFFVAPFPE**30 de α S1-caseína ha sido informado por diferentes trabajos como un epitope IgG e IgE inmunodominante (Cerecedo et al., 2008; Chatchatee et al., 2001a; Cocco et al., 2003; Elsayed et al., 2004a; Lin et al., 2009; Schulmeister et al., 2009; Spuergerin et al., 1996) y como epitope T inmunodominante (Elsayed et al., 2004b). Asimismo, los péptidos 91**YLGYLEQLLR**100 y 97**QLRLKKYKVPQLE**110 también de α S1-caseína fueron descritos como epitopes IgG e IgE inmunodominantes (Chatchatee et al., 2001a; Cocco et al., 2003; Elsayed et al., 2004a; Enomoto et al., 1990; Järvinen et al., 2002; Lin et al., 2009; Schulmeister et al., 2009; Spuergerin et al., 1996) y como epitopes T inmunodominantes (Elsayed et al., 2004b; Enomoto et al., 1990; Nakajima-Adachi et al., 1998). Para el caso de la κ -caseína bovina la información es más acotada y se encuentran pocos trabajos publicados que hayan mapeado epitopes B, mientras que no existen reportes de epitopes T. Los péptidos que hemos identificado en nuestro trabajo en la κ -caseína se encuentran en la literatura descritos como epitopes IgG e IgE (Cerecedo et al., 2008; Chatchatee et al., 2001b; Järvinen et al., 2002; Lin et al., 2009). Asimismo, dos de los tres péptidos de Gly m 5.0101 de soja (la subunidad α de la β -conglucina) mapeados por estos mismos mAbs, los péptidos: 1) de 2260,2 Da 103**LRRHKNKNPFLFGSNRFE**120 y 2) de 4164,0 Da 121**TLFKNQYGRIRVLQRFNQRSPQLQNLRDY RILE**152 (que se encuentran en la región core de la proteína) están descritos como epitopes antigénicos (Fu et al., 2007). Si bien con estos anticuerpos se han identificado epitopes que ya han sido informados como epitopes IgE e IgG, no se ha descrito la posibilidad que se comporten como epitopes compartidos o de reactividad cruzada entre estos dos sistemas proteicos no relacionados. Sin embargo, estos resultados *in vitro* deben considerarse con precaución. No podemos asegurar que una reactividad cruzada *in vitro* presente relevancia clínica sin recurrir al estudio de un sistema biológico *in vivo*. Estos resultados sólo reflejan lo que ocurren con los anticuerpos en fase fluida.

Además la secuencia de estos epitopes mapeados se han descrito como epitopes para caseínas de otros mamíferos, como las de oveja y las de cabra (Masoodi and Shafi, 2010). Este

hecho refleja la importancia de estas secuencias como epitopes inmunodominantes en las caseínas. Por lo tanto proponemos que estos mismos epitopes podrían ser los responsables de generar la intolerancia clínica observada en algunos pacientes alérgicos a leche de vaca que son tratados con leches de estas especies animales (Docena et al., 2002).

Por otro lado, Gly m 5.0101, subunidad α de la β -conglucina de soja, ha sido descrita como uno de los principales alérgenos de la soja junto con las subunidades α' y β formando los trímeros de β -conglucina, que es la proteína mayoritaria de la fracción 7S de las semillas de soja. La proteína posee una zona amino terminal llamada región de extensión, de aproximadamente 150 aas, muy rica en aminoácidos ácidos. Esta zona de la molécula ha sido descrita como la más inmunogénica y es compartida con la subunidad α' . Además presenta una región común con las subunidades α' y β , que se denomina región core, cuya estructura la componen conformaciones de hélices α y barriles β . Esta región constituye un dominio llamado cupina, que también se encuentra en otras proteínas alérgicas vegetales (Mills et al., 2002). Las tres proteínas presentan un alto porcentaje de similitud secuencial, sin embargo las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de las tres subunidades son diferentes (Petruccelli et al., 2005). La información obtenida de los alineamientos de las distintas subunidades de la β -conglucina (**figura 7A**) nos muestra que los tres epitopes mapeados en la subunidad α se encuentran en la zona core común con las subunidades α' y β , lo cual explica el reconocimiento de los mAbs específicos de caseínas con las 3 subunidades presentes en los extractos de las semillas de soja (**figura 2B**).

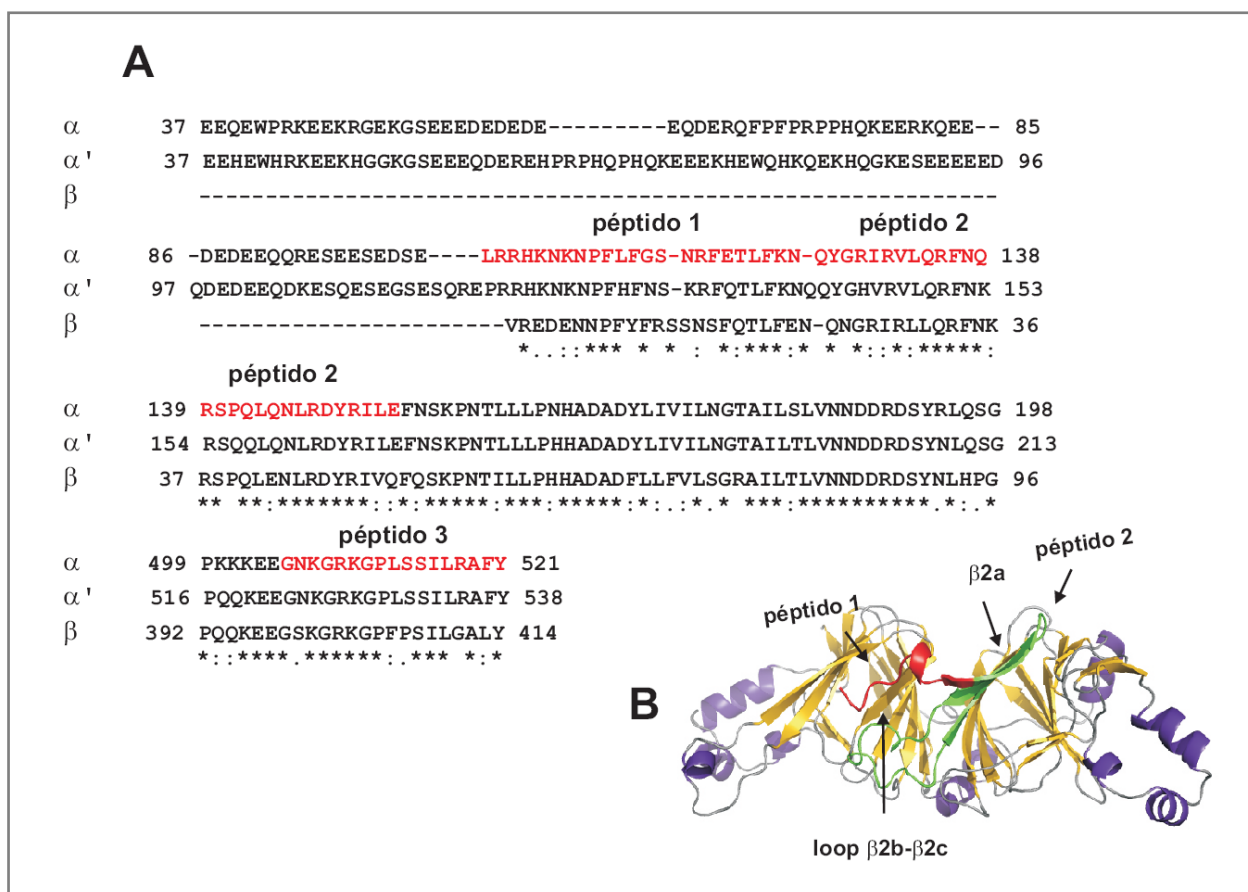


Figura 7. A: Alineamientos de las tres subunidades de la β -conglucina de soja. Los epitopes de reactividad cruzada mapeados en la sub α están marcados en rojo. B: Representación tridimensional de la estructura PDB de la subunidad α de la β -conglucina de soja. La estructura fue modelada utilizando un servidor SWISS-MODEL, en rojo se coloreó el péptido 1) de 2260,2 Da y con verde el péptido 2) de 4164,0 Da.

Utilizando el servidor SWISS-MODEL (

http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment) se obtuvo la estructura tridimensional de la subunidad α de la β -conglucina. Los tres péptidos mapeados en esta proteína de soja 1) de 2260,2 Da 103LRRHKKNKNPFLFGSNRFE120, 2) de 4164,0 Da 121TLFKNQYGRIRVLQRFNQ RSPQLQNLRDYRILE152 y 3) de 1864,0 Da 505GNKGRKGPLSSILRAFY521 están localizados en la región core. Como el péptido 3) se localiza en una región de la proteína no modelada, la estructura PDB que se muestra en la **figura 7B** sólo contiene a los péptidos 1) y 2). Puede observarse que ambos péptidos se encuentran en la superficie de la molécula y accesibles al solvente, por lo tanto también se encuentran accesibles a los anticuerpos.

Además de mostrar reactividad cruzada con proteínas de la leche de vaca, las proteínas de soja muestran reactividad cruzada con otras leguminosas, como el maní (Bernhisel–Broadbent and Sampson, 1989). Gly m 5.0101 y el principal alérgeno del maní, Ara h 1, pertenecen a la familia de las vicilinas (proteínas de reserva), que han sido descritas como alérgenos importantes. Empleando péptidos sintéticos solapados se han descrito 23 epitopes IgE en Ara h 1 (Burks et al., 1997). Ambas proteínas muestran un 60% de identidad secuencial y algunos de los epitopes mapeados en maní se alinean con los epitopes de reactividad cruzada con leche que aquí hemos mapeado en Gly m 5.0101 (**figura 8**). Otra vicilina alérgica es la proteína de las lentejas Len c1, este alérgeno conserva homología secuencial con Gly m 5.0101 (56% de identidad) y con Ara h1 (50% de identidad), pero no se ha descrito alérgenicidad cruzada con alérgenos de la soja. Consecuentemente con ello los epitopes IgE mapeados en Len c 1 (muestra epitopes IgE entre los aminoácidos 314–399 (López–Torrejón et al., 2003)) no se alinean con los epitopes que hemos mapeado en Gly m 5.0101 (**figura 8**).

			péptido 1	
Gly m 5.0101	60	EDEEQDERQFPFPRPPHQKEERKQEEDEDEEQRESESESE	<u>LRRHKKNKPNPFLFGSNRF</u>	119
Ara h 1	116	REEDWRQPREDWRRPSSHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREETS	<u>SRNN--PFYFPSRRF</u>	176
		.:* : : : **.* : : : * . : ** : : * * * : : * * * *		
Len c 1		-----	SRSDQENPFIFKSNRF	16
			* . : ** : * ****	
			péptido 2	
Gly m 5.0101	120	<u>ETLFKNQYGRIRVLQRFNQRS</u> <u>QLQNL</u> <u>RDYRILE</u>	FNSKPNTLLLPNHADADYLIVILNGT	179
Ara h 1	176	STRYGNQNGRIRVLQRFDQRSKQFQNLQNHRIVQIEARPNTLVLPKHADADN	ILVIQQGQ	236
		. * : *		
Len c 1	17	QTIYENENGHIRLLQRFDKRSKIFENLQNYRLLEYKSKPHTIFLPQFTDAD	FILVLSGK	77
		: * : : * : *		
			péptido 3	
Gly m 5.0101	504	<u>EGNKGRKGPLSSILRAF</u>	Y	521
Ara h 1	597	EENQGGKGPLLSILKAFN		614
		* * : * * * * * * * * * *		
Len c 1	401	-----		418

Figura 8. Alineamientos de las vicilinas alérgicas de soja (Gly m 5.0101), maní (Ara h 1) y lenteja (Len c1). Los epitopes mapeados en la sub α están marcados en rojo y subrayados los aminoácidos de los epitopes de Ara h 1 que coinciden con los epitopes mapeados de soja.

La conservación de la secuencia aminoacídica entre los epitopes aquí mapeados en Gly m 5.0101, y los epitopes IgG e IgE mapeados en el alérgeno Ara h 1 (ambas vicilinas provenientes

de especies que exhiben reactividad cruzada) refuerza el concepto del uso estos anticuerpos como herramientas de detección de epitopes lineales de reactividad cruzada.

El análisis de estas secuencias identificadas experimentalmente, junto con los péptidos inmunodominantes hallados en la búsqueda bibliográfica, nos permitió resaltar las características de los epitopes responsables de la reactividad cruzada. Esto nos permite concluir que los epitopes de reactividad cruzada presentan una longitud de 5–7 aminoácidos, y los aminoácidos críticos para la reactividad inmunoquímica serían los polares, que estructuralmente actuarían de “anclaje” (R²², Q⁹⁷, R⁹⁹ para α S1-caseína y K¹⁰⁹, R¹¹⁸ y R⁵¹⁸ para Gly m 5.0101) flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos que estabilizarían la interacción.

En conclusión, en este primer capítulo se aplicaron diversas técnicas para la caracterización de mAb-CB como inmunoblots, biacore y un novedoso método de mapeo de epitopes que emplea como técnica de detección la espectrometría de masas (técnica de muy alto rendimiento). Este análisis permitió identificar epitopes en caseínas bovinas y en un alérgeno mayor de la soja que podrían ser los responsables de la reactividad cruzada inmunoquímica observada, y de la alergenidad cruzada descrita en pacientes alérgicos a leche bovina. Además la secuencia aminoacídica de estos epitopes ha sido descrita en otros alérgenos como epitopes inmunodominantes IgG e IgE, incluyendo caseínas de distintas especies de mamíferos que han sido ampliamente reconocidas como de reactividad cruzada.

Hemos basado nuestro análisis en el empleo del mAb 1D5 específico de α -caseína bovina, por ser el que mejor resultado inmunoquímico arrojó al estudiar las distintas caseínas y proteínas de soja.

**CAPÍTULO II – ANÁLISIS INMUNOQUÍMICO DE LOS
ALERGENOS MAYORES DE SOJA Gly m Bd 30K y Gly m Bd
28K Y ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA REACTIVIDAD
CRUZADA CON CASEÍNAS DE LECHE DE VACA**

1. Generalidades

Aunque se han descrito tres proteínas de soja (PS) como sus principales alérgenos, Gly m Bd 30K (P34), Gly m Bd 28K (P28) y Gly m 5.0101, basado en el estudio del reconocimiento IgE (Hiemori et al., 2004; Krishnan et al., 2009; Ogawa et al., 1991, 1993, 1995), la alérgenicidad *in vivo* de estas proteínas aún no ha sido investigada.

Gly m Bd 30K (P34), es considerada como el principal alérgeno de la soja. Posee un tamaño 34 kDa y se localiza en las vacuolas de la semilla de soja (Ogawa et al., 1993), aunque también se la ha detectado asociada a cuerpos lipídicos (Kalinski et al., 1990). Pertenece a la superfamilia de las papaínas (cisteína-proteasas) (Herman, 2005; Ji et al., 1998; Kalinski et al., 1990) a pesar de que posee una mutación en su sitio activo que determina que carezca de actividad enzimática (G por C en el aminoácido 200) (Kalinski et al., 1990). En Japón ha sido informada como el alérgeno principal de la soja (Ogawa et al., 1991, 1993), y varios epitopes B lineales han sido mapeados a lo largo de su secuencia aminoacídica (Helm et al., 1998, 2000b).

Gly m Bd 28K (P28), componente minoritario de la fracción 7S (Ogawa et al., 2000), pertenece a la superfamilia de las cupinas que son las principales globulinas de almacenamiento en las legumbres y las nueces. Varias proteínas pertenecientes a esta superfamilia han sido caracterizadas como alérgenos: Ara h 1 y Ara h 3 del maní, MP27/MP32 de zapallo, Gea 8 de la zanahoria, y Gly m 5 y Gly m 6 de soja (Breiteneder and Mills, 2005; Tsuji et al., 2001a). Se han mapeado en estos alérgenos diferentes epitopes IgE (Høst and Halken, 1990; Xiang et al., 2004) y constituye uno de los alérgenos alimentarios más importantes de la soja.

A pesar que distintas proteínas de la soja han sido caracterizadas como alérgenos y tres de ellas se han descrito como alérgenos mayores, dependiendo de la población en estudio, la sensibilización primaria a PS parece ser muy baja, en función de lo que se esperaba en las últimas décadas por la marcada exposición a la que se presenta la población general. Sin embargo, la sensibilización secundaria a la soja parece ser más relevante. La reactividad cruzada más ampliamente descrita es la que se observa en pacientes alérgicos a pólenes que reaccionan frente a alérgenos de la soja (Mittag et al., 2004) y la leche de vaca (Zeiger et al., 1999). Dado que en nuestro país el problema de la intolerancia a la soja en pacientes alérgicos a leche de vaca (ALV) bajo tratamiento es un problema frecuente nuestro grupo ha estudiado la

reactividad cruzada entre estos sistemas alergénicos. Hemos demostrado que anticuerpos monoclonales específicos a las caseínas bovinas y sueros pacientes ALV reconocen a las PS Gly m 6 G4 y Gly m 5.0101 (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002), y que ratones alérgicos exclusivamente a proteínas de leche de vaca (PLV) desarrollaron reacciones de hipersensibilidad frente a la exposición a PS. Estos resultados demuestran que existe una reactividad cruzada inmunoquímica, que los anticuerpos IgE son capaces de reconocer en forma cruzada los alérgenos de soja y que biológicamente este reconocimiento cruzado puede tener un impacto clínico que permite comprender la intolerancia observada en los pacientes ALV en tratamiento (Rozenfeld et al., 2002; Smaldini et al., 2012). Sin embargo, no se conoce completamente cuáles son los alérgenos y los epítopes involucrados. En este trabajo hemos ahondado en el estudio de esta reactividad cruzada y en este capítulo se presentan los resultados del análisis de dos de los alérgenos mayores de la soja.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos

Hemos demostrado en el capítulo anterior que las caseínas bovinas comparten epitopes con alérgenos de la soja. Previamente en otros estudios realizados por el grupo se descartó la posibilidad que la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, alérgenos de la leche de vaca, fueran proteínas de reactividad cruzada con la soja. Por lo tanto, sostenemos que focalizando el estudio de la reactividad cruzada en las caseínas nos permitirá comprender las bases moleculares de la misma, y explotar esta información para el desarrollo de nuevas y más seguras inmunoterapias, dada la menor inmunogenicidad de las proteínas de soja con respecto a la de las PLV.

En este capítulo mostraremos los resultados del estudio de la reactividad inmunoquímica y el co-reconocimiento de Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28), como así también su posible importancia clínica empleando un modelo murino de alergia alimentaria a PLV mediado por IgE.

Para estudiar la reactividad cruzada entre caseínas bovinas y los alérgenos mayores de la soja se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Obtener de forma recombinante los dos alérgenos mayoritarios de la soja: Gly m Bd 34K (P34) y Gly m Bd 28K (P28).
- ✓ Estudiar *in vitro* la reactividad cruzada inmunoquímica con las caseínas bovinas mediante el empleo de distintos anticuerpos específicos de LV.
- ✓ Estudiar *in vivo* la reactividad cruzada y establecer su relevancia clínica empleando un modelo animal de alergia alimentaria IgE-dependiente a leche de vaca.

3. Diseño experimental

Se clonaron los alergenos de soja Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28) fusionadas a la proteína maltosa-binding-protein (MBP) para mejorar la estabilidad y la solubilidad de las proteínas de interés. Además se incluyó un tag de histidinas (His) para facilitar la posterior purificación por cromatografía de afinidad empleando resinas conteniendo cobalto o níquel. Las proteínas recombinantes MBP-P34 (P34), MBP-P28 (P28) y MBP se purificaron y se analizaron mediante la aplicación de diversos inmunoensayos: **ELISA indirecto e inmunoblots** empleando sueros de pacientes alérgicos tanto a soja, como a soja y leche de vaca, para analizar la alergenidad y la alergenidad cruzada de las proteínas recombinantes; **inmunoblots y ELISA competitivo** empleando antisueros específicos de caseínas bovinas para caracterizar la reactividad cruzada de los alergenos de soja con los principales alergenos de leche de vaca. Finalmente se validaron los resultados obtenidos *in vitro* en un **modelo murino de alergia alimentaria** a leche de vaca.

4. Resultados

4.1. Las proteínas de soja Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd28K (P28) son reconocidas *in vitro* por anticuerpos específicos de proteínas de leche de vaca

Las secuencias de los primers empleados en la clonación de P34 y P28 se muestran en la **tabla 1** de la sección **materiales y métodos**. Estos primers fueron diseñados para hacer un clonado direccional en pENTR (invitrogen) ajustándose al marco de lectura de forma tal que al transferir esta secuencia a un vector de destino de expresión pDEST-HisMBP quede en el marco de lectura con el tag de purificación. Se expresaron las proteínas de interés en distintas cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3) y BL21 Codon Plus (DE3), optimizando las condiciones de expresión de manera de poder obtenerlas con buenos rendimientos. Finalmente se empleó la cepa de *E.coli* BL21 Codon Plus (DE3) con crecimiento a 26 °C luego de la inducción durante 6 hs. En la **figura 1** se muestran los geles SDS-PAGE 12,5% de las purificaciones de las fracciones insolubles (FI) realizadas por cromatografía de afinidad del tag de histidinas con resina de níquel en condiciones desnaturalizantes (urea 6M).

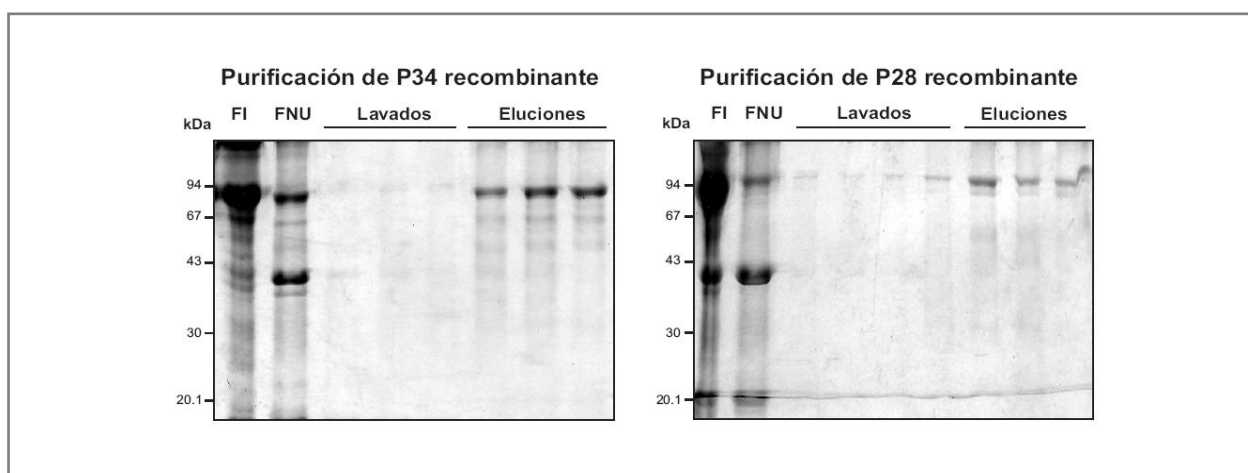


Figura 1. Caracterización de las *proteínas recombinantes de soja por electroforesis*. Los extractos totales, y las distintas fracciones de la purificación se separaron en geles SDS-PAGEs 12,5%. FI, fracción insoluble de la lisis posterior a la inducción. FNU, fracción de proteínas no unidas a la resina de níquel.

Podemos observar en la **figura 1** que ambas proteínas se expresan en altos niveles y que luego de la purificación se obtienen fracciones con un alto grado de pureza (**figura 1**, eluciones). Luego de la purificación las proteínas se renaturalizaron y se dializaron para eliminar la urea frente a buffer 1 mM Tris-HCl pH=8. Nótese en la **figura 1** los altos pesos moleculares de ambas proteínas P34 (MBP-P34) 81,6 kDa y P28 (MBP-P28) 94 kDa se deben a la fusión con la proteína MBP de 42 kDa.

ELISA indirecto con sueros de pacientes reactivos a soja

Las proteínas recombinantes de soja fueron inicialmente analizadas por ELISA indirecto utilizando 10 sueros de pacientes alérgicos a PS que contienen anticuerpos IgE específicos. Se utilizaron 4 sueros de pacientes no alérgicos a PS como controles negativos (**tabla 1 y figura 2**).

Tabla 1. Características de los sueros de pacientes alérgicos a PS.

Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml	Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml
1	0,220	0,119	255	8	0,750	0,114	261
2	0,209	0,093	294	9	0,693	0,119	57
3	0,187	0,145	142	10	1,180	0,092	235
4	0,175	0,076	265	11	0,091	0,084	>1000
5	0,310	0,094	78	12	0,076	0,062	>1000
6	0,455	0,075	79	13	0,116	0,072	2
7	0,676	0,098	237	14	0,099	0,078	130

Valores de corte: IgE esp. PS DO: 0,121; IgE esp. PLV DO: 0,128

Valor normal: IgE total: 60 UI/ml

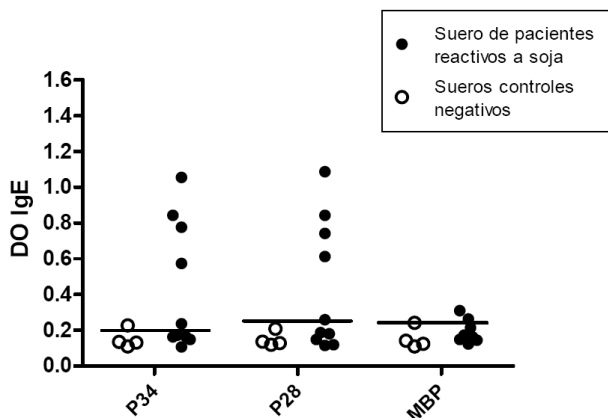


Figura 2. ELISA indirecto específico para IgE sérica de pacientes alérgicos a soja. Antígenos inmovilizados: P34 0,05 µg/pocillo, P28 0,05 µg/pocillo y MBP 0,025 µg/pocillo (como control negativo), se enfrentaron a sueros de pacientes alérgicos a PS y a sueros de pacientes no alérgicos a PS (“controles negativos”). Las líneas indican los valores de corte.

En la **figura 2** puede observarse que el 40% de los sueros de pacientes alérgicos a soja (4/10) reconocen tanto a P34 como a P28, mientras que el 100% de los sueros (10/10) dieron negativos frente a MBP (control negativo). Estos resultados confirman que las proteínas recombinantes son reconocidas por la IgE presentes en los sueros, esta reactividad no está dirigida a hidratos de carbono y que la presencia de MBP en la quimera no afecta el reconocimiento específico de los componentes de soja, ni es reconocido por la IgE sérica.

Inmunoblots con sueros de pacientes alérgicos a LV

Posteriormente, se caracterizó el reconocimiento de estas proteínas de soja por sueros provenientes de pacientes alérgicos a PLV y PS (10) mediante inmunoblots. En la **tabla 2** se incluyen los resultados de IgE total sérica correspondiente a cada suero. Se incluyeron 2 sueros negativos en el análisis.

Tabla 2. Características de los sueros de individuos reactivos a PLV y PS.

Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml	Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml
1	0,326	0,167	454	7	0,969	0,324	236
2	0,445	0,145	196	8	1,369	0,223	435
3	0,578	0,199	371	9	0,861	0,244	311
4	0,310	0,312	462	10	1,191	0,311	360
5	0,332	0,322	633	11	0,120	0,083	588
6	1,267	0,246	294	12	0,080	0,078	54

Valores de corte: IgE esp. PS DO: 0,121; IgE esp. PLV DO: 0,128

Valor normal: IgE total: 60 UI/ml

En la **figura 3** se muestran los resultados de los inmunoblots de proteínas recombinantes P34, P28 y MBP (como control negativo) empleando sueros de pacientes alérgicos a PLV descriptos en la **tabla 2**. A la izquierda se muestra las calles completas de los inmunoblots de las tres proteínas frente al suero del paciente nro 3, a la derecha se muestran los resultados obtenidos con el resto de los sueros (sólo se muestra la porción del inmunoblot correspondiente a cada componente), arriba se muestran las bandas de las proteínas transferidas en las membranas y teñidas con Ponceau.

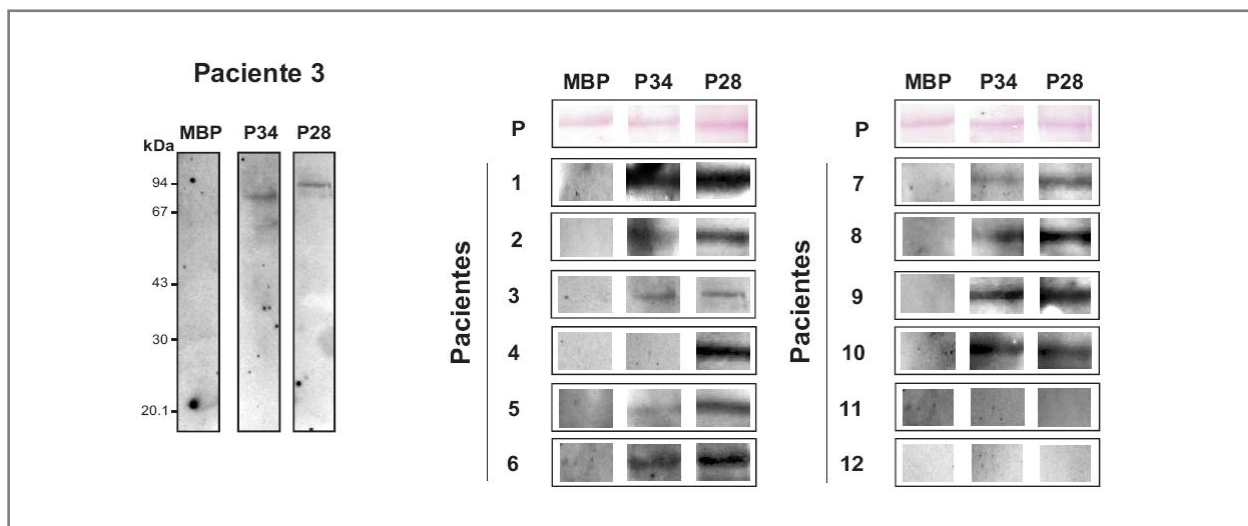


Figura 3. Inmunoblots con sueros de pacientes alérgicos a LV. Proteínas recombinantes MBP-P34 (P34), MBP-P28 (P28) y MBP (como control negativo) (2-3µg de proteína/calle) ensayadas contra sueros de pacientes alérgicos a PLV. En el panel de la izquierda se presentan los inmunoblots revelados con el suero del paciente 3. P: Ponceau.

Como puede observarse en la **figura 3** el 100% de los sueros de pacientes alérgicos a leche (10/10) han reconocido a P28, mientras que el 90% de los mismos (9/10) reconocen a P34. No se detectó reactividad frente a MBP con ninguno de los sueros analizados.

En conjunto, los resultados de los inmunoensayos IgE muestran que P34 y P28 son reconocidas por la IgE presente en el suero de pacientes alérgicos a PS y sueros de pacientes alérgicos a PLV, lo cual podría interpretarse en este último caso que existe una reactividad cruzada entre PLV y estas 2 proteínas recombinantes de soja. Por otro lado estos resultados demuestran que las proteínas de soja obtenidas en forma recombinante muestran la misma reactividad que las contrapartidas naturales presentes en los extractos obtenidos a partir de las semillas de soja, descartándose la posibilidad que la reactividad cruzada resida en la presencia de hidratos de carbono.

Inmunoblots empleando anticuerpos monoclonales específicos para caseínas bovinas

Para descartar la posibilidad de co-sensibilización en los pacientes alérgicos se revelaron los inmunoblots correspondientes a las proteínas de soja con mAbs específicos para las tres

caseínas bovinas: 1D5 (anti- α -caseína), 4C3 (anti- β -caseína) y 3B5 (anti- κ -caseína) previamente caracterizados (**figura 4**).

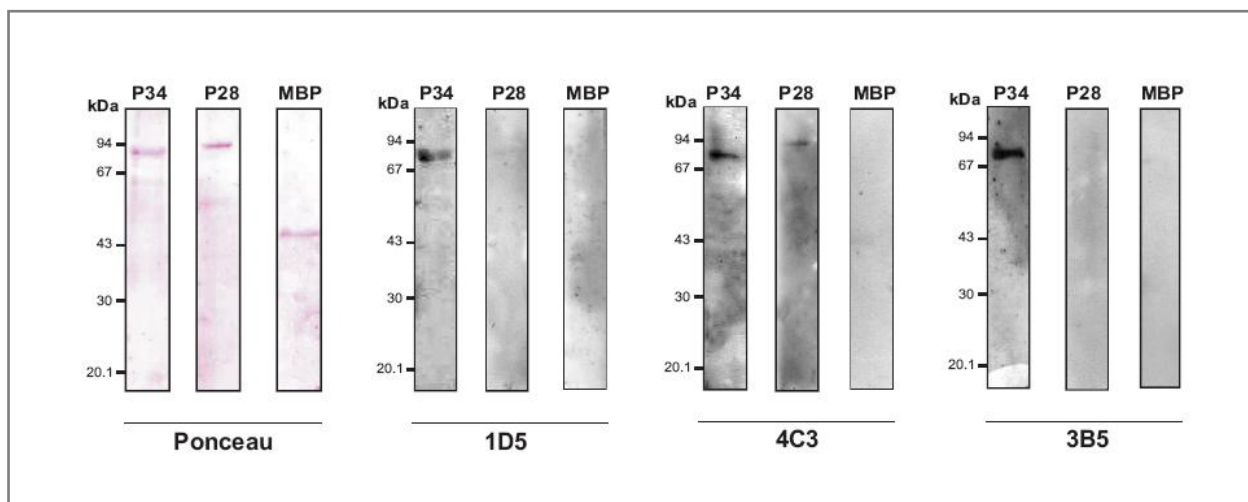


Figura 4. *Análisis por inmunoblot utilizando anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas. Se analizaron las proteínas recombinantes: MBP-P34 (P34), MBP-P28 (P28) y MBP (como control negativo) como antígeno y se revelaron con los mAbs específicos de α -, β - y κ -caseína. Se muestra con Ponceau la presencia de las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa.*

En la **figura 4** se observa que todos los mAbs reaccionaron con P34, mientras que sólo el mAb anti β -caseína reconoció débilmente a P28. Estos resultados nos permiten confirmar que existe una reactividad cruzada entre estas proteínas y las caseínas bovinas, existiendo epítopes B compartidos entre las distintas caseínas y P34, y entre β -caseína y P28.

ELISA de inhibición empleando el mAb 1D5 específico de α -caseína bovina

Para ahondar el estudio de la reactividad cruzada inmunoquímica y descartar la posibilidad de una reactividad originada por neo-epítopes originados al unir la proteína a una fase sólida, o durante el desarrollo de la electroforesis/transferencia, se llevó a cabo un ELISA competitivo utilizando el mAb 1D5 que compite por α -caseína en fase sólida y P34, P28, u OVA (como antígeno no relacionado), como inhibidores solubles. En la **figura 5** se muestran los resultados de los desplazamientos de la unión del mAb específico de α -caseína empleando distintas

concentraciones de los inhibidores antes mencionados. Se empleó como inhibidor control o Ag de identidad α -caseína en fase soluble.

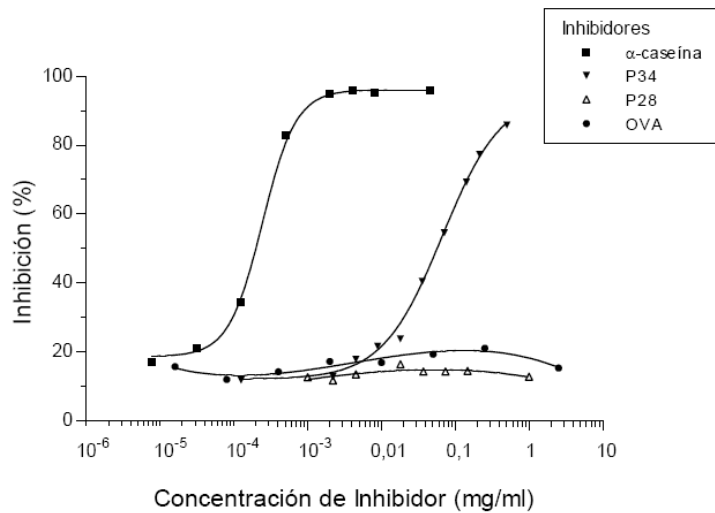


Figura 5. ELISA secuencial competitivo (ELISA de inhibición) utilizando el mAb 1D5 específico de α -caseína bovina. Los pocillos fueron sensibilizados con 0,25 μ g/pocillo de α -caseína bovina y se incubaron con una solución pre-mezclada de del mAb 1D5 (1/32000) con diferentes inhibidores solubles (α -caseína bovina, P34, P28 y OVA) a diferentes concentraciones (10^{-6} -2500 μ g/ml).

En la **figura 5** puede observarse que α -caseína en fase fluida desplaza en forma dosis dependiente la unión de 1D5 a su antígeno específico en fase sólida. Por otro lado, se observa un efecto similar con P34 y la forma sigmoidea de la curva de inhibición indica que la reacción antígeno-anticuerpo es específica. Por lo tanto, existe un reconocimiento del mAb 1D5 por epítopes presentes en P34. La unión del anticuerpo a α -caseína fue 100% inhibida utilizando una concentración de 0,02mg/ml de α -caseína soluble, mientras que el 50% de inhibición (IC50) se logró con 0,0002mg/ml de α -caseína. Cuando se empleó P34 como inhibidor no se alcanzó un 100% de desplazamiento, mientras que el IC50 fue de 0,05mg/ml. Estos resultados pueden interpretarse de la siguiente manera: se requiere una mayor concentración de P34 que α -caseína para lograr un 50% de desplazamiento, lo cual se debe a que P34 no es el antígeno de identidad del mAb 1D5, y por lo tanto el mAb 1D5 tiene menor afinidad por P34 en comparación con α -caseína; asimismo la imposibilidad de un total desplazamiento de la unión

de 1D5 por α -caseína puede deberse también a una diferencia de afinidades. Por otro lado, no se observó inhibición en el amplio rango de concentraciones ensayadas para P28 y OVA como inhibidores solubles, por lo cual estos antígenos no se comportan como proteínas de reactividad cruzada para este mAb. Los valores basales observados para OVA como antígeno no relacionado a las distintas concentraciones confirman la especificidad del ensayo. Estos ensayos nos permiten confirmar la reactividad cruzada entre P34 y α -caseína.

En conclusión los resultados de los inmunoblots y el ELISA de inhibición nos permiten afirmar que α -caseína comparte epitopes B con P34, mientras los resultados de los inmunoblots nos muestran que β -caseína comparte epitopes B con P28.

4.2. La proteína de soja Gly m Bd 30K (P34) desencadena una respuesta de hipersensibilidad en un modelo murino de alergia a la leche de vaca

Finalmente se evaluó la relevancia *in vivo* del co-reconocimiento inmunoquímico entre las PLV y los principales alérgenos de soja empleando el modelo murino alergia IgE-mediado a PLV en ratones de la cepa BALB/c desarrollado previamente por el grupo (Smaldini et al., 2012).

Para ello se realizó el plan de sensibilización que se describe en **materiales y métodos**. Brevemente, los ratones fueron agrupados en dos lotes de animales (n=8) según el tratamiento a recibir: **grupo control** y **grupo sensibilizado**.

En la **figura 6** se muestra esquemáticamente el protocolo experimental seguido.

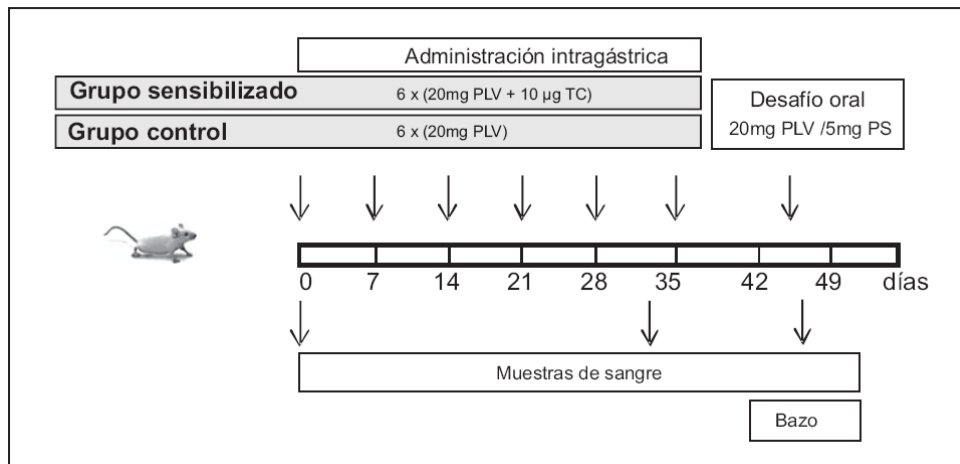


Figura 6. Protocolo experimental para el modelo murino de alergia alimentaria a PLV. Se agruparon los ratones Balb/c en dos lotes: **grupo sensibilizado:** los ratones recibieron por vía intragástrica (ig) los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: 10 µg de TC + 20 mg de PLV; **grupo control:** los ratones recibieron por vía ig 20 mg de PLV los mismos días. En el día 45 realizó en ambos grupos un desafío oral con PLV y PS por vía ig; y desafío sublingual (sl) con las proteínas recombinantes (P34, P28 y MBP). Se emplearon β-Lg como control positivo y OVA como antígeno no relacionado o control negativo. Al día 46 los animales fueron sacrificados para los distintos análisis.

4.2.1. Los ratones sensibilizados desarrollan signos clínicos post desafío

Tanto los ratones sensibilizados, como los ratones no sensibilizados recibieron a los 10 días de la última inmunización, un desafío oral, mediante la administración de PLV (20mg), PS (5mg) u OVA (10mg) por vía intragástrica (ig) o proteínas recombinantes: P34 (10µg), P28 (10µg), MBP (10µg), β-Lg (5µg) (como control positivo) y OVA (10µg) (como antígeno no relacionado) por vía sublingual (sl) con el fin de evaluar la aparición de signos clínicos locales y/o sistémicos a los minutos de la exposición. Para cuantificar los síntomas de hipersensibilidad inducidos a cada signo clínico se le asignó arbitrariamente un índice o puntaje de manera de semi-cuantificar la respuesta clínica al desafío oral en función de la intensidad de los mismos (**tabla 3**). Los puntajes clínicos asignados luego de la observación (a través de observadores independientes), entre los 30 y 45 minutos posteriores a la exposición oral son consecuencia de la activación IgE-mediada de células como mastocitos tisulares y basófilos en circulación.

Tabla 3. Puntajes asignados a los signos clínicos en el desafío oral

Puntaje	Síntomas
0	Sin síntomas.
1	Rascado de nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de nariz y cabeza.
2	Hinchazón 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.

Los resultados obtenidos inmediatamente a los desafíos post-sensibilización son los que se muestran en la **figura 7** y corresponden a uno de los experimentos realizados.

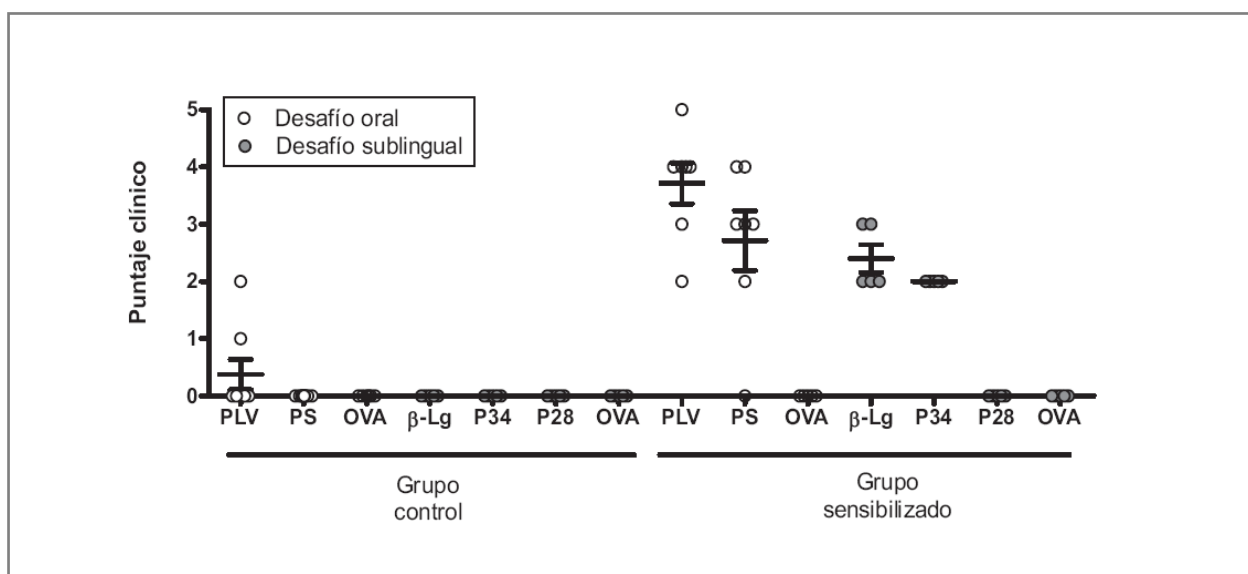


Figura 7. Signos clínicos observados post-desafíos frente a diferentes antígenos. El desafío se realizó el día 45 del protocolo (10 días luego de la última sensibilización) mediante la administración de proteínas por vía ig (PLV, PS u OVA) o si (β -Lg, P34, P28 o OVA). Los síntomas se observaron 30 min post-desafío y calificados de acuerdo con la **tabla 3**. Se grafica únicamente el puntaje más alto alcanzado por cada animal de cada uno de los lotes.

Puede apreciarse que los ratones sensibilizados mostraron signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria al ser desafiados oralmente con PLV y/o PS, mientras que los ratones del lote control no mostraron signos clínicos luego de los desafíos. Cuando los animales sensibilizados a PLV fueron desafiados sublingualmente con β -Lg (control positivo), PS o P34

recombinante purificada se observaron reacciones de hipersensibilidad inmediata comparables a cuando se los desafió con el mismo antígeno con que fueron sensibilizados (PLV). 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. Se observa además que los animales sensibilizados que fueron desafiados con P28 (sl) u OVA (ig/sl) no presentaron signos de hipersensibilidad.

Como parámetro experimental que refleja la inducción de los signos clínicos sistémicos se cuantificó la concentración de histamina plasmática luego del desafío oral con leche o con soja (figura 8).

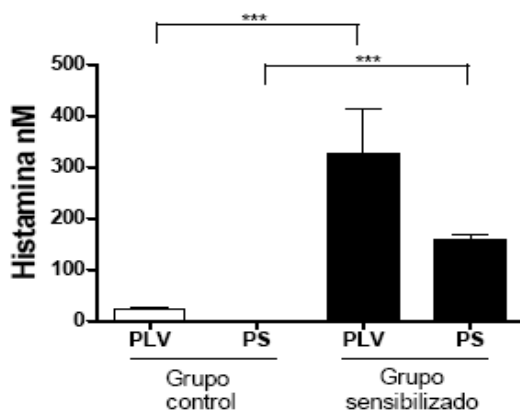


Figura 8. Niveles de histamina plasmática posterior al desafío. Los niveles de histamina se determinaron por ELISA en los plasmas recolectados 30 min luego del desafío oral con PLV o PS en ambos grupos de ratones (valores medios \pm SEM). Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,005$ ***.

Como puede observarse los animales sensibilizados con PLV que fueron desafiados con PLV y con PS poseen elevados niveles de histamina plasmática comparados con los valores obtenidos en el plasma de los animales del grupo control. Estos resultados muestran una concordancia absoluta entre los signos clínicos inducidos y un parámetro cuantificable sistémico.

En conclusión, los resultados obtenidos *in vivo* al desafiar con las PS a animales que han sido sensibilizados a PLV apoyan la relevancia clínica de la reactividad cruzada inmunoquímica descrita anteriormente. El hecho que se produzcan signos de hipersensibilidad inmediatos al desafío oral con PS indica la presencia de anticuerpos IgE (inducidos con la sensibilización con PLV) en la superficie de las células que son capaces de unir epítopes presentes en las PS.

4.2.2. La sensibilización de los ratones con PLV+TC promueve una respuesta de anticuerpos del tipo Th2 que además muestran reactividad cruzada

Posteriormente decidimos estudiar si la inducción de reacciones alérgicas *in vivo* se correlaciona con parámetros inmunológicos *in vitro*. Para tal fin se cuantificaron los niveles séricos de distintos isotipos de anticuerpos específicos para PLV, PS, P34, P28 y MBP mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos desarrollados en nuestro laboratorio (EAST y ELISA indirecto). Se midieron IgE e IgG1 como isotipos asociados a una respuesta Th2-dependiente, e IgG2a, como un isotipo asociado a una respuesta inmune asociada a la activación de linfocitos Th1. La relación entre IgG1 e IgG2a nos da información sobre el tipo de respuesta celular inducida en el modelo murino. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9**.

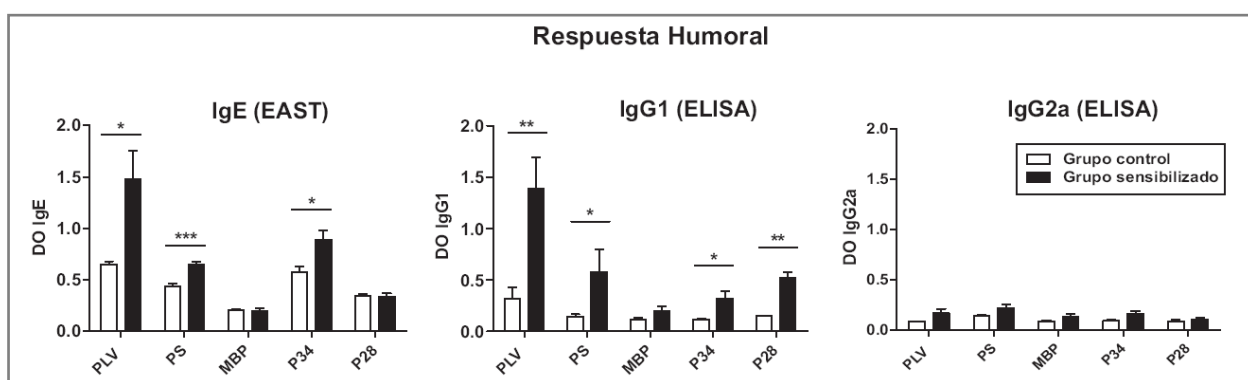


Figura 9. Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos específicos. Los niveles séricos de anticuerpos al día 46 se expresan como la densidad óptica (valores medios \pm SEM.) obtenida por EAST (IgE) o ELISA (IgG1 e IgG2a). Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como valores: *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Proteínas empleadas para sensibilizar las fases sólidas: PLV, PS, P34, P28 y MBP

Como se puede observar en la **figura 9**, los niveles séricos del isotipo IgE específico a PLV son significativamente mayores en el grupo sensibilizado comparado con el grupo control, lo cual indica que estos animales fueron sensibilizados de manera IgE-dependiente a PLV mediante el protocolo aplicado. Además los anticuerpos IgE específicos de PLV son capaces de unir PS y P34 (no así a P28 y MBP), lo cual muestra una concordancia absoluta con los resultados *in vivo*

mostrados anteriormente. El análisis de los isotipos IgG por ELISA mostró que IgG1 reconoce P34 y P28, mientras que IgG2a no reconoce ninguno de los antígenos utilizados, por lo cual la respuesta inmune humoral desencadenada durante la sensibilización es Th2-dependiente.

Si se comparan los valores de DO para los anticuerpos específicos de PLV que reconocen soja o P34 con respecto a PLV (antígeno de identidad) pueden apreciarse valores inferiores para el reconocimiento de soja y P34. Esto se debe a que sólo una fracción de los anticuerpos específicos de PLV es capaz de reconocer epitopes en PS y P34.

Estos resultados claramente indican, como se vio anteriormente en trabajos realizados en nuestro laboratorio (Smaldini et al., 2012), que la administración intragástrica de TC junto a PLV induce la síntesis de isotipos asociados a una respuesta Th2 o alérgica. Además, la aparición de IgE e IgG1 que reconocen PS y la proteína recombinante P34 de soja sólo puede explicarse por reactividad cruzada entre ambos sistemas proteicos dado que los animales sólo fueron sensibilizados con PLV. Por lo tanto la inducción de signos clínicos al administrar PS por vía ig o P34 por vía sl es consecuencia de la presencia de anticuerpos IgE específicos de PLV en la membrana de mastocitos y basófilos, con capacidad de reconocimiento de estas PS.

4.2.3. Esplenocitos estimulados con PLV, PS o proteínas recombinantes de soja secretan citoquinas del perfil Th2

Para correlacionar la respuesta inmune humoral con la respuesta inmune celular, se evaluó la inducción de linfocitos T específicos durante la sensibilización alérgica mediante la expansión *in vitro* de linfocitos T aislados del bazo empleando distintos antígenos. Luego se midió en los sobrenadantes de cultivo la concentración de citoquinas por ELISA de captura. Brevemente, luego de 24 hs del desafío oral los animales fueron sacrificados (grupo control y grupo sensibilizado), y se extrajo el bazo. Se prepararon suspensiones de células mononucleares y se estimularon las células con las siguientes proteínas antigénicas: PLV (350 µg/ml), PS (200 µg/ml), P34 (15 µg/ml), P28 (15 µg/ml) o MBP (7,5 µg/ml). Como controles del ensayo se empleó concanavalina A (Con A) (5 µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo. Luego de 72 hs de incubación se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos la

presencia de citoquinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5, IL-13). En la **figura 10** se muestran los resultados obtenidos.

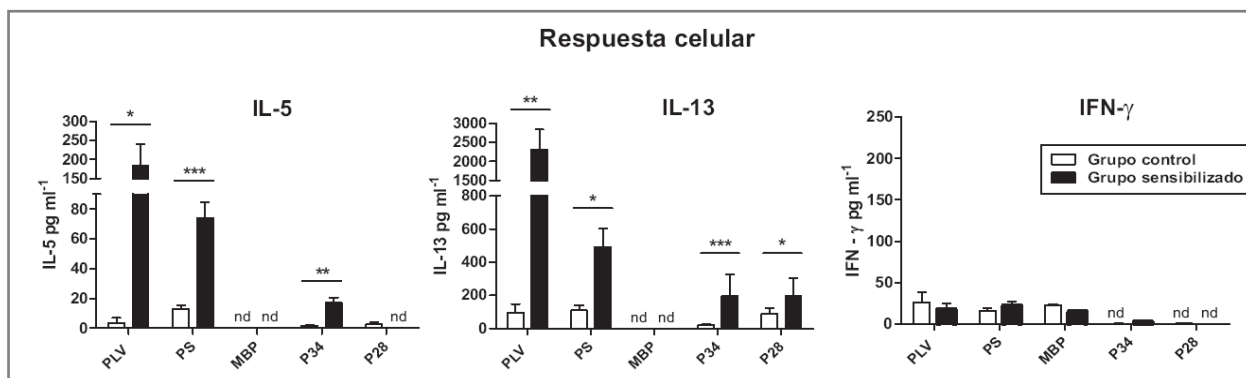


Figura 10. Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones de ambos grupos. Se obtuvieron los bazo 24 horas luego del desafío oral y los esplenocitos aislados de ratones de los grupos control y sensibilizados fueron estimulados *in vitro* con PLV (350 $\mu\text{g/ml}$), PS (200 $\mu\text{g/ml}$), P34 (15 $\mu\text{g/ml}$), P28 (15 $\mu\text{g/ml}$) o MBP (7,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas bajo atmósfera controlada. Se colectaron los sobrenadantes y se cuantificó mediante ELISA los niveles de IL-13, IL-5 e IFN- γ . Los sobrenadantes se analizaron por triplicado. Los datos se expresan como valores medios \pm SEM. Los resultados mostrados corresponden a un solo experimento con al menos tres ratones por condición, representativos de tres experimentos independientes que dieron resultados similares. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como valores: *** $P < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Como se muestra en la **figura 10** se encontró un aumento de los niveles de IL-5 e IL-13, con niveles basales de IFN- γ en los esplenocitos provenientes de los ratones del grupo sensibilizado, lo que refleja una respuesta inmune celular Th2 específica a las PLV. Cuando las células fueron estimuladas *in vitro* con PS se observó una expansión celular similar a la observada con PLV, aunque los niveles de citoquinas Th2 cuantificadas fueron marcadamente inferiores. Estos resultados indican que los linfocitos T específicos de PLV inducidos durante la sensibilización reconocen epítopes T de reactividad cruzada presentes en las PS. Cuando se utilizan las proteínas recombinantes P28 y P34 detoxificadas para estimular a los esplenocitos encontramos niveles elevados de IL-5 e IL-13 en los sobrenadantes de cultivo. No se indujo secreción de IFN- γ con cualquiera de los antígenos empleados. La menor secreción de citoquinas inducidas por PS podría indicar la estimulación de una población restringida de

linfocitos T. Sólo aquellos linfocitos T cuyos TCR reconocen los epitopes T de reactividad cruzada son capaces de ser estimulados *in vitro*.

Aunque los linfocitos Th2 y las inmunoglobulinas asociadas a una respuesta celular Th2-dependiente específicas de PLV son capaces de reconocer las PS, encontramos que fueron diferentes los perfiles de reactividad de anticuerpos y secreción de citoquinas en función de la proteína de soja recombinante analizada: P34 fue reconocida por IgG1 e IgE e induce la secreción de IL-5 e IL-13, mientras que P28 fue reconocida por IgG1 (y no por IgE) e induce la secreción de IL-13. Estos resultados indican que los epitopes B y los epitopes T presentes en P34 y P28 son diferentes.

Dado que los animales no fueron sensibilizados con PS, los resultados hallados con este antígeno sólo pueden explicarse por reactividad cruzada entre las distintas proteínas. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran una reactividad cruzada a nivel de linfocitos T y de linfocitos B entre caseínas bovinas y PS, que son los responsables de las reacciones alérgicas *in vivo*.

4.2.4. Antígenos de soja producen pruebas cutáneas positivas en ratones sensibilizados con PLV

Para confirmar *in vivo* la presencia de anticuerpos IgE específicos de PLV se estudió la presencia de mastocitos sensibilizados en piel frente a la administración de distintos antígenos. Para ello se realizaron pruebas cutáneas en ratones pertenecientes a los grupos control y sensibilizado. Como se mencionó anteriormente esta prueba evalúa la presencia de IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel. La administración subcutánea (sc) del antígeno y su unión y puenteo o entrecruzamiento de los anticuerpos IgE celulares induce la activación celular y la inducción de un foco inflamatorio que se evidencia por la extravasación del colorante azul de Evans inoculado en forma intravenosa (iv). Por lo tanto la evidencia de una coloración azul a los minutos de inyectado el antígeno evidencia la presencia de anticuerpos IgE en la superficie de los mastocitos tisulares o basófilos en circulación.

De esta manera se realizaron PC en ratones sensibilizados y en ratones del grupo control con: PLV (200 μ g), PS (400 μ g), las proteínas recombinantes: P34 (10 μ g), P28 (10 μ g) y como controles negativos: solución fisiológica (SF) y MBP (10 μ g).

En las fotos de la **figura 11** se muestran los resultados en ratones del grupo sensibilizado (panel superior) y en ratones del grupo control (panel inferior).

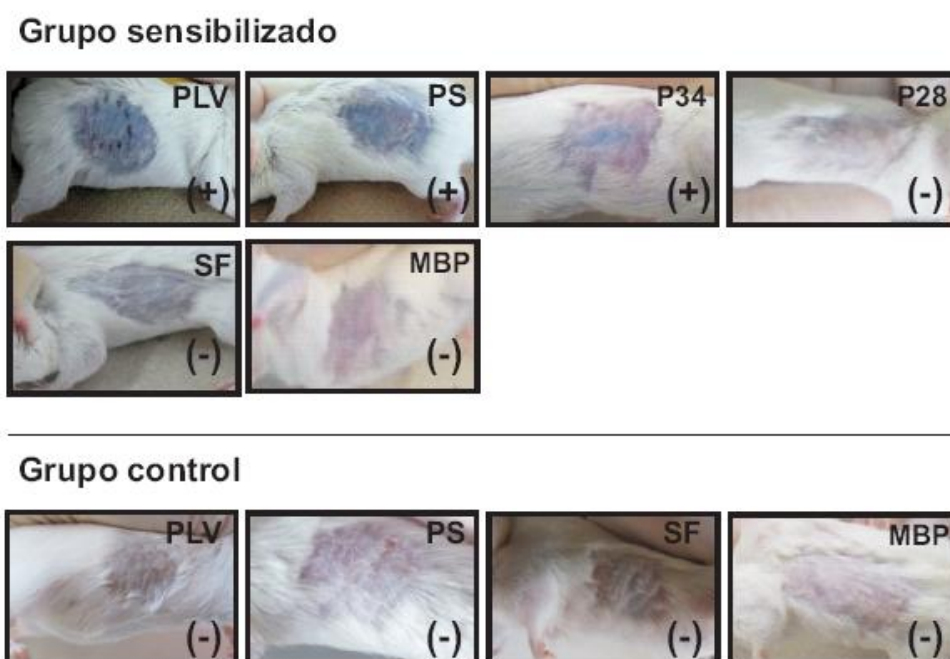


Figura 11. Prueba cutánea. Los ratones sensibilizados (panel superior) y los ratones control (panel inferior) fueron inyectados por vía sc con PLV, PS, P34 o P28 (flanco derecho) y solución salina (SF) o MBP (flanco izquierdo). El azul de Evans se inyectó por vía iv por la vena de la cola. La presencia de color azul en la piel en la zona de inoculación del antígeno a los 15-30 minutos se consideró una prueba cutánea positiva.

Por lo tanto observamos que PLV y PS inducen PC positivas en ratones sensibilizados, mientras que sólo P34 dio resultado positivo. Los animales del grupo control dieron resultados negativos con todas las proteínas ensayadas. Estos resultados muestran que P34 presenta al menos dos epitopes B capaces de unir *in vivo* al menos dos moléculas de IgE e inducir una respuesta inflamatoria tisular. No se observó reacción positiva cuando ratones sensibilizados fueron inoculados con MBP. El hecho que P28 diera una prueba cutánea negativa, confirma los resultados previos de IgE sérica.

En conjunto los resultados mostrados confirman que el plan de sensibilización indujo la síntesis de anticuerpos del isotipo IgE específicos a PLV que reconocen también a componentes de las PS, en particular a P34, y que tienen la capacidad de unirse a la IgE específica presente en la superficie de mastocitos para inducir la activación celular y la generación de un foco inflamatorio. Esta reacción junto a la inducción de reacciones de hipersensibilidad post-desafío oral constituyen la validación *in vivo* de los resultados *in vitro* e inmunoquímicos previamente obtenidos. Estas reacciones biológicas se corresponden con los niveles elevados de histamina hallados en el plasma de los ratones.

5. Discusión

Aunque la población en general se encuentra altamente expuesta a los alérgenos de la soja, los casos de alergia primaria a la soja son escasos, al menos en la población europea (Ballmer-Weber et al., 2007). A pesar de que se cree que las reacciones alérgicas a las leguminosas en general se producen por sensibilización primaria a través del tracto gastrointestinal, la alergia a soja se cree que es más común como una alergia secundaria, producto de reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (Ballmer-Weber et al., 2007). Lo mismo ocurre en el caso de algunos pacientes ALV (15–45%) que reciben formulaciones a base de PS como sustituto lácteo durante el tratamiento restrictivo (Ahn et al., 2003; Katz et al., 2008; Zeiger et al., 1999).

Nuestro grupo ha identificado determinantes estructurales comunes entre las caseínas y dos proteínas de soja, Gly m 6 G4 (glicinina A4A5B3) y Gly m 5.0101 (subunidad α de la β -conglucina) (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002 y en el capítulo I de esta tesis), y hemos estudiado *in vivo* esta reactividad cruzada inmunológica utilizando el modelo murino alergia IgE-mediado a leche de vaca (Smaldini et al., 2012).

En este capítulo el análisis se centró en otras dos proteínas de soja que se consideran como los alérgenos principales de la misma y que no han sido previamente reconocidos como alérgenos de reactividad cruzada. Se clonaron a partir de una biblioteca de semillas de soja y se obtuvieron de forma recombinante los alérgenos Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28), ambas fusionadas a MBP (también se clonó y purificó la proteína MBP utilizada en cada ensayo como control negativo) para la caracterización *in vitro* e *in vivo* de la reactividad cruzada entre estas proteínas filogenéticamente no relacionadas (PS y PLV).

Aunque la alergenidad *in vitro* de P34, incluyendo epítopos B y T (Morita et al., 2011), ha sido ampliamente descrita, su relevancia clínica aún no se ha confirmado. En este trabajo, se mostró que P34 fue reconocida por IgE de sueros de pacientes alérgicos, por diferentes anticuerpos monoclonales específicos de caseínas y por anticuerpos de los isotipos IgE e IgG1 específicos a PLV de ratones alérgicos a la leche de vaca. Se observó también que los esplenocitos murinos inducidos por sensibilización con PLV pueden ser expandidos *in vitro* mediante el empleo de PLV, PS o P34, y que las células activadas secretan IL-5 e IL-13, sin secreción de IFN- γ . Esto

refleja una respuesta inmune celular Th2 específica a PLV en ratones sensibilizados, en la cual los linfocitos T presentan TCR capaces de reconocer epitopes T en componentes de soja. Consistentemente con la respuesta inmune Th2 inducida, se observó una reacción cutánea inmediata y también síntomas de hipersensibilidad en los ratones sensibilizados cuando se los expuso a P5 y a P34, sugiriendo la presencia de al menos dos epitopes de IgE con una distribución superficial que activa una sinapsis entre la molécula alergénica y la célula sensibilizada.

A pesar de que P28, Gly m 6 G4 (A4A5B3) y Gly m 5.0101, contienen dos dominios cupinas, fueron reconocidos de forma diferencial por diferentes anticuerpos monoclonales específicos a caseínas. Aquí mostramos que la P28 fue reconocida sólo débilmente por el mAb IgG1 específico a β -caseína hecho en ratón (mAb 4C3) (Curciarello et al., 2008; Docena et al., 2002; Rozenfeld et al., 2002; Xiang et al., 2004). Además, si bien P28 es reconocida por los sueros de pacientes que contienen IgE específica a PLV, no se puede asegurar que los pacientes fueron sensibilizados sólo a PLV, ya que es muy difícil conocer el perfil de sensibilización del paciente. El uso de un modelo de ratón de alergia alimentaria puede aclarar este punto ya que las pruebas se realizan en animales con una dieta especial y en condiciones controladas. A pesar que los animales fueron sensibilizados exclusivamente con PLV, presentan IgE, IgG1 y linfocitos T con capacidad de reconocer P34 y P28, aunque de manera diferencial.

Los miembros de la superfamilia de cupinas, comparten diferentes grados de identidad secuencial (Breiteneder and Mills, 2005; Miles et al., 2005; Tsuji et al., 2001a). Sin embargo, la literatura expresa poca evidencia de motivos IgE conservados que puedan explicar la predicción de reactividad cruzada. Xiang et al. ha identificado epitopes IgE lineales dominantes expuestos en la superficie del dominio de cupina que fue reconocido por los sueros de pacientes sensibles al maní y a soja (Xiang et al., 2002, 2002). Consideramos que el nivel bajo de identidad de secuencia (inferior al 40%) puede ser responsable de la baja evidencia de reactividad cruzada IgE entre ellos (Wensing et al., 2003). Los resultados obtenidos en nuestro estudio con el ELISA competitivo, el desafío sublingual y la prueba cutánea con P28 en los ratones alérgicos proporcionan una evidencia sólida para rebatir una potencial alergenicidad cruzada entre este componente de soja y las caseínas bovinas.

A diferencia de otras proteasas cisteínicas del polen y del césped que se han asociado con la alteración del equilibrio proteasa–antiproteasa en tejidos de la mucosa (Wensing et al., 2003), la alergenicidad de P34 (proteasa inactiva) probablemente deba estar asociada a otra característica fisicoquímica que determina su capacidad de activar el sistema inmune rompiendo la tolerancia. Aquí, hemos demostrado que P34 contiene epitopes B y T de reactividad cruzada con PLV, que es capaz de promover síntomas de hipersensibilidad después de la exposición sublingual y da una prueba cutánea positiva en ratones sensibilizados a la leche. Estos resultados muestran que la reactividad cruzada inmunoquímica descrita para P34 puede ser clínicamente relevante en los pacientes alérgicos. Se necesitan más estudios para comprender la respuesta inmune diferencial observada entre los alergenos de la soja con reactividad cruzada, y para delinear los alcances y limitaciones del uso de sueros de reactividad cruzada de IgE en el diagnóstico de alergias alimentarias. Se sabe que el co–reconocimiento por los sueros es más amplio que la reactividad clínica, y la información obtenida con estas proteínas puede ayudar a entender este fenómeno. En este sentido, los modelos animales constituyen una herramienta sumamente útil que nos permite correlacionar cualquier dato encontrado en sueros con IgE con un cuadro clínico. Este punto es crítico para el diagnóstico y tratamiento de las alergias alimentarias, donde existen limitaciones éticas.

En conclusión, a través del estudio in vitro e in vivo de los alergenos mayores de la soja mostramos la reactividad cruzada diferencial de ambas proteínas con las caseínas bovinas. Significativamente se mostró que P34 contiene epitopes B y T de reactividad cruzada con PLV, que es capaz de promover síntomas de hipersensibilidad después de la exposición sublingual y da una prueba cutánea positiva en ratones sensibilizados a la leche, información muy relevante al momento de explotar esta reactividad cruzada en una terapia inmunomodulatoria.

**CAPÍTULO III – EMPLEO DE LA PROTEÍNA DE SOJA Gly m
Bd 30K DE REACTIVIDAD CRUZADA CON LECHE DE VACA
PARA EL DESARROLLO DE UNA INMUNOTERAPIA
TOLEROGÉNICA EN EL MODELO MURINO DE ALERGIA A
LECHE DE VACA**

1. Generalidades

El desarrollo de distintos modelos animales de alergia alimentaria ha permitido estudiar y comprender aspectos moleculares y celulares que gobiernan las reacciones alérgicas, predecir reacciones alérgicas que podrían ser originadas por alimentos potencialmente alergénicos y han servido también para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas (Finkelman et al., 2005). La especie animal más comúnmente empleada en estos modelos es el ratón por distintos motivos: conocimiento del genoma, amplia disponibilidad de reactivos específicos (anticuerpos específicos contra distintas proteínas de interés inmunológico, citoquinas, etc), facilidad para su reproducción y mantenimiento, facilidad para su manipulación, existencia de numerosas cepas, y por la posibilidad de su modificación genética (animales transgénicos y knock out para distintos genes relacionados con la fisiología del sistema inmune), etc (Dearman and Kimber, 2009; Finotto et al., 2002; Helm and Burks, 2002).

La respuesta fisiológica en ratones frente a la exposición a un antígeno que ingresa por el tracto gastrointestinal es la inducción de tolerancia inmunológica, y no existe en esta especie la alergia. Este hecho implica una marcada diferencia con respecto a la inducción de la patología en humanos, y la necesidad de tener que recurrir a un procedimiento artificial, en comparación a las condiciones de inducción de una alergia en humanos, para generar una reacción de este tipo. Por esta razón el desarrollo de modelos murinos de alergia implica una fase inicial de sensibilización, en la cual en general se emplean adyuvantes junto al antígeno de interés, y un desafío oral donde se ponen de manifiesto los mecanismos de hipersensibilidad. Por lo tanto, los alcances de estos modelos se ven restringidos casi exclusivamente al estudio de la fase efectora de estas enfermedades. En la mayoría de los trabajos se emplean ratones sensibilizados por vía sistémica (intraperitoneal) en los que se inducen reacciones mucosales (gastrointestinal, cutánea, pulmonar) por desafío con el antígeno de interés (Berin and Mayer, 2009). También existen cepas en las cuales la administración repetitiva del antígeno por vía oral permite inducir mecanismos de hipersensibilidad, pero resultan modelos que sólo reflejan muy parcialmente lo que ocurre en la alergia alimentaria en humanos (Parvataneni et al., 2009). En este capítulo, al igual que en la segunda mitad del capítulo anterior, emplearemos ratones BALB/c que son sensibilizados por tratamiento con toxina colérica como adyuvante mucosal (Agren et al., 1997) y con proteínas de leche bovina como alergenos, para la inducción de una

respuesta inmune local y sistémica antígeno-específica y Th2-dependiente. Por lo tanto en nuestro modelo se refleja bastante ajustadamente lo que ocurre en la mucosa gastrointestinal de un individuo con una alergia alimentaria (Beyer et al., 2002; Vandezande et al., 1999).

Disponer de estos modelos animales junto a la profundización en el conocimiento de 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. En consecuencia este caudal de información posibilita el planteo y estudio de nuevas y prometedoras terapias para el tratamiento de esta patología (Akdis and Akdis, 2009; Broide, 2009; Cardoso et al., 2008; Ganeshan et al., 2009).

Una de las estrategias para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades donde la desregulación del sistema inmunológico juega un rol importante es la inducción de tolerancia inmunológica (Akdis and Akdis, 2007; Akdis et al., 2006; Durham et al., 1999; Larché, 2006). Los tratamientos de inmunoterapia vigentes se basan en la inducción de tolerancia en las mucosas administrando el mismo alérgeno que induce una reacción de hipersensibilidad, en otras condiciones (vías de administración, frecuencia, cantidad, etc). En este trabajo en particular, proponemos una estrategia para el tratamiento de la ALV que pone en juego los conceptos de reactividad cruzada e inmunoterapia tolerogénica con el fin de aliviar o eliminar los signos clínicos inducidos por exposición de los animales "alérgicos" al alérgeno. En la literatura es infrecuente encontrar trabajos que apliquen estos conceptos en el estudio de la reactividad cruzada entre alérgenos. 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 (Zhang et al., 2008), basándose en la homología existente entre alérgenos de soja y maní (vicilinas y leguminas). En ambos casos la inmunoterapia alérgeno específica con alérgenos de maní presentaba efectos adversos y su reemplazo por proteínas de soja (alérgeno de reactividad cruzada con maní) demostró una efectiva desensibilización o disminución en la intensidad de la respuesta inmune a proteínas de maní.

En nuestro laboratorio se logró la inducción de tolerancia oral en ratones sensibilizados a PLV con toxina colérica (TC) luego del pretratamiento de los ratones con PLV o PS. Observamos la

inducción de tolerancia sistémica (disminución de las manifestaciones clínicas luego del desafío oral, disminución de los niveles séricos de IgE específicos, disminución de la secreción de citoquinas de perfil Th2 en bazo) y tolerancia a nivel de mucosa intestinal (aumento de linfocitos Treg CD4+ Foxp3+, disminución de la expresión de citoquinas de perfil Th2 y aumento de citoquinas regulatorias, principalmente IL-10).

Por lo tanto aquí aplicamos el modelo murino alergia a proteínas de leche de vaca descrito (Smaldini et al., 2012) como una herramienta *in vivo* para el desarrollo y estudio de una inmunoterapia tendiente a generar tolerancia frente a PLV mediante la administración de la proteína de soja P34.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos

La alergia a la leche de vaca es la alergia alimentaria más común en los niños. Hasta el momento no existe un tratamiento establecido y aprobado para prevenir o curar la alergia alimentaria. Basados en los estudios de reactividad cruzada entre las PLV y P34 planteamos el uso de esta proteína de soja, de menor inmunogenicidad que las caseínas bovinas, para el desarrollo de una inmunoterapia tendiente a disminuir los signos clínicos de la alergia a la leche vacuna.

El propósito de este capítulo entonces fue aplicar la información desarrollada en los capítulos anteriores para el diseño de una terapia tolerogénica en un modelo animal de alergia alimentaria a leche de vaca IgE-mediado empleando la proteína de soja P34.

3. Diseño experimental

En la **figura 1** se muestra esquemáticamente el protocolo experimental de inmunoterapia sublingual seguido, en el cual se emplea el modelo murino previamente descrito al que se le incorporó una etapa de tolerización. Con este fin se administraron dosis bajas del antígeno por vía sl (PLV ó proteína recombinante P34), previo a la sensibilización (PLV + TC) con el objetivo de inducir tolerancia oral a partir de la exposición al antígeno en la mucosa bucal.

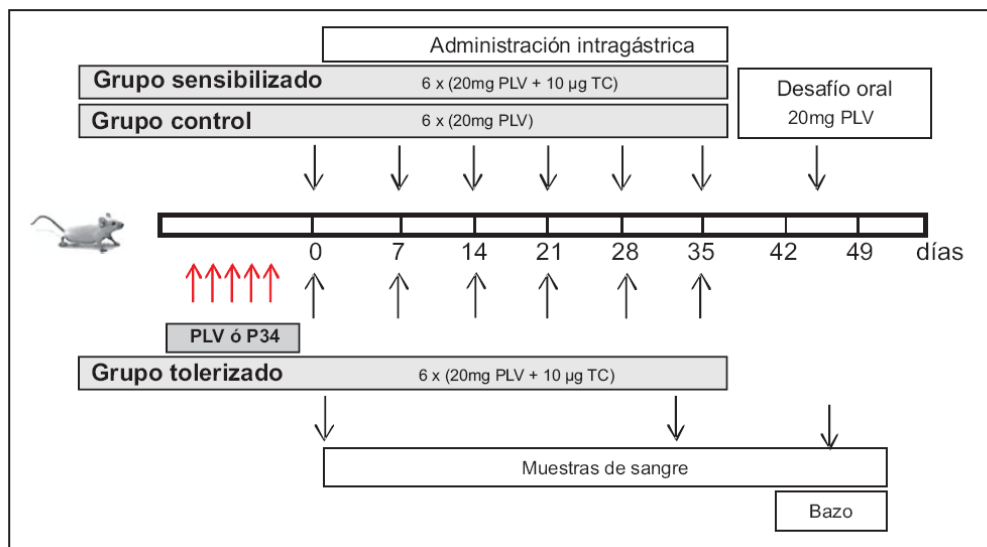


Figura 1. Protocolo experimental del plan de tolerización aplicado en el modelo murino de alergia alimentaria a PLV. Se agruparon los ratones Balb/c en cuatro lotes: **grupo sensibilizado:** los ratones recibieron por vía intragástrica (ig) los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: 10 µg de TC + 20 mg de PLV; **grupo control:** los ratones recibieron por vía ig 20 mg de PLV los mismos días; **grupo Tol-PLV:** administración de 20 µg PLV diarios por vía sl (5 dosis) previo a la sensibilización, luego 10 µg de TC + 20 mg de PLV; **grupo Tol-P34:** administración de 20 µg de P34 diarios (5 dosis) por vía sl previo a la sensibilización, luego 10 µg de TC + 20 mg de PLV. En el día 45 realizó en todos los grupos de animales un desafío oral con PLV por vía ig. Las flechas negras indican los días en los que se realizó cada inoculación ig. Con flechas rojas se indican las administraciones sl durante los 5 días previos a la sensibilización. Se indican los días del muestreo de sangre y obtención de los bazos (día 46) para los distintos análisis.

Se trabajó con ratones BALB/c de 5 semanas los cuales fueron agrupados en cuatro lotes de seis ratones cada uno como se describe en **figura 1**. El lote control sólo recibió PLV y se lo denominó **grupo control**; el lote que recibió PLV con TC se lo denominó **grupo sensibilizado**, y

los lotes tolerizados, es decir que recibieron 5 días previos a la sensibilización PLV ó P34 y luego se les administró, al igual que al grupo sensibilizado, PLV junto a TC. A estos dos lotes de animales tolerizados se los llamó **grupo control tolerizado con PLV (Tol-PLV)** y **grupo tolerizado con P34 (Tol-P34)** respectivamente.

Al finalizar los protocolos de sensibilización, 45 días después del inicio, los ratones fueron desafiados oralmente con el antígeno (fase efectora) y luego fueron sacrificados para su estudio.

4. Resultados

4.1. Los animales pretratados muestran una disminución de la sintomatología alérgica frente al desafío antigénico

Una vez concluida la etapa de sensibilización intragástrica, se realizó un desafío oral y se analizaron los signos clínicos comparando los animales sensibilizados con los tolerizados. En la **figura 2**, se muestran los puntajes asignados según los signos clínicos de cada ratón correspondiente a un experimento representativo. Como puede observarse, la aplicación de este protocolo de tolerización permitió la disminución en la sintomatología observada tanto de los animales tolerizados con PLV (Tol-PLV), como en los ratones tolerizados con P34 (Tol-P34), respecto de los ratones sensibilizados. Los ratones de los grupos controles no presentaron signos de hipersensibilidad de significancia.

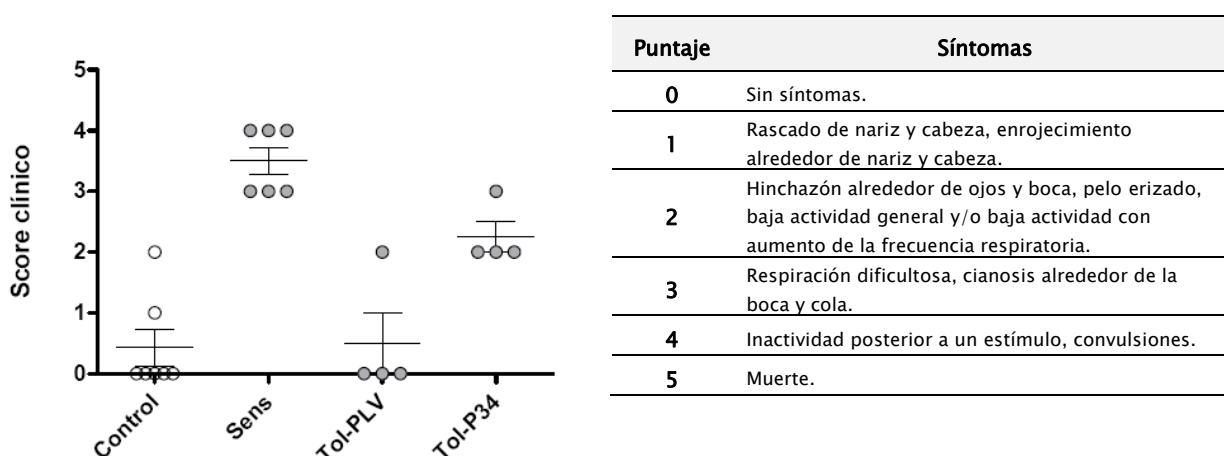


Figura 2. Signos clínicos observados post-desafío frente a las PLV. El desafío se realizó el día 45 del protocolo (10 días luego de la última sensibilización) mediante la administración de PLV por vía ig. Los síntomas se observaron 30 min post-desafío y calificados de acuerdo con la tabla a la derecha por distintos observadores (*idem* tabla 3 del Capítulo II).

Estos datos *in vivo* muestran que animales pretratados tanto con PLV (antígeno identidad) como aquellos pretratados con P34 (proteína de reactividad cruzada), y luego sensibilizados con PLV+TC, manifiestan una menor reactividad clínica al exponerlos oralmente a PLV.

4.2. Los tratamientos tolerizantes provocan una variación en los niveles séricos de los diferentes isotipos de anticuerpos

Posteriormente decidimos estudiar si la disminución de reacciones alérgicas *in vivo* logradas con los tratamientos tolerizantes se correlaciona con parámetros inmunológicos *in vitro*. Para ello se estudió la inmunidad humoral a través de los niveles séricos de los distintos isotipos de anticuerpos específicos de PLV. En la **figura 3** se muestran los resultados de los niveles séricos de IgE, IgG1 e IgG2a específicos a PLV para los distintos grupos.

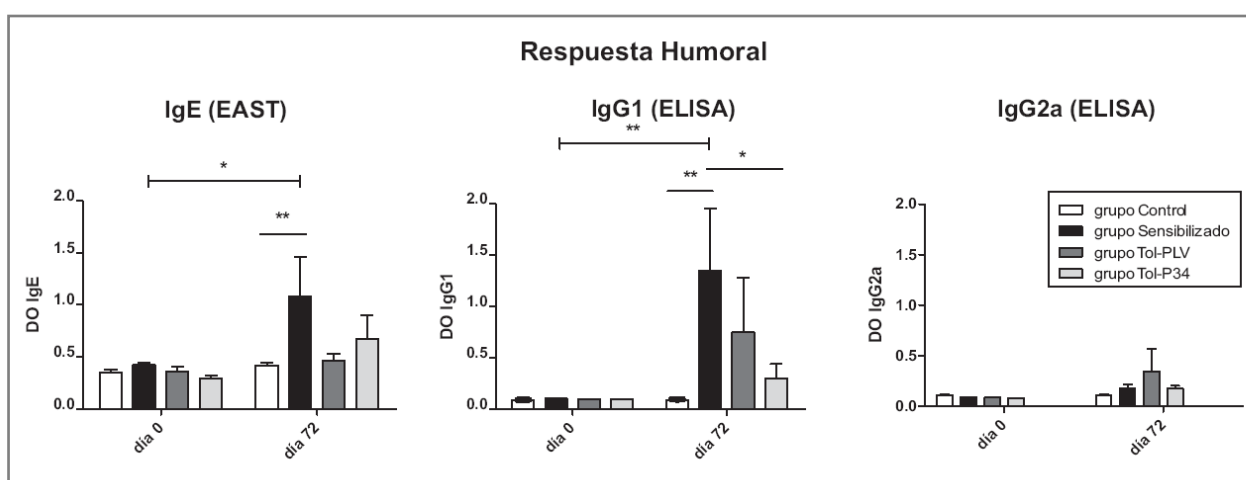


Figura 3. Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos específicos a PLV en los diferentes grupos de animales. Los niveles séricos de los diferentes isotipos de anticuerpos específicos a PLV al día 46 se expresan como la densidad óptica (valores medios \pm SEM.) obtenida por EAST (IgE) o ELISA (IgG1 e IgG2a). Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como valores: *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Con respecto a la IgE se observó que los niveles alcanzados para los animales del grupo sensibilizado son estadísticamente significativos con respecto al grupo control, mientras que los animales tolerizados con PLV mostraron un descenso de IgE, si bien estadísticamente estos resultados no son significativos, estos resultados por lo tanto no sólo marcan una clara tendencia, sino que permiten comprender los resultados *in vivo* observados. El isotipo IgG1 muestra como es de esperar un aumento significativo al comparar el grupo control con el sensibilizado, y una disminución en los niveles del isotipo sérico específico para ambos grupos

pretratados, con una disminución significativa en los niveles del grupo Tol-P34 con respecto al grupo sensibilizado.

Con respecto a los niveles séricos de IgG2a específica no se observaron incrementos en ninguno de los grupos de animales estudiados. Esto permite inferir que la administración previa de los antígenos por vía oral no induce la aparición de una respuesta humoral Th1-dependiente.

4.3. No se detectan niveles de interleuquinas del perfil Th2 en ratones pretratados

Para correlacionar la respuesta inmune humoral con la respuesta inmune celular, se evaluó la inducción de linfocitos T específicos durante la sensibilización mediante la expansión *in vitro* de linfocitos T aislados del bazo. En este caso los animales de distintos lotes fueron sacrificados 24hs luego del desafío oral, se aislaron los bazos, y a partir de la suspensión de esplenocitos se realizaron cultivos en presencia de PLV, RPMI como control negativo y concanavalina A como control positivo. Luego de 72 hs de incubación se cuantificó en el sobrenadante de cultivo, mediante un ELISA de captura, los niveles de citoquinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5, IL-13).

Como puede observarse en la **figura 4**, el grupo sensibilizado presentó niveles elevados y estadísticamente significativos de IL-5 e IL-13 con respecto a esplenocitos provenientes de animales del grupo control, al expandirlos con PLV *in vitro*. Remarcablemente; células provenientes de los animales pertenecientes a los grupos tolerizados (Tol-PLV y Tol-P34) mostraron niveles no detectables (significativamente menores con respecto a los obtenidos en ratones del grupo sensibilizado) de IL-5 e IL-13. Los niveles de IFN- γ detectados corresponden a valores basales en todos los grupos y no se encuentran diferencias significativas al comparar los mismos. Por lo tanto, estos resultados reflejan la inducción de una respuesta Th2 en los animales sensibilizados, y su control frente al tratamiento previo con los antígenos por vía oral, y se correlacionan con los resultados de la respuesta inmune humoral mostrada en la sección anterior para los distintos grupos de animales.

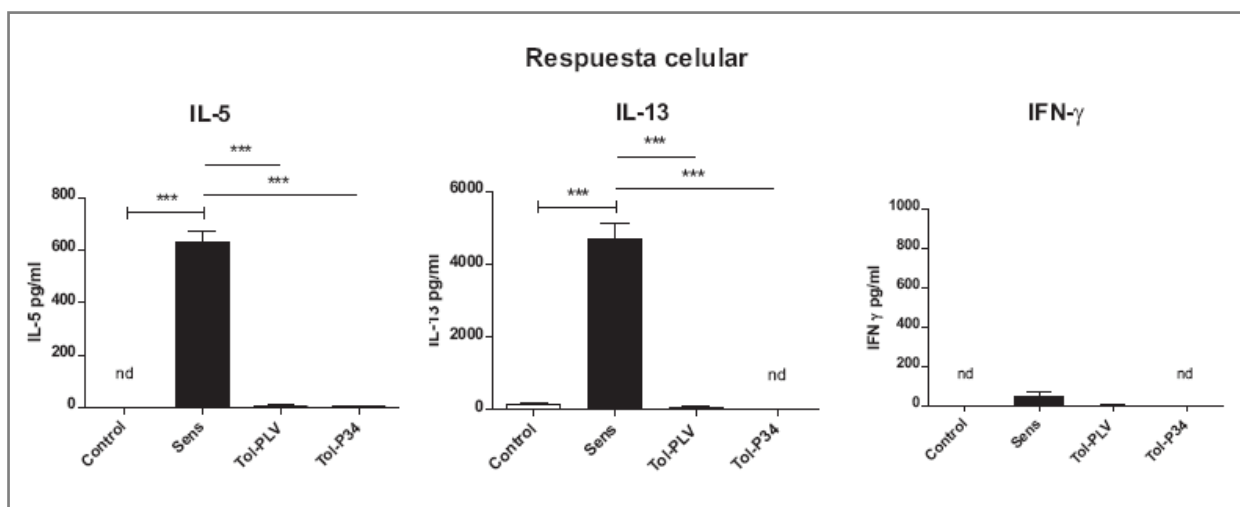


Figura 4 *Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones de cada grupo. Se obtuvieron los bazo 24 horas luego del desafío oral y los esplenocitos aislados provenientes de los ratones de los cuatro grupos fueron estimulados in vitro con PLV (350 µg/ml), durante 72 horas bajo atmósfera controlada. Se colectaron los sobrenadantes y se cuantificó mediante ELISA los niveles de IL-13, IL-5 e IFN-γ. Los sobrenadantes se analizaron por triplicado. Los datos se expresan como valores medios ± SEM. Los resultados mostrados corresponden a un solo experimento con al menos tres ratones por condición, representativos de tres experimentos separados que dieron resultados similares. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como valores: *** $P < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.*

4.4. La prueba cutánea fue negativa en los ratones sometidos al tratamiento de tolerización

Se realizó la prueba cutánea con PLV para evaluar *in vivo* la presencia de anticuerpos IgE específicos de PLV funcionales en la superficie de las células en ratones pertenecientes a los cuatro grupos.

En las fotos de la **figura 5** se muestran los resultados correspondientes a algunos animales del grupo sensibilizado, grupo control (panel superior) y grupos pretratados (panel inferior).

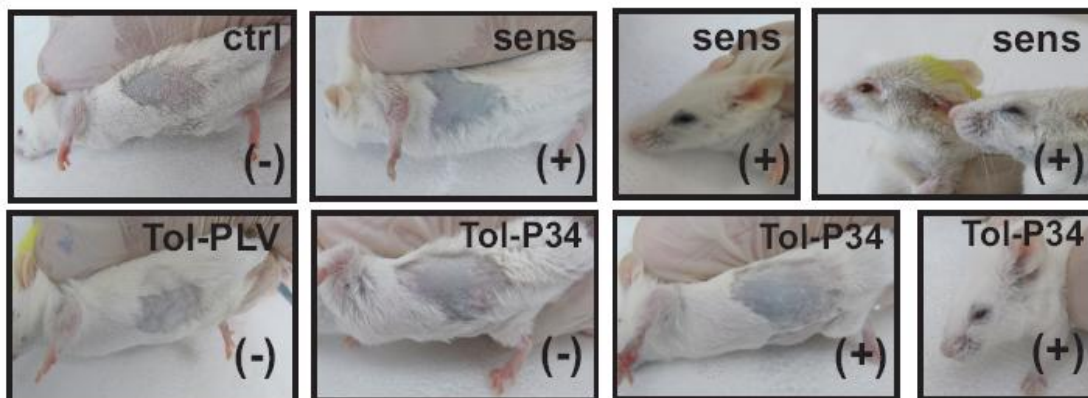


Figura 5. Prueba cutánea. Los animales pertenecientes a los grupos sensibilizado y control (panel superior) y a los grupos Tol- PLV y Tol-P34 (panel inferior) fueron inyectados por vía sc con PLV (flanco derecho) y con SF (flanco izquierdo). El azul de Evans se inyectó por vía iv por la vena de la cola. La presencia de color azul en la piel en la zona de inoculación del antígeno a los 15–30 minutos se consideró una prueba cutánea positiva. Estos resultados corresponden a un experimento representativo, sólo se incluye la foto de un animal de cada grupo salvo para el caso de P34 donde se muestran dos ratones uno con la prueba positiva y otro negativa.

En aquellos animales pertenecientes al grupo sensibilizado se observó una extravasación inmediata (10–20 minutos) del colorante azul de Evans en la región inoculada subcutáneamente en casi todos los ratones del lote (5/6). Mientras que en los grupos controles y Tol-PLV no se produjo la extravasación del colorante en ningún animal. Solamente en el grupo Tol-P34 se observó extravasación del colorante en el 50% de los ratones (3/6), que coinciden con los animales en los que el dosaje de IgE e IgG1 dieron niveles más elevados. También se inoculó como control solución fisiológica (SF) en el flanco opuesto de cada ratón, dando reacción negativa en el 100% de los animales de cada grupo. Es importante resaltar que todos los animales sensibilizados con PLV tuvieron una PC negativa con PLV cuando fueron pretratados con PLV

En conclusión, con los pretratamientos aplicados hemos encontrado una disminución de las manifestaciones clínicas inducidas por la exposición al alérgeno, una disminución en los niveles de IgE e IgG1 (pero no se observó una disminución significativa en los niveles de IgE específica a PLV), una disminución en la secreción de IL-5 e IL-13 en los ratones de los grupos tolerizados (Tol-PLV y Tol-P34) respecto del grupo sensibilizado y una negativización parcial

de la prueba cutánea. Los resultados hallados resultan de lo más alentadores ya que nos permiten concluir que el protocolo de tolerización aplicado por vía si tanto del antígeno de identidad, como del antígeno de reactividad cruzada P34, logran disminuir las reacciones de hipersensibilidad, la inmunidad humoral y celular Th2–específica de PLV, como así también negativizar la mayoría de las pruebas cutáneas.

4.5. Se logró inducir linfocitos T regulatorios en las mucosas de los animales pre-tratados

Se sabe que las células T reguladoras (Treg) son producidas naturalmente en el timo (nTreg) o inducidas en tejidos periféricos (iTreg). La secreción de ácido retinóico por las células dendríticas CD103+ presentadoras de antígeno (en particular del antígeno administrado por vía oral para inducir tolerancia) en lámina propia del intestino delgado facilita la diferenciación de células T naïve a células T Foxp3+ (Coombes and Powrie, 2008) y estas células específicas de antígeno pueden luego circular y establecer una tolerancia sistémica o actuar a nivel local en la mucosa. Por este motivo se decidió estudiar en la mucosa intestinal si la administración oral de PLV o P34 induce linfocitos Treg responsables de los efectos inmunomodulatorios observados. Para ello estudiamos por citometría de flujo la inducción de células Foxp3+ en el período correspondiente a los linfocitos de bazo, nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), lámina propia (LP) y nódulos sublinguales (SLN) de los distintos grupos, luego de 24 hs de la administración oral del antígeno. En la **figura 6** se muestran los resultados correspondientes a linfocitos T CD3+ CD4+ Foxp3+.

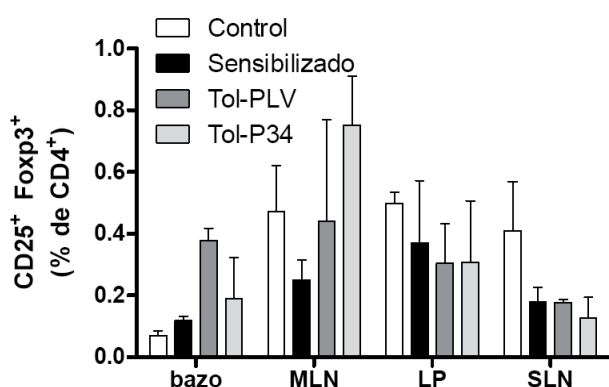


Figura 6. Expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4+ por citometría de flujo. Se muestran los porcentajes obtenidos para todos los ratones de los distintos grupos correspondientes a linfocitos T CD3+ CD4+ CD25+ Foxp3+, en suspensiones celulares de bazo, nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), lámina propia (LP) y nódulos sublinguales (SLN) de los distintos grupos.

Se encontró un aumento en la expresión de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ de bazo y MLN de los grupos tolerizados, respecto del grupo sensibilizado, lo cual es indicativo de la inducción de Treg en la mucosa de los animales pre-tratados.

Estos resultados nos permiten inferir que el proceso de inmunomodulación que media la disminución de los signos clínicos de alergia en los animales sensibilizados expuestos al alérgeno, es mediado por la inducción mucosal de Treg. Aunque estos resultados son preliminares nos alientan a continuar con los estudios de este tipo de inmunoterapia tendiente a corregir el sistema inmune gastrointestinal, cuya activación produce los signos clínicos de hipersensibilidad cuando los animales son expuestos oralmente al alérgeno alimentario. Además el empleo de un antígeno de reactividad cruzada nos permite controlar la activación inmunológica y estos resultados no sólo reflejan la importancia *in vivo* de la reactividad cruzada anteriormente caracterizada, sino que significan una aplicación clínica promisoriosa de la misma en una situación en la cual se relacionan dos sistemas antigénicos muy diferentes (animal y vegetal) y filogenéticamente no relacionados.

5. Discusión

En los capítulos precedentes caracterizamos *in vitro* los principales alérgenos de la soja, estudiamos el co-reconocimiento de epítopes comunes entre estas proteínas y las PLV, y analizamos esta reactividad cruzada *in vivo*.

Particularmente mostramos que P34 es un alérgeno de reactividad cruzada con PLV capaz de activar células sensibilizadas, promoviendo síntomas de hipersensibilidad después de la exposición sublingual y dando una prueba cutánea positiva en ratones sensibilizados a la leche. Además se mostró la presencia de al menos dos epítopes IgE con una distribución superficial a lo largo de P34 capaz de activar una sinapsis funcional entre la molécula alérgica y la célula sensibilizada; y que la reactividad cruzada inmunoquímica descrita para P34 podría ser clínicamente relevante en pacientes.

Estos resultados de reactividad cruzada *in vivo* de P34 obtenidos con el modelo murino de ALV junto con resultados obtenidos previamente en el laboratorio en los que mediante el pretratamiento de los ratones con PLV se logró conseguir una tolerancia sistémica, fueron relevantes para iniciar los estudios de inmunoterapia basada en la inducción de tolerancia mucosal con P34 para prevenir reacciones alérgicas. Nos planteamos entonces la aplicación de esta proteína de soja en un protocolo de tolerización para alergia a PLV, basándonos en la menor inmunogenicidad de P34 con respecto a las caseínas bovinas. Esto significa que esperamos observar menor cantidad de reacciones adversas frente a la administración de P34 en animales sensibilizados a PLV, con respecto a la administración de PLV. Sin embargo este tipo de inmunoterapia desensibilizante no se muestra en este trabajo de tesis y presentamos resultados preliminares a través de un protocolo tolerizante previo a la sensibilización alérgica.

En este capítulo probamos pretratamientos tolerizantes en los que se les administró a los ratones los antígenos PLV ó P34 y luego fueron sensibilizados a PLV. Se estudió previamente la administración de diferentes dosis y optamos por la de 20 µg (cinco dosis en días consecutivos) ya que observamos que con 10ug de PLV administrada por vía si los ratones sensibilizados producen manifestaciones clínicas. Lo importante para resaltar de los resultados mostrados es que con los pretratamientos aplicados logrado una disminución de las manifestaciones clínicas inducidas por la exposición al alérgeno logrando, y un control de la

inmunidad humoral y celular Th2–específica de PLV, como así también negativizar la mayoría de las pruebas cutáneas.

La inducción de tolerancia a proteínas alimentarias ha sido extensamente estudiada en diversos modelos animales. Se pueden encontrar en la literatura trabajos en los que se emplean modelos de alergia alimentaria a OVA, β -lactoglobulina o proteínas de huevo aplicando diversos protocolos de tolerización (Adel–Patient et al., 2011; Rupa and Mine, 2012; Thorstenson and Khoruts, 2001). Nuestro trabajo está focalizado a PLV y en particular a las caseínas ya que se trata de las proteínas de la leche bovina de reactividad cruzada con las proteínas de la soja. Aquí mostramos los resultados de la aplicación biológica del alérgeno mayor de la soja, P34, en la inducción de tolerancia a PLV, en el modelo murino de alergia alimentaria mediado por IgE por administración mucosal del antígeno de identidad o de reactividad cruzada.

En conclusión, podemos afirmar que la administración por vía sl de PLV o P34 logró inducir una tolerancia sistémica, mostrando que la aplicación de los protocolos diseñados logran prevenir la sensibilización oral a PLV con TC, mediante la inducción de tolerancia oral.

Estos resultados nos motivan a continuar y profundizar los estudios de inducción de tolerancia basados en la reactividad cruzada entre ambos sistemas con el fin de desarrollar protocolos de desensibilización que constituyan las bases experimentales para el planteo de una vacuna mucosal para tratar esta patología.

**CAPÍTULO IV – ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LOS
MAYORES ALERGENOS DE SOJA Gly m Bd 30K y Gly m Bd
28K – BÚSQUEDA DE UN PÉPTIDO HIPOALERGÉNICO DE
SOJA PARA EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS ALIMENTARIAS**

1. Generalidades

La capacidad de predecir la potencial alergenicidad de una proteína se ha convertido en un tema importante en las últimas décadas. En este punto, otros enfoques de investigación como la bioinformática están transformando el campo de estudio de estas enfermedades mediante el suministro de bases de datos para la gestión de datos de alergenicos, algoritmos para la caracterización de las reactividades cruzadas, motivos secuenciales y estructurales de los epitopes B y T, herramientas para la predicción de la alergenicidad y técnicas para el análisis genómico y proteómico de los alergenicos (Brusic and Petrovsky, 2003). La bioinformática presenta valiosas herramientas para el análisis de alergenicos y estos caminos complementarios pueden ayudar a las técnicas tradicionales para estudiarlos y plantear distintas aplicaciones.

La identificación de epitopes B y/o T en los alergenicos (en especial los epitopes IgE) nos permite comprender y explicar la naturaleza alérgica de las proteínas, proporcionando información importante para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas enfermedades, y es en este último punto en el que nos centramos ya que nos interesa plantear estrategias terapéuticas dirigidas a la instauración de tolerancia mediante el empleo de péptidos con capacidad de activar linfocitos T (regulatorios) y con capacidad baja o nula de activación de mastocitos y basófilos, de manera de reducir los riesgos de reacciones adversas durante el tratamiento.

Se puede encontrar en la literatura diversos trabajos en los que se han descrito características moleculares comunes entre proteínas de diversas fuentes, lo que permite comprender molecularmente la clínica de las reactividades cruzadas observadas en pacientes alérgicos (Breiteneder and Ebner, 2000; Jenkins et al., 2005) y la co-sensibilización entre sistemas alérgicos relacionados y no relacionados (Ferreira et al., 2004). Además, como ya dijimos anteriormente, nuestro grupo ha demostrado y caracterizado (Curciarello et al., 2008; Rozenfeld et al., 2002) (algunos resultados han sido presentados en los capítulos precedentes de esta tesis) que un determinado número de pacientes con ALV presentan anticuerpos séricos del isotipo IgE que reconocen diferentes proteínas de las fracciones 7S y 11S de soja. Inclusive estos pacientes han mostrado reacciones alérgicas al exponerse, deliberadamente o accidentalmente, a proteínas de soja. Sin embargo, actualmente es muy difícil que un individuo no haya sido expuesto a proteínas de soja por lo cual determinar si los pacientes están sensibilizados a no a PS es una tarea muy difícil. De esta manera la única manera de estudiar la

reactividad cruzada y asegurarnos la no sensibilización a la LV es emplear anticuerpos obtenidos por inmunización con PLV o emplear el modelo murino de alergia alimentaria en el cual los animales son exclusivamente sensibilizados con PLV. En este sentido hemos empleado un panel de anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas que reconocen distintos alérgenos de la soja, lo que sugiere la existencia de epítopes B compartidos entre las proteínas bovinas y las proteínas soja. También demostramos que ratones ALV desarrollan síntomas de hipersensibilidad cuando se los expone a extractos totales de semillas de soja (Smaldini et al., 2012) y a diferentes proteínas recombinantes de soja, lo que demuestra el impacto clínico de la reactividad cruzada observada por ensayos inmunoquímicos *in vitro*.

Con respecto a la caracterización de los epítopes de los principales alérgenos de soja, Helm y col. (Helm et al., 1998) identificaron epítopes lineales IgE de P34 usando sueros de pacientes. Identificaron 5 epítopes inmunodominantes en este alérgeno y haciendo un estudio de *scanning* de alaninas determinaron los aminoácidos críticos para la unión a IgE. También por mapeo de epítopes B, pero con anticuerpos monoclonales desarrollados en ratón contra P34, se identificaron dos epítopes IgG inmunodominantes (Hosoyama et al., 1996). No se han descrito aún de la existencia de epítopes conformacionales en Gly m Bd 30K (L'Hocine and Boye, 2007). La identificación de P34 como principal alérgeno está basada únicamente en los estudios *in vitro* mencionados y esta proteína ha sido incluida erróneamente en algunas bases de datos con el nombre Gly m 1 (por ejemplo SDAP). Sin embargo, la secuencia no corresponde con los péptidos inicialmente identificados en el aeroalérgeno de soja Gly m 1 (Gijzen et al., 2003; González et al., 1995, 2000) que se encuentran correctamente listados en IUIS Allergen Nomenclature (IUIS) (www.allergen.org).

La proteína de soja Gly m Bd 28K ha sido aislada y caracterizada por Tsuji y col. (Tsuji et al., 1997). En diferentes trabajos se mostró su capacidad de unión a anticuerpos IgE de pacientes sensibles a soja (Hiemori et al., 2000, 2004; Tsuji et al., 2001a; Xiang et al., 2004).

Con respecto a las proteínas de la leche también son numerosos los trabajos hasta el momento publicados que identificaron los principales epítopes de las caseínas bovinas α S1, α S2, β y κ , habiéndose descrito epítopes B (Cerecedo et al., 2008; Chatchatee et al., 2001a, 2001b; Cocco et al., 2003; Elsayed et al., 2004a; Järvinen et al., 2002; Lin et al., 2009; Schulmeister et

al., 2009; Spuergin et al., 1996), epitopes T (Elsayed et al., 2004b; Ruiter et al., 2006, 2007) y epitopes B y T al mismo tiempo (Enomoto et al., 1990; Nakajima–Adachi et al., 1998).

En esta tesis se realizó una caracterización *in vitro* e *in vivo* de los principales alérgenos de soja obteniendo resultados que describen la reactividad cruzada entre las PLV y PS. Mostramos que las proteínas de soja P34 y P28 presentan una reactividad diferencial en diferentes ensayos que caracterizan esta reactividad cruzada con PLV. Asimismo, mostramos que P34 contiene epitopes B y T de reactividad cruzada con PLV, que indujo síntomas de hipersensibilidad inmediatamente a la exposición sublingual, y se obtuvo prueba cutánea positiva en ratones sensibilizados a las PLV. Nos planteamos entonces la necesidad de profundizar en las bases moleculares de esta reactividad cruzada para comprender la respuesta inmune diferencial observada entre estos alérgenos de la soja y las caseínas.

Es importante señalar que los diferentes servidores y bases de datos que actualmente están disponibles en internet, que buscan proteínas de reactividad cruzada, no revelan como tales las proteínas de la leche de vaca y las proteínas de soja. Esto nos motivó a profundizar los estudios y aplicar las herramientas disponibles al análisis bioinformático del sistema leche-soja. Nos propusimos entonces, con toda la información disponible en diversas fuentes, evaluar las características secuenciales y estructurales de los alérgenos de soja estudiados, comparar las mismas con las caseínas bovinas y en base a los resultados obtenidos diseñar una estrategia computacional que permita predecir los epitopes de reactividad cruzada de interés para finalmente validar estas predicciones con ensayos experimentales.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos específicos

El objetivo del presente capítulo es llevar a cabo un análisis completo de los principales alérgenos de la soja utilizando diferentes herramientas bioinformáticas, que junto con la información presentada en los capítulos anteriores nos sirva para localizar posibles epítopos de reactividad cruzada y validarlos experimentalmente.

La hipótesis de este trabajo se basa en que los resultados experimentales hallados muestran que los alérgenos de la soja y las caseínas presentan epítopos B y T compartidos que permiten comprender la intolerancia clínica observada en pacientes alérgicos a LV que son tratados con formulaciones a base de soja, y permitiendo también plantear inmunoterapias inmunomoduladoras.

Para reforzar este concepto y los futuros objetivos del proyecto nos propusimos:

- ✓ Evaluar las características secuenciales y estructurales de los alérgenos de soja con diferentes herramientas informáticas.
- ✓ Evaluar comparativamente características secuenciales y estructurales comunes entre los principales alérgenos de soja y caseínas bovinas.
- ✓ Elaborar un modelo o estrategia computacional que permita predecir epítopos de reactividad cruzada con leche bovina.
- ✓ La obtención de un péptido candidato para el potencial desarrollo de una terapia tolerogénica para el tratamiento de alergias alimentarias.

3. Diseño experimental

El trabajo se inició con la **búsqueda en la base de datos** SDAP (*Structural Database of Allergenic Proteins*) de proteínas de reactividad cruzada con las proteínas de soja Gly m Bd 30K (P34), Gly m Bd28K (P28) (caracterizadas anteriormente en esta tesis). Luego, a partir de la base de datos IEDB "*Immune Epitope Database and Analysis Resource*" se obtuvieron secuencias de epitopes de caseínas para realizar la comparación con las secuencias de ambas PS mediante **alineamientos** secuenciales. Dado que la principal reactividad cruzada de caseínas se observó con P34 decidimos focalizar nuestro análisis en este alérgeno. Se modeló P34 para obtener la estructura tridimensional y continuar con el análisis computacional, y finalmente en base a los resultados obtenidos se propusieron péptidos candidatos para una inmunoterapia. Se **clonaron los péptidos** y se analizaron diferentes inmunoensayos *in vitro*: **immunoblots** empleando antisueros específicos a caseínas bovinas y sueros de pacientes reactivos a PLV y PS, y **proliferación de linfocitos T** provenientes de bazo de ratones sensibles a leche de vaca. Finalmente, se realizó el **mapeo de los epitopes B** de P34 empleando péptidos sintéticos solapados y enfrentándolos a diferentes antisueros.

4. Resultados

En trabajos anteriores del grupo y en el Capítulo II de esta tesis mostramos que las proteínas de soja descritas como alérgenos mayoritarios, Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28) presentan reactividad cruzada con las PLV y que además estas exhiben una inmunoreactividad diferencial, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a diversos antisueros ensayados y en el modelo murino de alergia a PLV. Realizamos aquí un análisis bioinformático secuencial y estructural de ambas proteínas de soja con la intención de profundizar las bases moleculares que permitan comprender esta reactividad cruzada diferencial.

4.1. Los métodos computacionales constituyen una herramienta eficaz para la predicción de epítopes de reactividad cruzada.

4.1.1. Los servidores disponibles no predicen la reactividad cruzada entre PLV y PS

Las organizaciones FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*) proponen para la determinación de reactividad cruzada entre una proteína de interés y un alérgeno conocido tener en cuenta dos criterios: 1–una identidad de secuencia de aminoácidos superior al 35% usando una ventana de 80 aminoácidos y una penalidad gap adecuada cuando se alinea la proteína de interés y los alérgenos conocidos; 2–identidad de 6 aminoácidos continuos entre la proteína de interés y el alérgeno conocido (Bindslev–Jensen et al., 2003). Con esta regla no se logran predecir muchos de los casos de reactividad cruzada detectados, incluyendo las mostradas en este trabajo entre proteínas de soja y leche de vaca.

La base de datos estructural de proteínas alérgicas SDAP: *Structural Database of Allergenic Proteins* (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>) fue desarrollada para predecir potenciales proteínas alérgicas (con capacidad de unión IgE) y de reactividad cruzada entre alérgenos conocidos, superando las limitaciones de las definiciones anteriores. En primer lugar, utilizando la herramienta “*FASTA similarity search in the SDAP database*” (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_fas) que ofrece esta base de datos, se investigó cuales

alergenos son potencialmente de reactividad cruzada con las proteínas de soja P34 y P28 que detecta SDAP (informa posibles proteínas de reactividad cruzada buscando similitud). Los datos obtenidos se resumen en las **tablas 1 y 2**:

Tabla 1. Resultados de la búsqueda con SDAP de proteínas alergénicas de reactividad cruzada con Gly m Bd 30K.

No	Alergeno	Especie/Características	Link SwissProt/ NCBI/PIR	Tamaño de secuencia	Identidad %	Score	E valor
1	Gly m 1	<i>Glycine max (cisteín-proteasa de Soja)</i>	AAB09252	379	98,99	563.2	5.1e-162
2	Gly m 1	<i>Glycine max (cisteín-proteasa de Soja)</i>	P22895	379	98,61	561.2	2.1e-161
3	Act d 1	<i>Actinidia deliciosa (cisteín-proteasa de Kiwi)</i>	AAA32629	380	36,39	193.1	1.3e-50
4	Act d 1	<i>Actinidia deliciosa (cisteín-proteasa de Kiwi)</i>	P00785	380	36,11	192.6	1.8e-50
5	Ana c 2	<i>Ananas comosus (bromelia de Ananá)</i>	BAA21849	351	32,22	143.0	1.5e-35
6	Blo t 1.0201	<i>Blomia tropicalis (cisteín-proteasa de los Ácaros)</i>	AAQ24541	333	27,50	138.0	4.6e-34
7	Car p 1	<i>Carica papaya (papáina de la Papaya)</i>	AAB02650	345	35,56	137.5	6.4e-34
8	Blo t 1.0101	<i>Blomia tropicalis (cisteín-proteasa de los Ácaros)</i>	AAK58415	221	20,56	114.9	2.6e-27
9	Der f 1.0106	<i>Dermatophagoides farinae (cisteín-proteasa de los Ácaros Americanos)</i>	P16311	321	27,22	111.8	3.4e-26
10	Der f 1.0107	<i>Dermatophagoides farinae (cisteín-proteasa de los Ácaros Americanos)</i>	2428875	303	26,94	110.9	6.0e-26

Nota: esta página comete un error al nombrar a Gly m Bd 30K como **Gly m 1** en los dos primeros alineamientos ya que **Gly m 1** es la proteína Hydrophobic seed protein (HSP) de soja, tiene 80 aas y pertenece a la familia de LTP de plantas (datos extraídos de la base de datos UniProt <http://www.uniprot.org/>).

Tabla 2. Resultados de la búsqueda con SDAP de proteínas alergénicas de reactividad cruzada con Gly m Bd 28K.

No	Alergeno	Especie/Características	Link SwissProt/ NCBI/PIR	Tamaño de secuencia	Identidad %	Score	E valor
1	Gly m Bd28K	<i>Glycine max</i> (<i>homologo de MP27/MP32</i>)	BAB21619	473	100	592.0	1.7e-170
2	Len c 1.0101	<i>Lens culinaris</i> (<i>vicilina 7S de Lenteja</i>)	CAD87730	418	23,3	71.2	9.0e-14
3	Len c 1.0102	<i>Lens culinaris</i> (<i>vicilina 7S de Lenteja</i>)	CAD87731	415	24,18	67.0	1.7e-12
4	Ses i 3	<i>Sesamum indicum</i> (<i>vicilina 7S de Sésamo</i>)	AAK15089	585	22,86	65.4	6.9e-12
5	Gly m 5.0101	<i>Glycine max</i> (<i>sub alfa de la beta conglucina, vicilina 7S de soja</i>)	O22120	543	23,3	61.0	1.4e-10
6	Gly m conglycinin	<i>Glycine max</i> (<i>Conglicinina, vicilina 7S de soja</i>)	CAA35691	605	23,3	61.0	1.5e-10
7	Pis v 2.0101	<i>Pistacia vera</i> (<i>legumina 11S de nuez</i>)	DQ631676	496	19,12	59.6	3.4e-10
8	Gly m conglycinin	<i>Glycine max</i> (<i>Conglicinina, vicilina 7S de soja</i>)	AAB23463	439	23,08	55.1	6.6e-09
9	Cor a 11	<i>Corylus avellana</i> (<i>vicilina 7S de Avellanas</i>)	AAL86739	448	21,54	52.1	5.5e-08
10	Vig r 2.0101	<i>Vigna radiata</i> (<i>vicilina 8S de Habas</i>)	Q198W3	453	21,98	51.9	6.4e-08

Observando los resultados informados en las **tablas 1 y 2** puede apreciarse que el predictor de la página SDAP no reconoce como probables proteínas de reactividad cruzada a las caseínas bovinas. Tanto para P34 como para P28 vemos que los resultados del servidor proponen como posibles proteínas de reactividad cruzada a proteínas provenientes de frutas, cereales, leguminosas y ácaros.

La mayoría de los trabajos coinciden en describir a las proteínas alergénicas de reactividad cruzada como muy similares en secuencia y en estructura a nivel molecular, independientemente de su origen. La mayoría de los alérgenos pueden agruparse en grupos discretos de familias acorde a la clasificación de Pfam (la clasificación Pfam contiene proteínas alergénicas y no alergénicas). Los alérgenos con reactividad cruzada normalmente tienen alta

identidad de secuencia, que puede ser hasta un mínimo de 35% (the WHO guidelines). Sin embargo, se realizan mutaciones puntuales para eliminar la unión de IgE como se muestra en el ejemplo de isoformas de Bet v 1, que son 98% idénticas, perdiendo la reactividad cruzada (Ferreira et al., 1996, 1997; Hartl et al., 1999). Por esta razón, el valor crudo en sí de cuan similares sean las secuencias, sin ser analizado desde otro punto de vista, no otorga información suficiente. Es por ello que los resultados en la tabla que informa como resultado SDAP, enumera todos los alergenios similares que se encuentran en la base de datos, e informa su E-valor esperado (Schein et al., 2007). La última columna de las tablas muestra el E-valor que indica la significación estadística del alineamiento. El E-valor es una medida de cuántos alineamientos con el mismo grado de similitud de secuencia se esperaría que se produzcan al azar en una base de datos de un tamaño dado. Por lo tanto, un bajo valor de E-valor indica una alta significación del alineamiento de secuencia y en base a este valor es que se comparan las proteínas.

Sabemos que los resultados de los métodos actuales para predecir la alergenicidad de una proteína dada deben ser considerados con prudencia, ya que dependen fundamentalmente del funcionamiento del sistema inmune en los pacientes. En una reciente reunión "*Internacional Bioinformatics Workshop Meeting*" (Thomas et al., 2005) se llegó a la conclusión que se debe hacer un análisis más detallado de las propiedades estadísticas de las proteínas alergénicas frente a los no alergenios. La metodología actual de análisis computacional consiste en alineamientos y en búsquedas de motivos secuenciales que se repitan en grupos de proteínas alergénicas. Postulando así a estas zonas de alineamientos y/o motivos como potenciales áreas de reconocimiento IgE, lo que resulta de importancia para el diseño de vacunas y de proteínas hipoalergénicas.

En función de los resultados negativos arrojados por este servidor en cuanto a la predicción de reactividad cruzada leche de vaca-soja, se procedió entonces a desarrollar un análisis *in silico* de las secuencias de estas proteínas con el propósito de poder localizar regiones de similitud secuenciales entre los epitopes ya descritos de las caseínas bovinas (los de los principales alergenios de la leche de vaca) y de los principales alergenios de la soja.

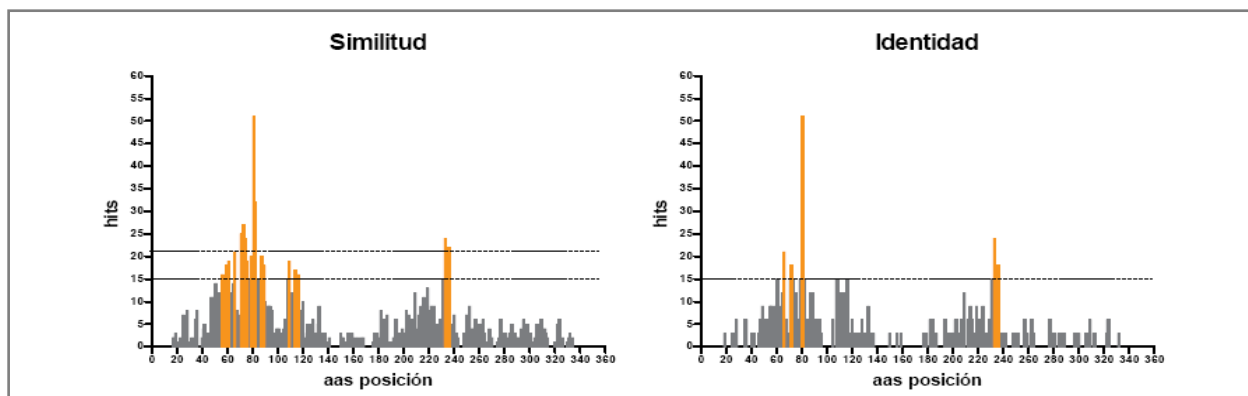
4.1.2. Mediante alineamientos con epitopes de caseínas bovinas se localizaron dos zonas de similitud secuencial entre caseínas y Gly m Bd 30K

Sobre la base de la reactividad cruzada inmunoquímica descrita para P34 y P28 se continuó con un análisis secuencial de las mismas con el propósito de localizar regiones de similitud secuencial entre los epitopes ya descritos en las caseínas bovinas y las proteínas P34 y P28.

Procedimos entonces a realizar alineamientos entre los alergenicos de soja y péptidos inmunoreactivos derivados de las caseínas. Los alineamientos se hicieron entre 73 péptidos de caseínas bovinas que se listan en la sección **gráficos y tablas adicionales** (descritos como epitopes por la base de datos IEDB "*Immune Epitope Database and Analysis Resource*" <http://www.iedb.org/>) y las secuencias de las proteínas de soja P34, P28 utilizando el servidor ClustalW2. Los péptidos de las caseínas extraídos desde esta base de datos se encuentran descritos en bibliografía como epitopes T y/o B de diferentes isotipos (tanto IgG como IgE). Con los resultados de estos alineamientos construimos gráficos que muestran a lo largo de cada secuencia de las PS la distribución de hits o puntos en los que los aminoácidos de los péptidos de caseínas bovinas y la PS muestran similitudes (**figura 1**).

Resumidamente, para construir estos gráficos se alinearon de a uno los epitopes de las caseínas con la PS (P34 ó P28), luego analizando los alineamientos se construyó un gráfico de distribución de hits en base a la acumulación de aminoácidos consenso a lo largo de la secuencia de la PS: en las posiciones que los alineamientos tienen un aminoácido conservado se le asignó **puntuación= 3**, cuando se conservaban aminoácidos con propiedades muy similares **puntuación= 2** y para la conservación entre aminoácidos con propiedades débilmente similares **puntuación=1**.

Distribución de hits de Gly m Bd 30K



Distribución de hits de Gly m Bd 28K

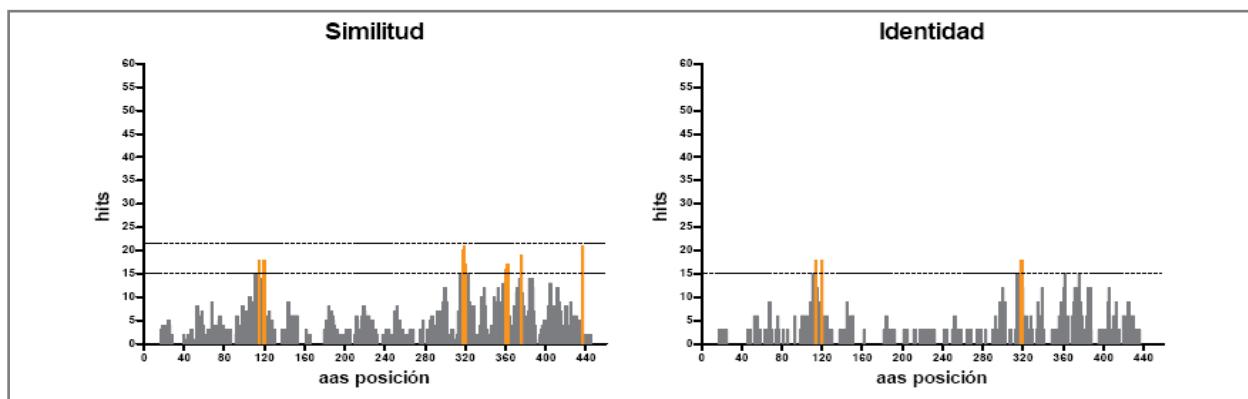


Figura 1. *Distribución de hits calculados en base a los alineamientos entre epitopes de caseínas y las secuencias de Gly m Bd 30K (P34) (panel superior) o Gly m Bd 28K (P28) (panel inferior). En ambos paneles se muestra a la izquierda los gráficos que representan similitud e identidad secuencial en los alineamientos, a la derecha se muestran los gráficos que representan sólo identidad secuencial. Las líneas constituyen cotas para evaluar los niveles de similitud.*

Mediante este análisis secuencial se localizaron regiones de similitud alta, media o baja entre los 73 epitopes de caseínas y las PS. En los gráficos de la **figura 1** se colorearon de gris aquellos aminoácidos cuyos hits o acumulación de scores no superaron los 15 puntos, línea punteada inferior, y de naranja aquellos que superaron ese valor. La línea superior se posiciona en el valor de 21 que es el máximo que se encuentra a lo largo de toda la distribución de hits en la proteína P28 (en el gráfico de similitud secuencial), que es aquella proteína que menores valores ha demostrado de ambas. De esta manera generamos un nivel para poder evaluar las zonas de similitud secuencial significativa.

Al comparar los resultados obtenidos para las dos proteínas vemos que para la proteína P28 se observa una distribución más homogénea de los hits y que el máximo valor alcanzado es de 21 puntos, lo que explicaría en parte la baja reactividad cruzada mostrada *in vitro* por esta PS. Asimismo, para el caso de P34, los gráficos muestran claramente dos regiones o zonas (una región amino y otra carboxilo terminal) con alta similitud secuencial entre la PS y los epitopes derivados de las caseínas bovinas. Ambas zonas de la secuencia de P34 poseen hot-spots de valores mayores a 21 puntos, llegando a valores máximos de 51 puntos. Marcamos en el gráfico que se muestra en la **figura 2** los aminoácidos de esta proteína con puntajes mayores al valor 8. Así coloreamos en rojo los hits pertenecientes los aminoácidos de la zona de mayor puntaje, y en verde la o las zonas secundarias de menor puntaje. De esta manera denominamos como zona I (en rojo) a las posiciones que comprenden los aas 47 al 95, del 108 al 116, 119 y 120 y 133; y como zona II en verde, aas 209 al 236 y 252.

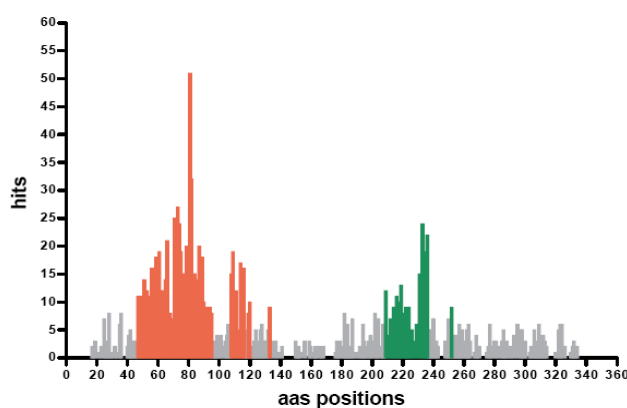


Figura 2. *Distribución de hits calculados en base a alineamientos entre epitopes de caseínas y la secuencia entera de P34. En la figura se muestran con colores las zonas resultantes en los alineamientos como responsables de la reactividad cruzada P34-caseínas bovinas. Zona I en rojo (contiene las secuencias con hits mayores) y zona II carboxilo terminal en verde (contiene las secuencias con hits menores).*

En la **figura 3** representamos sobre la secuencia aminoacídica las posiciones contenidas en estas regiones. Podemos observar que son dos zonas ubicadas en el extremo amino (en rojo) y la otra ubicada más hacia la porción carboxilo terminal de la molécula (en verde) separadas por más de 80 aminoácidos.

Gly m Bd 30K :1::360::::0.00:0.00

ISTHRSILDLDLTKFTTQKQVSSLFQLWKSEHGRVYHNHEEEAKRLEIFKNNLNYIRDMNANRKS PHS HRLGLNKFADITPQEF SK
 KYLQAPKDV SQQIKMANKKMKKEQYSCDHPASWDWRKKGVITQVKYQGGCGSGWAFSATGAIEAAHAIATGDLVSLSEQELVDCV
 EESEGCYNGWHYQSF EWVLEHGGIATDDDY PYRAKEGRCKANKIQDKVTIDGYETLIMSDESTES ETEQAFLSAILEQPI SVSIDA
 KDFHLYTGGIYDGENCTSPYGINHFVLLVGYGSADGVDIWIAKNSWGEDWGEDGYIWIQRNTGNLLGVCGMNYFASYPTKEESETL
 VSARVKGHRRVDHSPL*

Figura 3. Epitopes de reactividad cruzada caseínas-soja predichos in silico para el mayor alérgeno de soja Gly m Bd 30K (P34). En rojo se marcan los aminoácidos contenidos en la zona I y en verde los contenidos en la zona II.

El análisis computacional hasta aquí realizado se correlaciona con lo observado experimentalmente en el sentido que es posible localizar zonas con similitud de secuencia. Los resultados del análisis computacional de la proteína P28 nos indican que esta proteína no muestra una similitud secuencial significativa con las caseínas bovinas, y como dijimos anteriormente, esto podría explicar la baja reactividad cruzada mostrada *in vitro* e *in vivo* por esta PS. Por el contrario, la proteína P34 presenta zonas de alta similitud secuencial con las caseínas; inclusive hallamos dos zonas en P34 con alta similitud secuencial que serían las responsables de la reactividad cruzada con las caseínas bovinas observada *in vitro* e *in vivo*. El hecho de que la proteína P34 exhiba dos zonas de reactividad cruzada separadas por más de 80 aminoácidos explicaría el resultado positivo de la prueba cutánea mostrado por los ratones alérgicos a la LV porque esta disposición permitiría el entrecruzamiento IgE en la superficie de basófilos y mastocitos, aunque esta última conjetura necesitaría ser ratificada ubicando estos epitopes en la estructura tridimensional de la molécula para constatar que ambos se encuentran separados espacialmente y accesibles al solvente. Estos resultados preliminares resultan muy alentadores ya que nos permiten inferir acerca de la especificidad del análisis realizado dado que el análisis bioinformático permite comprender la reactividad cruzada diferencial observada para P34 y P28.

Para continuar con el estudio nos focalizamos en el análisis de P34 dado que presenta la reactividad cruzada más relevante.

4.1.3. Los epitopes de reactividad cruzada predichos *in silico* se encuentran en la superficie de Gly m bd 30K

Para determinar si los epitopes predichos *in silico* se encuentran localizados en regiones expuestas al medio, y separados espacialmente, se procedió a obtener por el método de modelado por homología una aproximación de la estructura tridimensional de esta proteína.

Modelado por homología de Gly m Bd 30K

Dado que la proteína P34 no se ha cristalizado, no se dispone de una estructura tridimensional a partir de los datos obtenidos de los estudios cristalográficos. Por lo tanto decidimos opcionalmente recurrir al empleo como molde para P34 a la estructura PDB 1PCIA perteneciente a la proteína Carica papaya (Papaya) (Cadena A, gi 2098464 | AP | 1PCI | A). Ambas proteínas pertenecen a la familia de las papaínas y muestran un 39% de similitud secuencial. Además poseen la misma función molecular, actividad endopeptidasa, aunque para P34 no se ha demostrado que presente esta actividad proteásica en su forma natural. Es importante recalcar que la estructura utilizada como molde presenta una menor longitud que la secuencia de P34, por lo que la estructura tridimensional y las predicciones no tienen en cuenta la porción más extrema del amino terminal (primeros 14 aas) y la carboxilo terminal (últimos 25 aas) (el alineamiento entre ambas proteínas se presenta como **figura 10** en la sección **gráficos y tablas adicionales**). La estructura obtenida por medio del modelado por homología con el programa Modeller 9v7 (**figura 4**) está compuesta por dos dominios: uno hélice α y otro barril β .

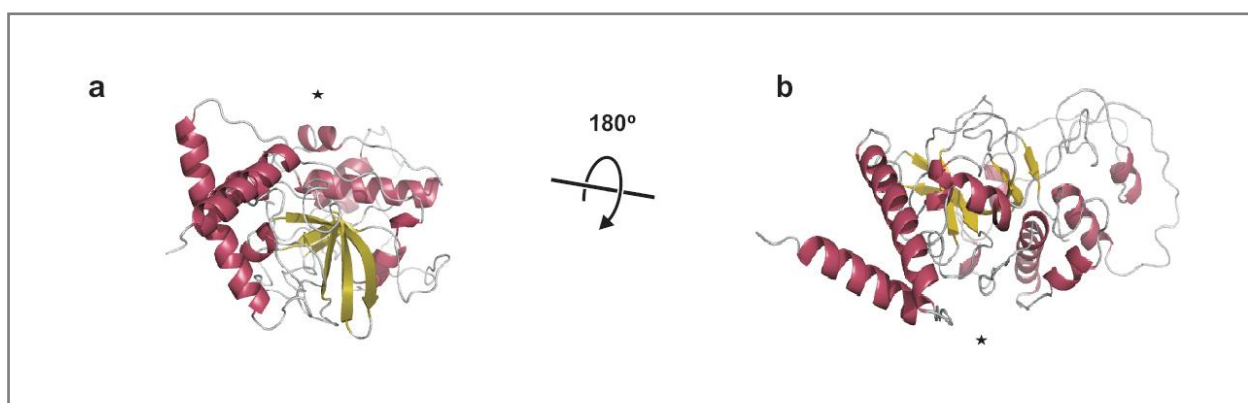


Figura 4 Estructura tridimensional de P34 obtenida con el programa Modeller 9v7. a) En las figuras se muestra el diagrama de "cintas", los dominios α hélice de color fucsia y en amarillo el dominio barril β ; b) estructura rotada 180° para apreciar la molécula desde otra perspectiva.

Estimación de la accesibilidad al solvente de cada aminoácido en la estructura tridimensional

Con el objetivo de determinar si estos epitopes predichos de reactividad cruzada se encuentran expuestos en la molécula, se utilizó el programa DSSP para obtener los valores de RSA (*relative solvent accessibility*) a partir de la estructura 3D de P34 modelada. Luego de tener los valores de RSA se utilizó como valor umbral arbitrario $<20\%$, de manera de desestimar los residuos “completamente enterrados”, o internos en la estructura, o no accesibles al solvente.

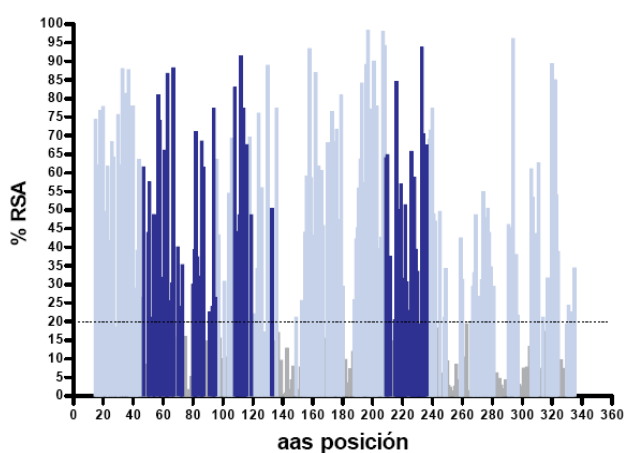


Figura 5. Valores porcentuales relativos de accesibilidad al solvente (RSA) correspondientes a cada aminoácido de la secuencia de la proteína P34. Se colorearon con gris las posiciones que se encuentran “enterrados” con un RSA $<20\%$, en la gama de colores azul-celeste los aas que se encuentran expuestos con un RSA $>20\%$, (azul oscuro corresponde a las posiciones que se encuentran en las dos zonas de reactividad cruzada predichas).

Por lo tanto el análisis realizado determinó que las zonas de reactividad cruzada en P34 se encuentran muy por encima del valor umbral de 20% (salvo el aa 252), lo que indica claramente que estas zonas están expuestas al solvente y son accesibles a los anticuerpos presentes en el medio.

Predicción de epitopes B discontinuos de Gly m Bd 30K

El servidor Disco Tope 1.2 utiliza la información de la estructura 3D de la proteína y calcula en base a datos de accesibilidad superficial (en términos de números de contacto) una puntuación informada como la probabilidad de cada aminoácido de ser un epitope B discontinuo (conformacional). Para el cálculo de las probabilidades el método utiliza información de las propiedades estáticas de los aminoácidos, información espacial, accesibilidad superficial y un conjunto de datos recopilados de epitopes discontinuos determinados por cristalografía de rayos X de complejos de proteínas de antígeno/anticuerpo. El servidor DiscoTope 1.2 tiene un

mejor desempeño para la predicción de los residuos de epitopes discontinuos que los métodos basados únicamente en la información secuencial. En la **figura 6** representamos en la estructura 3D de la proteína los aminoácidos predichos como epitopes B como superficies y las porciones no descritas como epitopes B por este servidor se mantienen en el formato de cintas y en color gris. Además sobre estas superficies “posibles epitopes B” mostramos en color rojo (zona I) y verde (zona II) los aminoácidos coincidentes con las zonas de reactividad cruzada predichas anteriormente. Se puede apreciar que las mismas son candidatas a ser epitopes B por este servidor, y además se encuentran en la superficie de la molécula en regiones de hélices α y *loops*.

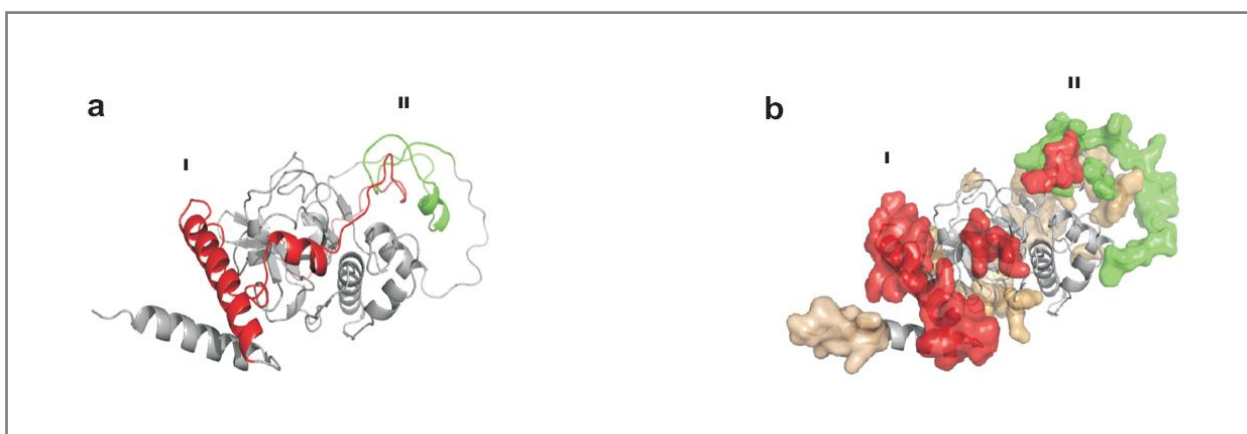


Figura 6. Estructura tridimensional de P34 con las representaciones de los resultados obtenidos en las predicciones. a) Estructura PDB con las regiones correspondientes a las zonas I y II coloreadas de rojo y verde respectivamente, **b)** Estructura PDB que muestra ambas predicciones superpuestas (DiscoTope y alineamientos de epitopes de reactividad cruzada) trazadas como superficies sobre la estructura de la proteína. Todos los aminoácidos representados como superficies, independientemente del color, son los predichos como epitopes B por el servidor DiscoTope y sobre esta representación se colorearon con rojo y verde los aminoácidos predichos mediante alineamientos.

Cuando combinamos los resultados de las predicciones de epitopes lineales de reactividad cruzada caseínas-soja con los conformacionales “universales” (alineamientos, accesibilidad al solvente, epitopes discontinuos) vemos que ambos epitopes propuestos de reactividad cruzada para P34 (zona I y II) se encuentran expuestos, y podrían ser no sólo epitopes de reactividad cruzada lineales, sino también conformacionales (**figura 6b**), y que a su vez se encuentran

separados espacialmente pudiendo dar lugar entonces al entrecruzamiento IgE responsable de la activación de mastocitos y basófilos.

4.2. Los péptidos recombinantes que contienen las zonas I y II son reconocidos diferencialmente *in vitro* por anticuerpos específicos a proteínas de leche de vaca

Con el propósito de probar experimentalmente los resultados obtenidos por el análisis *in silico* se decidió clonar dos péptidos derivados de la secuencia del alérgeno P34 que contengan las zona I y II, respectivamente.

Clonado, expresión y caracterización inmunoquímica de los péptidos inmunoreactivos

Se clonaron dos polipéptidos que corresponden al extremo amino (NT-P34) (116 aas iniciales) y carboxilo terminal (CT-P34) (152 aas finales) de la proteína P34, los cuales contienen en sus secuencias todos los aminoácidos comprendidos en ambas regiones predichas de reactividad cruzada (ver **figura 3**) (salvo los aas S¹¹⁹, W¹²⁰ y Y¹³³).

Las secuencias de los péptidos clonados son:

Péptido NT-P34

1-ISTHRSILDLDLTKFTTQKQVSSLFQWKSEHGRVYHNHEEEAKRLEIFKNNLNYIRDMNANRKSPHSHRLGLNKFADITPQEF
SKKYLQAPKDVSSQQIKMANKKMKKEQYSCDHP-116

Péptido CT-P34

208-GRCKANKIQDKVTIDGYETLIMSDESTESETEQAFLSAILEQPI SVSIDAKDFHLYTGGIYDGENCTSPYGINHFVLLVGYG
SADGVYWIAKNSWGEDWGEDGYIWIQRNTGNLLGVCGMNYFASYPTKEESETLVSARVKGHRRVDHSPL-360

Se clonaron las dos regiones de la secuencia de P34 fusionados a un tag de histidinas (His) para facilitar la purificación empleando cromatografía de afinidad con resinas conteniendo cobalto. Para ello se emplearon los primers cuyas secuencias se muestran en la **tabla 1** de la sección **materiales y métodos**. Estos primers fueron diseñados para hacer un clonado en el

vector pET200 ajustándose el marco de lectura de forma tal que clonar direccionalmente el producto de PCR al vector de expresión (pET200) y que quede el marco de lectura con el tag de purificación. Los fragmentos clonados contienen las zonas de similitud secuencial con las caseínas (NT-P34-zona I y CT-P34-zona II) y los límites fueron establecidos teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la proteína P34, tratando de mantener las regiones de estructura secundarias intactas, de manera que se expresen en forma soluble.

La expresión de estas construcciones se realizó en la cepa de *E.coli* BL21 STAR (DE3) bajo diferentes condiciones experimentales, optimizando las mismas en función del rendimiento. En la **figura 7** se muestran los geles SDS-PAGE 17% de las purificaciones de las fracciones solubles (FS) realizadas por cromatografía de afinidad con resina de cobalto en condiciones nativas. Luego las mismas se dializaron y se les cuantificó la cantidad de proteína para ser utilizadas en diferentes inmunoensayos. Para los ensayos de proliferación además estos péptidos fueron detoxificados por cromatografía de afinidad (polimixina B) para eliminar lipopolisacáridos (LPS) proveniente de las bacterias y analizado el contenido de esta endotoxinas por el test de Limulus. Las proteínas fueron finalmente evaluadas mediante inmunoblots empleando antisueros específicos de pacientes reactivos a PLV y PS, y anticuerpos monoclonales específicos a caseínas bovinas (mAb-CB) para caracterizar la reactividad cruzada de los péptidos. También se realizaron ensayos de proliferación de esplenocitos provenientes de bazo de ratones alérgicos a leche de vaca expandiendo las células por incubación *in vitro* con ambos péptidos.

Purificación de péptidos recombinantes

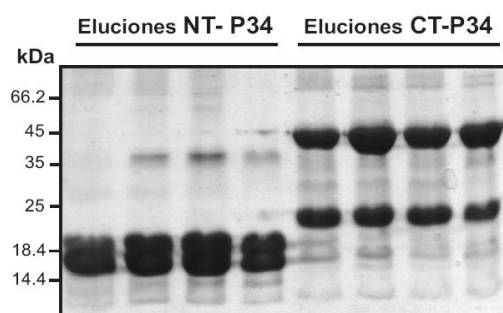


Figura 7. *SDS-PAGE 17% de las purificaciones de los péptidos recombinantes. Geles 17% que muestran las eluciones de las purificaciones de los péptidos NT-P34 de aprox. 19 kDa y CT-P34 de aprox. 22 kDa.*

La **figura 7** muestra los perfiles proteicos correspondientes a las muestras de las eluciones de ambas purificaciones en condiciones nativas. Podemos apreciar los buenos rendimientos obtenidos en ambos casos. También vemos que el péptido CT-P34 se encuentra en forma de dímeros, lo que podría explicarse por la presencia de cisteínas (C^{273} y C^{308}) que formarían puentes de sulfuro.

Caracterización inmunoquímica de los péptidos recombinantes

Se analizó mediante inmunoblots la reactividad de los péptidos NT-P34 y CT-P34 obtenidos. En la **figura 8** se muestran los resultados de los inmunoblots empleando diferentes anticuerpos monoclonales: mAb anti-Histidina, mAbs anti-caseínas (1D5 específico de α -caseína, 4C3 específico de β -caseína y 3B5 específico de κ -caseína). Las proteínas se corrieron bajo condiciones reductoras (β -mercaptoetanol) para inhibir la formación de dímeros.

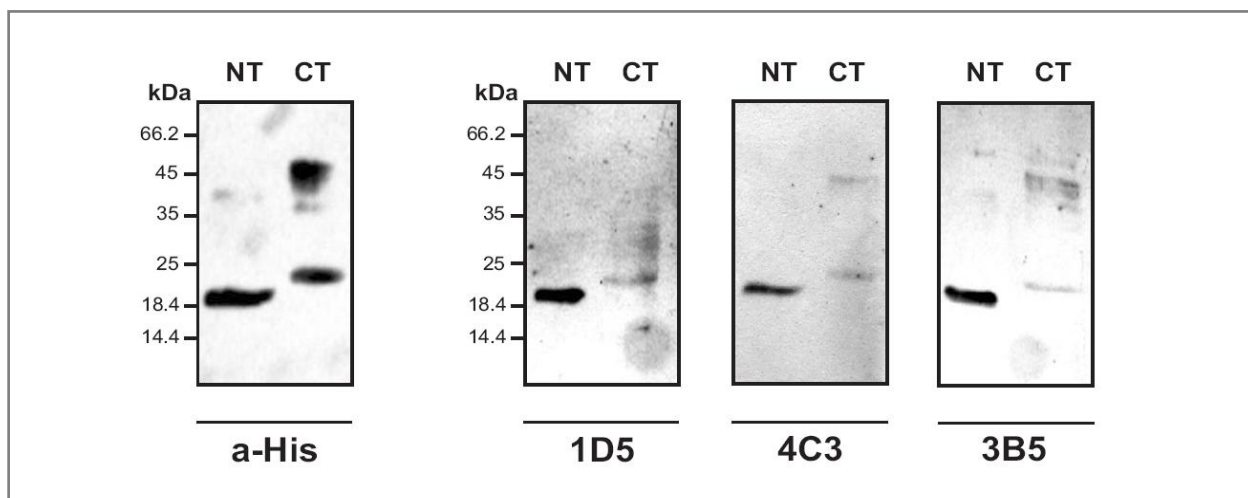


Figura 8. *Inmunoblots de los péptidos recombinantes con los anticuerpos monoclonales específicos de caseínas.* De izquierda a derecha: mAb anti-Histidina, mAb específicos para caseínas bovinas: 1D5 anti α -caseína 4C3 anti β -caseína y 3B5 anti κ -caseína. Proteínas ensayadas: NT-P34 aprox. 19 kDa y CT-P34 aprox. 23 kDa.

Podemos observar en los inmunoblots de la **figura 8** que las cantidades sembradas de cada péptido son comparables (revelado con el mAb anti-Histidina) y que el péptido NT-P34 muestra mayor reactividad con los 3 mAbs comparada con la reactividad del CT-P34. Este

resultado confirma los resultados obtenidos por el análisis bioinformático en el cual vemos que la mayor similitud de secuencia entre P34 y los epitopes de caseínas bovinas se encuentran en la zona I de P34, presente en el péptido NT-P34 recombinante.

Además se evaluó la reactividad inmunoquímica de los péptidos frente a sueros de pacientes reactivos a PLV y soja (**figura 9**). La **tabla 3** describe las características de los sueros de pacientes usados para este ensayo.

Tabla 3. Características de los sueros de individuos reactivos a PLV y PS.

Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml	Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml
1	0,332	0,322	462	5	1,233	0,234	195
2	0,310	0,324	236	6	0,945	0,186	222
3	1,369	0,223	294	7	1,301	0,289	146
4	1,191	0,341	360	8	1,197	0,323	95,1

Valores de corte: IgE esp PS DO: 0,121; IgE esp PLV DO: 0,128

Valor normal: IgE total: 60 UI/ml

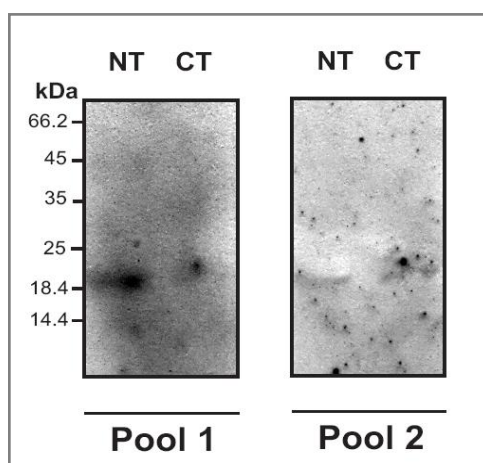


Figura 9. Inmunoblots de los péptidos recombinantes revelados con pools de sueros de pacientes alérgicos a leche y soja. Pools 1 y 2 de sueros que contienen IgE específica (tabla 3). Proteínas ensayadas: NT-P34 aprox. 19 kDa y CT-P34 aprox. 23 kDa.

Al igual que lo que se observa en los inmunoblots frente a los mAb-CB de la **figura 8** puede observarse en la **figura 9** que el NT-P34 es el que presenta mayor reactividad IgE frente a sueros de pacientes reactivos a PLV y PS (principalmente se observa con el pool 1). Podemos concluir entonces que el péptido recombinante NT-P34 es la porción de la molécula que presenta mayor co-reconocimiento B (tanto IgG como IgE) con las caseínas bovinas, y que los epitopes de reactividad cruzada son consecuencia de similitudes a nivel de secuencia aminoacídica.

Ensayo de proliferación celular con CFSE

Con el objetivo de determinar si los péptidos contienen además epitopes T se realizó un ensayo de proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ por citometría de flujo. Esta caracterización de los péptidos seleccionados nos permitirá considerar su análisis en el desarrollo de inmunoterapias modulatorias de la inmunidad celular.

Brevemente, se extrajo los bazo de los animales de los diferentes grupos del modelo murino de alergia alimentaria y a las células aisladas se les realizó una expansión *in vitro* mediante incubación con los antígenos de interés. Al mismo tiempo las células fueron marcadas con el colorante fluorescente 5,6-diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). Luego del cultivo por 72 hs se marcaron las células con un anticuerpo monoclonal conjugado a un fluorocromo anti-CD4. Aquellas LT CD4⁺ que proliferaron en respuesta al antígeno mostraron una reducción en la intensidad de fluorescencia CFSE y por lo tanto un corrimiento en los gráficos de intensidades de fluorescencia.

En la **figura 10** se muestran los porcentajes de proliferación de linfocitos T CD4⁺ en respuesta a los diferentes antígenos utilizados en el cultivo celular. Los esplenocitos fueron aislados de ratones sensibilizados y se probó previamente que proliferan cuando se los estimula con PLV (control). Se observa que frente al estímulo de P34 y el NT-P34 los porcentajes son comparables (2,14% y 2,14%, respectivamente) con los obtenidos con RPMI (2,25%). En cambio, cuando se estimula las células con el CT-P34 el porcentaje es de 5,40%.

Sobre la base de los resultados mostrados podemos concluir que ambos péptidos derivados de la proteína de soja P34 presentan reactividad cruzada con las caseínas bovinas, el péptido NT-P34 (región amino terminal de la proteína P34) es el que presenta mayor reactividad B.

Asimismo, el CT-P34 (región carboxilo terminal de la proteína de soja P34) produce mayor proliferación de las células T colaboradoras, por lo que junto con el resultado de menor reactividad B principalmente del isotipo IgE, el CT-P34 constituiría un potencial candidato para inmunoterapias tolerogénicas.

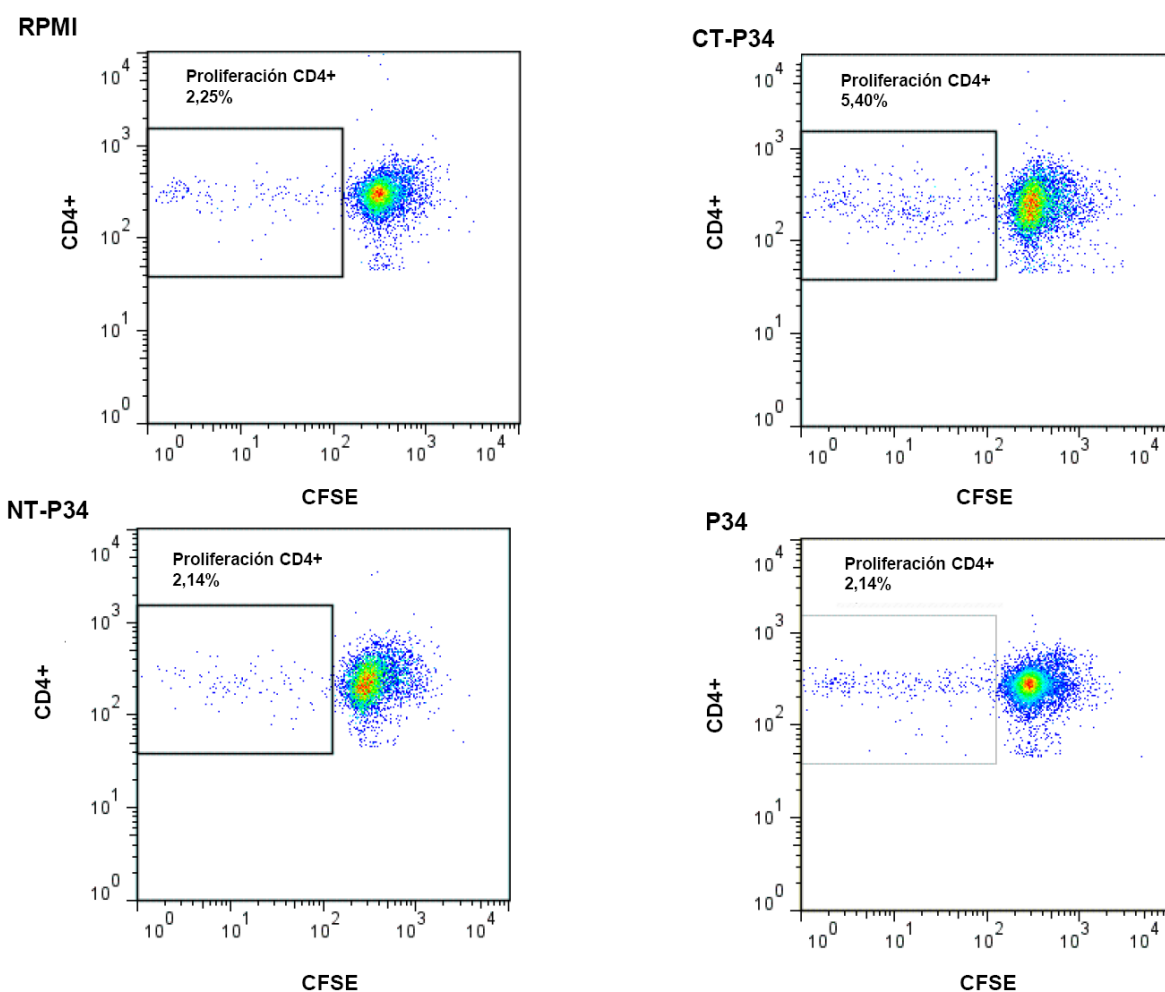


Figura 10. Citometría de flujo CFSE para evaluar proliferación de linfocitos T. Se incubaron esplenocitos de ratones alérgicos a PLV con P34, los péptidos: CT-P34 y NT-P34 en presencia de CFSE. Luego de 72hs de cultivo se realizó la marcación con anti-CD4.

4.3. Los mAbs anti-caseínas y sueros de pacientes alérgicos reconocen péptidos que se encuentran en las regiones predichas de reactividad cruzada *in silico*

Con el fin de validar las predicciones logradas *in silico* y profundizar el estudio de la proteína P34 se evaluó la reactividad *in vitro* con diferentes antisueros de péptidos sintéticos solapados que recorren la secuencia completa de P34.

Maapeo de epitopes lineales con péptidos solapados de P34

Se sintetizaron péptidos solapados en fase sólida para la identificación de péptidos responsables de la inmunoreactividad cruzada de P34. Cada péptido se dispuso en la

membrana en forma de 36 spots, con excepción del primer péptido que es de 10aas de longitud, los 35 péptidos restantes son de 15 aas de longitud, y se solapan de a 5 aminoácidos en cada extremo. La reactividad de los mismos se evaluó mediante dot blot empleando distintos anticuerpos primarios específicos contra PLV y/o soja, y se reveló con el anticuerpo secundario correspondiente y quimioluminiscencia. Mediante stripping pudimos evaluar la reactividad de distintos anticuerpos empleando la misma membrana con los péptidos en cada spot. En la **figura 11** se presentan los resultados correspondientes al mapeo realizado con los anticuerpos monoclonales específicos de α -caseína bovina (1D5), β -caseína bovina (4C3) y κ -caseína bovina (3B5), y con IgE proveniente de pools de sueros representativos de individuos reactivos a PS, a PLV y PS, y con IgE proveniente de un suero de un individuo reactivo sólo a PLV. La **tabla 4** describe las características de los sueros de pacientes utilizados en este ensayo.

Tabla 4. Características de los sueros de individuos reactivos a PLV y PS.

Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml	Paciente	DO IgE PS	DO IgE PLV	IgE Total UI/ml
1	0,310	0,094	78	6	0,310	0,324	236
2	0,455	0,075	79	7	1,369	0,223	294
3	0,676	0,098	237	8	1,191	0,341	360
4	0,750	0,114	261	9	0,098	0,244	265
5	0,332	0,322	462				

Nota: Con estos sueros se construyeron dos pools: pool 1 con los sueros 1, 2, 3 y 4; pool 2 con los sueros 5, 6, 7 y 8 (compuesto por los mismos sueros que el pool 1 de la **tabla3**).

Valores de corte: *IgE esp. PS DO: 0,121; IgE esp. PLV DO: 0,128*

Valor normal: *IgE total: 60 UI/ml*

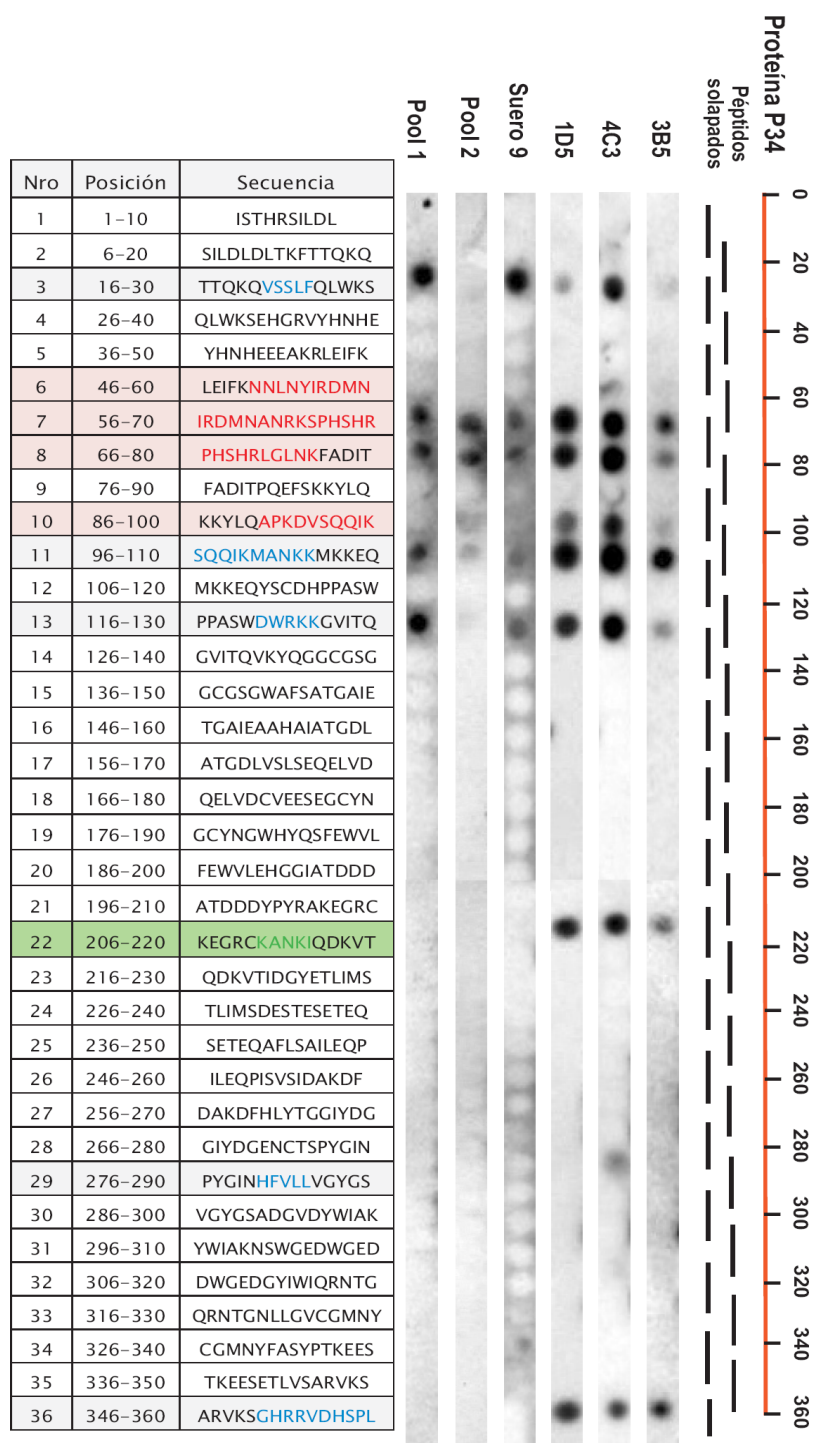


Figura 11. Epitopes de la proteína Gly m Bd 30K reconocidos por diversos anticuerpos Los diferentes spots (36 numerados a la izquierda) contienen péptidos que en su totalidad cubren la secuencia completa de P34 en forma solapada. Se incluyen las posiciones aminoacídicas y secuencias de cada péptido. Se revelaron con diferentes anticuerpos: mAbs específicos de caseínas bovinas (1D5, 4C3 y 3B5) y sueros de pacientes alérgicos con IgE específica de leche y leche/soja. Se colorearon los péptidos que mostraron las reactividades principales y que contienen los aas revelados por el análisis bioinformático: en rojo los aas que se encuentran en la zona I, en verde, los que se encuentran en la zona II y en azul se indican los que no detectados en el análisis in silico.

Los resultados mostrados en la **figura 11** confirman, como se caracterizó anteriormente, que distintas porciones de P34 muestra reactividad cruzada con caseínas. Además este análisis nos permitió identificar los péptidos que contienen los epitopes B (isotipos G y E) de reactividad cruzada. Mediante estos ensayos encontramos que 10 de los 36 péptidos sintéticos de 15 aas de longitud presentaron reactividad con los diferentes antisueros ensayados (péptidos número: 3, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 22, 29 y 36). Inclusive podemos mencionar que esta reactividad es diferencial en el sentido que algunos de estos 10 péptidos no reaccionan con la totalidad de los anticuerpos, mientras que otros reaccionan con todos ellos: los péptidos 7 y 8 (secuencias 7: 56-IRDMNANRKSPHSR-70, 8: 66-PHSHRLGLNKFADIT-80) mostraron además la mayor reactividad y cabe destacar se encuentran en la zona I predicha por el alineamiento con péptidos de caseínas como de reactividad cruzada. Los péptidos 10, 11, 13, 22 y 36 (secuencias 10: 86-KKYLQAPKDVSSQIK-100, 11: 96-SQIKMANKKMKKEQ-110, 13: 116-PPASWDWRKKGVITQ-130, 22: 206-KEGRCKANKIQDKVT-220, 36: 346-ARVKSghRRVDHSPL-360) presentan reactividad con los tres anticuerpos monoclonales reactivos a caseínas bovinas, y además los péptidos 10 y 13 presentan reactividad con el pool de sueros 1 y con el suero 9; los péptidos 3 y 10 en cambio no son tan “homogéneos” en su reactividad, el péptido 3 (secuencia 3: 16-TTQKQVSSLFQLWKS-30) reaccionó frente al pool 1, suero 9, mAb 1D5 y fuertemente con el mAb 4C3, finalmente los péptidos 6 y 29 (secuencias 6: 46-LEIFKNNLNyIRDMN-60 y 29: 276-PYGINHFVLLVGYGS-290) presentan sólo una reactividad y leve frente a m Ab 4C3. El péptido contenido en el spot 22 reaccionó con los 3 mAbs y corresponde a una secuencia contenida en la zona II del análisis bioinformático.

Los resultados del mapeo de epitopes empleando péptidos sintéticos solapados validan por lo tanto los resultados hallados mediante el método de predicción de epitopes de reactividad cruzada empleando herramientas bioinformáticas. En la **figura 12** se muestra la combinación de los resultados de ambos análisis y podemos observar que los anticuerpos monoclonales específicos caseínas bovinas empleados revelan los epitopes de reactividad cruzada en las zonas I y II predichas por alineamientos, y que los mAbs 1D5 y 4C3 (anti- α y anti- β respectivamente) muestran mayor reactividad. La reactividad IgE revelada con los sueros de los pacientes se observa sólo con los péptidos que fueron predichos para la zona I. Inclusive estos resultados son concordantes con los anteriormente mostrados de los péptidos recombinantes

NT-P34 y CT-P34. Por lo tanto concluimos que la zona I de la secuencia aminoacídica de P34 es la región más importante donde se encuentran los epitopes B de reactividad cruzada con las caseínas bovinas.

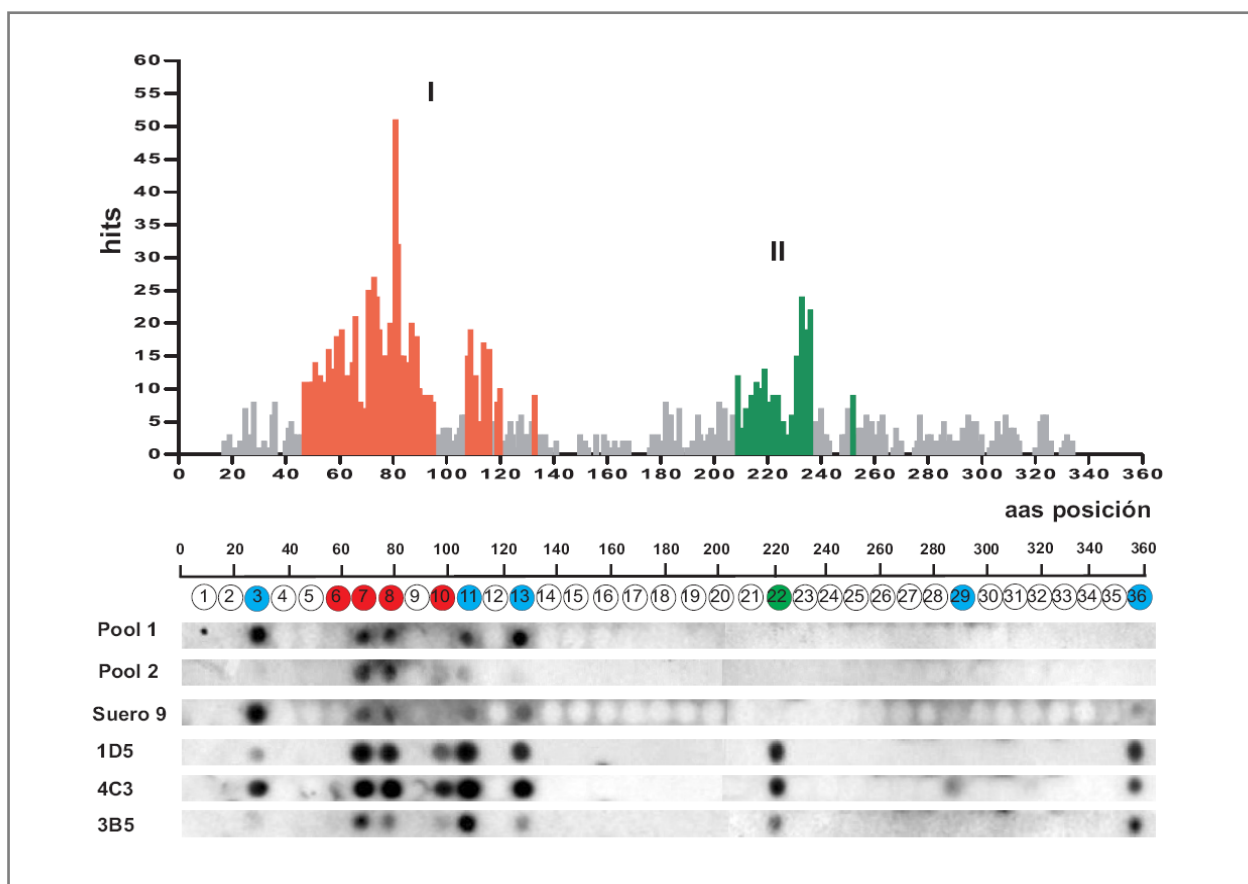


Figura 12. *Combinación de los resultados obtenidos en el mapeo de epitopes y del análisis in silico para P34. En el figura se muestra el gráfico de los hits obtenidos por alineamientos (panel superior, resultado computacional) y las imágenes de los péptidos solapados (panel inferior, resultado experimental), manteniendo el mismo esquema de colores que en las figuras anteriores.*

Los resultados obtenidos según los alineamientos de P34 con los epitopes de las caseínas y los resultados obtenidos por el mapeo de péptidos solapados (figuras 3 y 11) son mostrados en la secuencia de la figura 13. Puede sintetizarse la superposición de los resultados marcando en la secuencia de la proteína los aminoácidos revelados en ambos casos.

Gly m Bd 30K :1::360::::0.00:0.00

ISTHRSILDLDLTKFTTQKQVSSLFQLWKSEHGRVYHNHEEEAKRLEIFKNNLNYIRDMNANRKS PHSRLGLNKFADITPQEF SK
 KYLQAPKDV SQQIKMANKMK KEQYSCDHPPASWDWRKKGVITQVKYQGGCGSGWAFSATGAIEAAHAIATGDLVSLSEQELVDCV
 EESEGCYNGWHYQSFVWLEHGGIATDDDYPRAKEGRCKANKIQDKVTIDGYETLIMSDESTESETEQAFLSAILEQPI SVSIDA
 KDFHLYTGGIYDGENCTSPYGINHFVLLVGYGSADGVYWIAKNSWGEDWGEDGYIWIQRNTGNLLGVCGMNYFASYPTKEESETL
 VSARVKGHRRVDHSPL*

Figura 13. Epitopes de reactividad cruzada de P34 con caseínas bovinas obtenidos en el mapeo de epitopes y con el análisis *in silico*.

En la **figura 13** marcamos aquí la totalidad de los aminoácidos propuestos como responsables de la reactividad cruzada entre P34 y las caseínas bovinas: los aminoácidos pertenecientes a las zonas I y II predichas *in silico* fueron marcadas en rojo y verde respectivamente, los aminoácidos detectados mediante el mapeo de péptidos solapados fueron subrayados, los aminoácidos azules fueron localizados por el mapeo de epitopes, pero no fueron detectados mediante los alineamientos.

4.3. Análisis secuencial y comparación de la composición aminoacídica

En base a los resultados obtenidos en el análisis secuencial y en el mapeo de epitopes de P34 los aminoácidos se clasificaron en grupos o clases: un grupo de aminoácidos denominado **P34 positivos** conformado por aquellos aminoácidos que componen los epitopes que fueron predichos como responsables de la reactividad cruzada y los que fueron reactivos en el mapeo con péptidos sintéticos solapados de P34, un segundo grupo denominado **P34 negativos** formado por aminoácidos no reactivos en ninguno de los dos casos, y el tercer grupo de aminoácidos denominado **caseínas positivos** que forman parte de los epitopes de las caseína extraídos de la base de datos IEDB que se alinearon en las zonas I y II reactivas de P34. En la **figura 14** se muestran los gráficos de frecuencias de aparición de los 20 aminoácidos construidos sobre la base de la clasificación anterior y se comparan los resultados entre grupos.

Se marcaron en la **figura 14** los 6 aminoácidos más frecuentes para cada grupo y luego se compararon los tres resultados construyendo un gráfico de intersección de conjuntos.

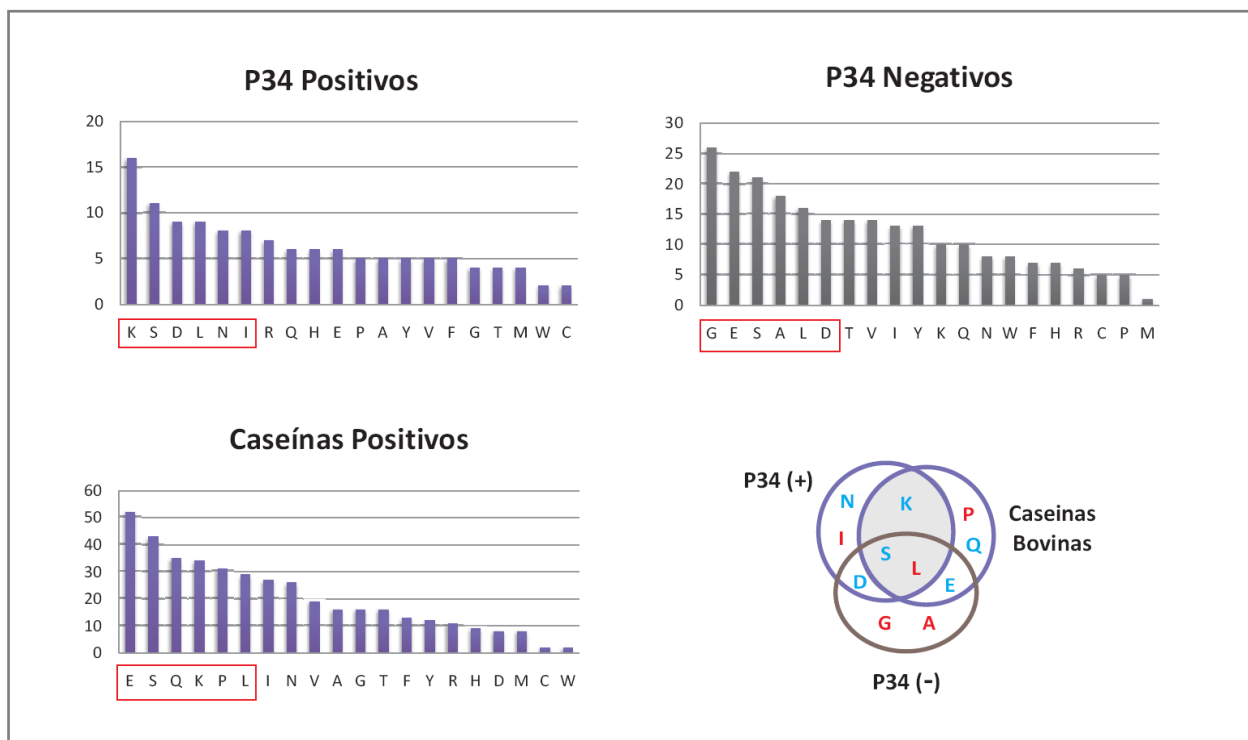


Figura 14. Frecuencias de aparición de los 20 aminoácidos en los tres grupos establecidos: grupo P34 positivos (aminoácidos predichos y reactivos en el mapeo), grupo P34 negativos (no reactivos) y grupo de caseínas bovinas positivas (aminoácidos que componen los péptidos de la base de datos IEDB que se alinean con P34 en las zonas de reactividad cruzada predicha). En los cuadros rojos se señalan los seis aminoácidos que se encuentran con mayor frecuencia en cada grupo, en el panel inferior derecho se esquematizan como intersección de conjuntos los aminoácidos más frecuentes que cada grupo tienen en común, los aas azules son de características polares y los rojos apolares.

Analizando los datos de la **figura 13** se observa claramente que lisina K (polar) es el aminoácido más frecuente en los epitopes de la proteína P34 y el cuarto más frecuente en el grupo de los epitopes de las caseínas positivas. Además lisina no se encuentra entre los aminoácidos más frecuentes en el grupo de los epitopes de P34 negativos. También se observa que los aminoácidos serina S (polar) y leucina L (apolar) son aminoácidos compartidos por los grupos positivos de las caseína y de P34, pero que también están entre los más frecuentes del grupo de los negativos.

Por lo tanto, si bien las caseínas bovinas y la proteína de soja P34 no mantienen una relación evolutiva, las composiciones aminoacídicas de sus epitopes están estrechamente relacionadas y sería la lisina K (polar) un aminoácido esencial para la unión con los anticuerpos. Se puede hallar en la literatura trabajos en los que afirman que particularmente la lisina es un aminoácido que tiene una alta probabilidad de formar parte en sitios de unión en epitopes IgE (Oezguen et al., 2008), lo cual reafirma nuestros resultados.

5. Discusión

En los capítulos anteriores de esta tesis se describió la caracterización *in vitro* e *in vivo* de los principales alérgenos de la soja y su reactividad cruzada con LV. Mostramos que las proteínas de soja P34 y P28 presentan una reactividad diferencial en ensayos que caracterizan la reactividad cruzada entre PLV y PS. Además mostramos que P34 contiene epitopes B y T de reactividad cruzada y su importancia *in vivo*.

En este capítulo desarrollamos primeramente un análisis *in silico* de ambos alérgenos de la soja, los que revelaron diferencias al buscar similitudes secuenciales entre las proteínas P34 ó P28 y las caseínas bovinas. Ratificando lo observado en los resultados experimentales anteriores, los alineamientos con epitopes de caseínas bovinas muestran a lo largo de la secuencia de P34 dos regiones de alta similitud secuencial, mientras que para la proteína P28 revelan que esta no guarda similitudes secuenciales significativas con las proteínas bovinas. Asimismo, el modelado por homología de la estructura tridimensional de P34 nos permitió localizar ambas regiones espaciales, y mostrar que las zonas aminoacídicas de reactividad cruzada se encuentran en la superficie de la molécula expuestas al solvente y por lo tanto, a los anticuerpos presentes. Por otro lado, utilizando un predictor de epitopes discontinuos comprobamos que los aminoácidos que componen estas zonas son posibles epitopes B conformacionales. Esta información recopilada es muy importante para poder explicar no solo la reactividad cruzada de esta proteína, sino también explicar su capacidad de producir el entrecruzamiento IgE en la superficie de basófilos y mastocitos de ratones alérgicos a PLV.

Las dos zonas de P34 o péptidos propuestos (zona I-NT-P34 y zona II-CT-P34) fueron clonados y expresados en *E.coli*. El análisis *in vitro* de fragmentos peptídicos confirmaron lo predicho *in silico*. Se evaluó la reactividad de los péptidos NT-P34 y CT-P34 mediante ensayos inmunoquímicos, y se observó un reconocimiento diferencial por distintos anticuerpos específicos de PLV. La mayor reactividad B está localizada en NT-P34 que se corresponde a la zona I de mayor similitud secuencial con las caseínas bovinas. Asimismo, estos péptidos revelaron que contienen epitopes T dado que son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T, especialmente el péptido CT-P34. La baja reactividad B y la mayor capacidad de inducir proliferación de células T permiten inferir que el péptido CT-P34 podría ser un potencial candidato para una inmunoterapia tolerogénica.

Concluimos el estudio realizando un mapeo de epitopes mediante el uso de péptidos solapados de 15 aminoácidos de longitud corridos con una ventana de a 5 aminoácidos que cubren toda la secuencia de la proteína P34. Los péptidos sintetizados sobre una membrana de celulosa fueron enfrentados también a diversos anticuerpos específicos a soja y a leche de vaca, y resultaron reactivos 10 de los 36 péptidos (péptidos nro 3, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 22, 29 y 36), de los cuales 4 (péptidos nro 6, 7, 8 y 10) se encuentran exactamente en la zona I predicha de reactividad cruzada y otros 3 muy cercanos a la misma. También uno de los péptidos mapeados (péptido nro 22) coincide con la zona II predicha de reactividad cruzada. Este resultado confirma también la mayor reactividad B (principalmente IgE) antes predicha y luego observada en la zona I (NT-P34).

Se utilizó la herramienta "*Peptide similarity*" de la base de datos SDAP: *Structural Database of Allergenic Proteins* (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_pps.html) que analiza la similitud de propiedades fisicoquímicas entre un péptido y todos los alérgenos que contiene esta base de datos y otorga un índice que se denomina PD (*property distance*). Índices PD menores que 10 indican que mantienen propiedades fisicoquímicas similares, cuanto mayor es la similitud entre las secuencias menor es el PD (Ivanciuc et al., 2003, 2009a, 2009b; Schein et al., 2007). Con esta herramienta se buscaron los 100 primeros alérgenos con el PD más bajo para cada epitope mapeado en la proteína P34 y en la **tabla 5** se listan los péptidos que pertenecen sólo a leche o soja indicándose la secuencia, el índice PD y la posición que ocupaban en la búsqueda. Puede observarse que los valores PD se encuentran entre 9.06–10.60 lo que indica que existen similitudes en las propiedades estructurales. Estos valores son significativamente diferentes de PD péptidos que no guardan relación estructural entre sí (valores entre 18–20) (Ivanciuc et al., 2009a). Sin embargo, la identidad de secuencia es muy baja. Además se observa que aunque SDAP no fue capaz de encontrar reactividad cruzada leche-soja cuando se analizaron las secuencias completas de P34 y P28 con la herramienta "*FASTA similarity search in the SDAP database*", al estudiar los péptidos mapeados de P34 con la herramienta "*Peptide similarity*" en la misma página esta predice zonas de propiedades fisicoquímicas similares entre leche (Bos d 8 (α S2 y β -caseínas) y Bos d 3) y soja en tres de los epitopes B de P34 identificados (péptidos nro 8, 10 (zona I) y 22 (zona II)).

Tabla 5. Similitud de los epitopes B identificados de P34 con proteínas de leche de vaca y soja

Péptido P34	Secuencia P34	Nombre alergeno	Secuencia alergeno	Posición en la búsqueda	PD
3	16-TTQKQVSSLFQLWKS-30	Bos d 3 (S100A7)	5 QLEQAITDLINLFHK 19	59	9.64
6	46-LEIFKNNLNYIRDMN-60	Gly m 5.0201	39 LRSCNSEKDSYRNQA 53	34	10.21
6	46-LEIFKNNLNYIRDMN-60	Gly m TI	12 LNSFSVDRYSQGSAR 126	36	10.22
6	46-LEIFKNNLNYIRDMN-60	Gly m 5.0101	39 LQSCNSERDSYRNQA 53	41	10.31
7	56-IRDMNANRKSPHSHR-70	Gly m 5.0201	39 LRSCNSEKDSYRNQA 53	34	10.21
7	56-IRDMNANRKSPHSHR-70	Gly m TI	12 LNSFSVDRYSQGSAR 126	36	10.22
7	56-IRDMNANRKSPHSHR-70	Gly m 5.0101	9 LQSCNSERDSYRNQA 53	41	10.31
8	66-PHSHRLGLNKFADIT-80	Bos d 8 (β-caseína)	135 TESQSLTLTDVENLH 149	43	9.71
8	66-PHSHRLGLNKFADIT-80	Gly m Bd28K	146 DPSTSLGLETFQSFY160	49	9.88
8	66-PHSHRLGLNKFADIT-80	Gly m aglutinina (lectina)	183 TTSWDLANNKVAKVL 197	62	10.21
8	66-PHSHRLGLNKFADIT-80	Gly m Bd28K	273 PASYNLYDDKKADFK 287	67	10.32
8	66-PHSHRLGLNKFADIT-80	Gly m 6.0501	492 SNSYNLCQSQRQLK 506	97	10.62
10	86-KKYLQAPKDVSQQIK-100	Bos d 8 (αS2-caseína)	173 KNRLNFKKISQRYQ 187	14	9.21
10	86-KKYLQAPKDVSQQIK-100	Bos d 8 (αS2-caseína)	91 KHYQKALNEINQFYQ 105	77	10.32
10	86-KKYLQAPKDVSQQIK-100	Gly m 6.0301	447 QQTFNLRQARQVK461	78	10.32
11	96-SQQIKMANKMKKEQ-110	Gly m 5.0101	381 KEQIRALSKRAKSS395	57	9.63
13	116-PPASWDWRKKGVTQ-130	Ninguno entre los 100 primeros			
22	206-KEGRCKANKIQDKVT-220	Bos d 8 (β-caseína)	51 EEQQQTEDELQDKIH 65	6	9.06
		Gly m aglutinina (lectina)	60 SSGKLQLNKVDENGT 74	29	9.99
		Gly m 4	134 KTGKAKADALFKAIE 148	67	10.58
29	276-PYGINHFVLLVGYGS-290	Gly m Bd28K	328 PISDEYITVLSGYGE 342	37	10.60
36	346-ARVKSghrrVDHSPL-360	Gly m 6.0501	67 AGVTVSKRTLNRNGL 81	27	10.44

Asimismo aparecen varios alérgenos de soja como Gly m 5, Gly m 6 y P28, en concordancia con los resultados presentados en este trabajo, y en trabajos previos que describen la reactividad cruzada entre ambos sistemas proteicos.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo podríamos decir en principio que los criterios fijados por FAO/WHO para predecir reactividad cruzada (35% de similitud en

una ventana de 80 aminoácidos o 6 aminoácidos idénticos) no serían suficientes (Bindslev-Jensen et al., 2003).

En el capítulo 1 de este trabajo mapeamos algunos de los epitopes de caseínas reconocidos por el mAb1D5 y al final de este capítulo identificamos epitopes B de la proteína P34. Con estos datos y utilizando la herramienta de la base SDAP “*Peptide-protein PD index*” (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_pdi.html), que identifica zonas con propiedades similares entre pares de péptidos, comparamos los péptidos mapeados en caseínas con los péptidos solapados de P34. En la **tabla 6** se muestran los resultados obtenidos de los PD calculados para cada par de péptidos caseína-P34. Puede observarse que no existe una correlación de los PD y la reactividad frente a 1D5, sólo dos de los 10 péptidos mapeados en P34 (péptidos nro 3 y 22) son informados con un PD cercano al valor 10, pero dos de los péptidos más reactivos de P34 frente al mAb 1D5 (péptidos 7 y 8) no tienen un equivalente entre los epitopes identificados en las caseínas según esta herramienta. Por lo tanto, estos resultados indican que el índice PD tiene otras limitaciones además de las señaladas anteriormente.

Tabla 6. Índices PD entre epitopes de caseínas reconocidos por el mAb 1D5 y epitopes de P34

Epitope 1D5	Secuencia Caseína	PD	Péptido P34	Secuencia P34	Reacción
αS1-cas	91YLGYLEQLLR100	10.82	3	20QVSSLFQLWK29	+
αS1-cas	19NLLRFFVAPFPE30	11.28	2	6SILDLDLTKF15	-
αS1-cas	97QLLRLLKKYKVPQLE110	11.41	2	6SILDLDLTKFTTQK19	-
κ-cas	41YPSYGLNYYQKPVALLINQFLPYYPYAK69	14.28	25 y 26	231SDESTETEQAFLSAILEQPISVSIDAK259	-
κ-cas	22RFFSDKIAKYIPIQYVLS39	12.22	22 y 23	210RCKANKIQDKVTIDGYET230	+++

El análisis secuencial por comparación de la composición aminoacídica de los epitopes de P34 y las caseínas bovinas nos señalan a los aminoácidos lisina K, serina S y leucina L como aminoácidos frecuentes, y principalmente a la lisina K como un aminoácido crítico para la unión al anticuerpo.

Oezguen y col. realizaron un análisis de las áreas superficiales expuestas en epitopes IgE lineales conocidos y descubrieron que la probabilidad de encontrar lisinas K es significativamente alta y que las probabilidades de encontrar fenilalanina F, triptófano W, metionina M e isoleucina I son significativamente bajas. Proponen que el proceso de unión podría estar guiado vía interacción electrostática lo que explicaría la carga positiva neta

(alaninas A, histidinas H y lisinas K), o por lo menos la alta densidad de lisinas en la región del epítopo (Oezguen et al., 2008).

Este resultado es muy importante al momento de diseñar una terapia que utilice el fenómeno de reactividad cruzada para el tratamiento de alergias alimentarias, como lo es el caso de la alergia a leche de vaca. En este sentido consideramos altamente significativo haber identificado la proteína P34 como proteína de reactividad cruzada con PLV, identificado epítopos inmunodominantes de reactividad cruzada y proponer a la lisina K como aminoácido crítico en la interacción con los distintos anticuerpos. Por lo tanto hemos planteado la síntesis de péptidos mutagenizados contenidos en la zona I (péptido NT-P34 y péptidos 7 y 8 solapados) para comprobar si el reemplazo de lisina por alanina o glicina reduce o elimina la reactividad con los diferentes anticuerpos.

Los alérgenos modificados son potencialmente útiles, más seguros y más eficaces para inmunoterapias dado que contienen epítopos inmunoreactivos modificados o hipoalérgicos, y de esta manera se reduce la probabilidad de activación, IgE-mediada, de células como mastocitos, basófilos y eosinófilos en los pacientes sensibilizados. Estas reacciones son las que generan los efectos adversos en los tratamientos responsables del abandono del mismo en un alto porcentaje de pacientes tratados (ver en la introducción sección 6.1. Terapias alérgeno-específicas). Hay varios mecanismos propuestos para explicar los efectos benéficos de la inmunoterapia alérgeno específica incluyendo la inducción de IgG (bloqueante), reducción de la IgE específica a largo plazo, reducción del reclutamiento de células T efectoras, alteración del balance de citoquinas (Th1-Th2), anergia de células T y la inducción de células T regulatorias. Sin embargo pueden ocurrir reacciones adversas durante las inmunoterapias alérgeno específicas realizadas con los alérgenos nativos (Oezguen et al., 2008) es por esto que el uso de péptidos modificados (sustituciones de aminoácidos críticos para la unión IgE) derivados de proteínas de reactividad cruzada son una alternativa muy interesante para evitar o minimizar estas reacciones adversas.

En conclusión, estos resultados muestran que existen dos epítopos inmunodominantes en la secuencia de la proteína de soja Gly m Bd 30K (P34) de reactividad cruzada con PLV, que los mismos se encuentran separados espacialmente y accesibles al solvente, lo cual podría explicar

las pruebas cutáneas positivas observadas con P34 en los ratones alérgicos a leche bovina. Asimismo, hemos demostrado que el análisis in silico realizado sobre predicción de epitopes de reactividad cruzada detecta las mismas zonas de reactividad que los experimentos utilizando péptidos solapados. Esto nos permitió mapear epitopes de reactividad cruzada e identificar aminoácidos críticos para la reactividad cruzada

**DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS**

En el presente trabajo de tesis se realizó la caracterización de alergen de soja y su reactividad cruzada con caseínas bovinas. Confirmada su importancia clínica en un modelo de alergia alimentaria a leche de vaca, aplicamos este concepto al desarrollo de una inmunoterapia para el tratamiento de esta patología.

La reactividad cruzada entre estos sistemas proteicos ha sido planteada para comprender por qué pacientes pediátricos alérgicos a leche de vaca poseen una hipersensibilidad clínica a soja durante el tratamiento sustitutivo. Este fenómeno ha sido descrito en numerosos países (Ahn et al., 2003; Katz et al., 2008; Klemola et al., 2005; Szaflarska-Szczepanik and Gasiorowska, 2003; Zeiger et al., 1999) y es de gran importancia local (Orsi et al., 2009). Sin embargo nuestro grupo ha sido pionero en la descripción inmunológica y en la identificación de los alergen responsables. En la actualidad existe una controversia acerca de la importancia clínica de la reactividad cruzada leche-soja, y sobre la conveniencia de emplear soja como sustituto de leche de vaca en pacientes con edades comprendidas entre los 6 meses y 2 años. Actualmente resulta muy difícil descartar la posibilidad de exposición a soja ya que es un aditivo presente en muchos alimentos, por lo que se requiere analizar si realmente existe una reactividad cruzada entre estos alergen o los pacientes están sensibilizados a la soja. Estos estudios requieren del desarrollo de herramientas adecuadas que permitieran identificar las moléculas involucradas, estudiar su reactividad empleando métodos *in vitro* e *in vivo*, avanzar en el estudio del mecanismo molecular y celular de la respuesta inmune observada, y evaluar la posibilidad de desarrollo de inmunoterapias correctivas del sistema inmune. Estos estudios fueron abordados en este trabajo de tesis.

Bases moleculares de la reactividad cruzada leche-soja y su importancia *in vivo* empleando un modelo murino de alergia alimentaria

Los primeros estudios de reactividad cruzada leche-soja desarrollados por nuestro grupo permitieron identificar la glicinina (globulina 11S) Gly m 6 G4 (A4A5B3) como una proteína de reactividad cruzada con las caseínas bovinas (Rozenfeld et al., 2002). Posteriormente, se identificó un segundo componente de soja reconocido por sueros IgE de pacientes ALV: la β -conglucina (globulina 7S) Gly m 5 (Curciarello et al., 2008). El empleo de

ratones con alergia alimentaria IgE–mediada a proteínas de leche de vaca permitió evaluar *in vivo* la importancia que las proteínas totales de soja, en particular A4A5B3, tienen en la inducción de reacciones alérgicas. Estos resultados nos permitieron confirmar la importancia clínica de la reactividad cruzada inmunoquímica descrita (Smaldini et al., 2012). Aunque la globulinas 7S y 11S pertenecen a la misma superfamilia de alergenos (cupinas), hasta el momento la bibliografía sólo ha descrito casos de reactividad cruzada entre proteínas de una misma familia (Berkner et al., 2009; de Leon et al., 2007; Sicherer and Sampson, 2007). No hay ejemplos descritos de reactividad cruzada entre proteínas no relacionadas filogenéticamente, como es el caso de las caseínas bovinas y las globulinas de reserva de la soja. Por este motivo en el primer capítulo de este trabajo se estudiaron e identificaron epitopes de reactividad cruzada empleando un anticuerpo monoclonal específico de caseínas bovinas denominado 1D5. Este anticuerpo reconoce con mayor afinidad α S1–caseína bovina, pero también reconoce κ - y β -caseína, con valores de teniendo constantes de afinidad en el rango esperado para anticuerpos monoclonales. Mediante herramientas de inmunoproteómica se caracterizaron los epitopes reconocidos por el mAb 1D5 en las caseínas: en α S1–caseína se identificaron dos epitopes con las secuencias NLLR o QLLR (posiciones 19–30, 91–100 y 97–100) y dos epitopes en κ -caseína (posiciones 22–39 y 41–69) que poseen entre sí baja similitud secuencial. La presencia de más de un epitope en estas proteínas se puede explicar por las duplicaciones ocurridas durante la evolución de estas familias de genes (Hobbs and Rosen, 1982; Kawasaki and Weiss, 2003). A pesar de que la κ -caseína no es una fosfoproteína que une calcio, como si lo son las α S1, α S2 y β -caseínas, los genes de todas las caseínas poseen un origen evolutivo común (Kawasaki and Weiss, 2003; Kawasaki et al., 2007) lo que permite comprender que sean reconocidas por un mismo anticuerpo monoclonal a pesar de la baja identidad de secuencia. Empleando este mAb identificamos dos péptidos en la subunidad α de la β -conglucina (Gly m 5.0101) que contienen epitopes B: corresponden a las posiciones 101–120 y 503–521 que poseen también aminoácidos cargados/polares (K, R Q) e hidrofóbicos (L, F, Y).

El origen propuesto para las proteínas de la leche se remonta a los ancestros de los mamíferos, que fueron animales endotérmicos pequeños y de rápido crecimiento, en los que estas proteínas se constituyeron como importante fuente de aminoácidos, calcio y fósforo superando las limitaciones que presentaban los huevos de animales no endotérmicos (Oftedal,

2012). Por otro lado, las proteínas de semilla aportan aminoácidos importantes para el desarrollo del embrión y su estructura se relaciona con las germinas presentes en el reino vegetal, y en formas de resistencia que presentan algunos procariontes (Dunwell et al., 2000, 2004, 2008). Sin embargo no han sido descritas proteínas similares en el reino animal. Por lo tanto, estos sistemas proteicos no están relacionados evolutivamente y sin embargo pueden ser reconocidos como proteínas similares por diferentes receptores antigénicos (anticuerpos y receptores de LT).

En la soja se han encontrado 16 proteínas reconocidas por sueros IgE de pacientes (L'Hocine and Boye, 2007) entre las que se encuentran Gly m Bd 30K (P34) y Gly m Bd 28K (P28), además de las globulinas de reserva 7S (Gly m 5) y 11S (Gly m 6). Teniendo en cuenta que el tamaño de P34 coincide con el de Gly m 6 G4 o A4A5B3, y además que P34 es considerada el principal alérgeno de soja (Helm et al., 1998), a pesar de que aún no ha sido incluida en la lista de alérgenos por la IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (<http://www.allergen.org/>), se decidió analizar si esta proteína estaba involucrada en la reactividad cruzada con caseínas bovinas. También se analizó la reactividad cruzada de la proteína P28 (Hiemori et al., 2004; Tsuji et al., 2001b; Xiang et al., 2004) que pertenece a la familia de las cupinas como Gly m 5 y Gly m 6. Estas proteínas se obtuvieron en forma recombinante y se demostró que tanto P34 como P28 son reconocidas por sueros de pacientes con historia clínica compatible con una ALV, y que P34 es reconocida por mAbs específicos de α , β y κ -caseínas. Además, empleando un ELISA competitivo con el mAb 1D5 se mostró que P34 es capaz de desplazar su unión a α -caseína, mientras que P28, no. Estos resultados confirman que únicamente P34 poseería epítopes compartidos con α -caseína (capítulo 2). La importancia de este reconocimiento fue evaluada *in vivo* empleando ratones ALV, demostrándose que P34 contiene epítopes B y T de reactividad cruzada con proteínas de leche de vaca, responsables de la inducción de reacciones de hipersensibilidad inmediata frente a la exposición oral a la soja y de pruebas cutáneas positivas (capítulo 2).

Posteriormente, para identificar las regiones responsables de la reactividad cruzada se utilizó un método de alineamiento secuencial que supera las limitaciones de los métodos convencionales y que consiste en alinear los péptidos cortos de caseínas descritos como epítopes inmunodominantes, con P34. En base a las identidades y similitudes halladas se

estableció una escala de valores que permitiera valorar las reactividades cruzadas (capítulo 4). Este análisis secuencial *in silico* permitió localizar en P34 dos regiones (denominadas NT-P34 y CT-P34) candidatas a ser las responsables de la reactividad cruzada con las caseínas bovinas. Por lo tanto se obtuvieron estas dos regiones en forma recombinante y se evaluó su reconocimiento *in vitro* empleando sueros IgE y mAb-CB. Estos ensayos nos permitieron confirmar que el péptido NT-P34 contiene epitopes B, mientras que la región CT-P34 contiene epitopes T capaces de inducir la proliferación de linfocitos T de ratones alérgicos a proteínas de LV. Estos resultados demuestran la capacidad predictiva de los métodos bioinformáticos empleados.

La FAO/WHO fija como criterio para predecir reactividad cruzada que las proteínas presenten un 35% de similitud en una ventana de 80 aminoácidos o 6 aminoácidos idénticos (Bindslev-Jensen et al., 2003). Los resultados mostrados en este trabajo muestran que proteínas que no cumplen con estas reglas pueden presentar reactividad cruzada *in vitro* e *in vivo*. Este es el primer trabajo que muestra que varias proteínas de distintos orígenes evolutivos y función, como lo son las caseínas bovinas y las globulinas de reserva 7S y 11S junto a la proteasa cisteínica inactiva P34, presentan reactividad cruzada de importancia clínica, y no así la cupina P28. La presencia de anticuerpos IgE con capacidad de reconocer proteínas tan diversas tal vez se deba a la diversidad de los distintos genes de caseínas y a la presencia de regiones repetidas que hace que las inmunoglobulinas generadas en el organismo tengan una afinidad intermedia y una mayor promiscuidad, como la observada con los anticuerpos monoclonales generados empleados. Mostramos que los anticuerpos presentaban una afinidad intermedia por las caseínas, lo cual podría justificar el reconocimiento cruzado entre las diferentes caseínas (aunque reconoce cada una de ellas en forma preferencial) y las diferentes proteínas de soja. No podemos descartar que lo mismo ocurra con los anticuerpos IgE específicos de las caseínas inducidos en los pacientes alérgicos a LV. Es importante señalar que la posibilidad de reconocimiento múltiple por parte de los anticuerpos ha sido descrita para comprender las bases moleculares de las enfermedades autoinmunes y las alergias, y en última instancia para comprender el funcionamiento del sistema inmune. Esta propiedad se ha denominado promiscuidad de los anticuerpos (James and Tawfik, 2003; James et al., 2003). Por lo tanto sostenemos que la promiscuidad en el reconocimiento antigénico por parte de los

anticuerpos monoclonales está dirigida a epitopes conformacionales similares, en base a los resultados mostrados de MALDI-TOF y péptidos solapados sintéticos (carecen de similitud secuencial). Aunque los eventos moleculares que llevan a la formación de una célula plasmática productora de IgE implican la maduración de la afinidad (Yanagihara, 1999), no está claro el rol que tiene la maduración de la afinidad de IgE en la severidad de la alergia, ya que por ejemplo para alergia a maní no se encontró una correlación positiva entre estos parámetros (El-Khouly et al., 2007). Sin embargo, para ALV se ha informado que cuanto mayor es la diversidad de epitopes reconocidos y la afinidad por los mismos más severos son los síntomas y la persistencia de la alergia (Wang et al., 2010). Ninguno de los epitopes mapeados en este trabajo coincide con los informados en el trabajo de Wang y colaboradores en el cual describen las características de los epitopes de alta afinidad que son reconocidos por pacientes con persistencia de alergia a leche bovina con la edad (Wang et al., 2010). Por lo tanto estos resultados pueden significar un aporte que permitan una comprensión más amplia del reconocimiento de los alérgenos por parte de los elementos del sistema inmune.

El mapeo de epitopes realizados en caseínas bovinas y en PS empleando proteómica, péptidos sintéticos y proteínas recombinantes permitió definir características comunes en ellos. Los epitopes reactivos presentan una longitud de 5–7 aminoácidos, con aminoácidos polares críticos para la inmunoreactividad, que estructuralmente actuarían de “anclaje”, flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos que estabilizarían la interacción. Epitopes con características similares han sido descritos para otros sistemas alérgicos (Asakawa et al., 2010). Además secuencias aminoacídicas de esta longitud serían suficientes para constituir epitopes lineales y conformacionales capaces de ser reconocidos por anticuerpos de reactividad cruzada (Silvanovich et al., 2006).

En síntesis, a través de métodos *in vitro* empleando antígenos en solución y en fase sólida caracterizamos los epitopes presentes en caseínas, Gly m5 y P34. El análisis *in silico* permitió además identificar las regiones y los aminoácidos de P34 que serían compartidos con los epitopes descritos para caseínas. La reactividad cruzada de estos péptidos fue finalmente confirmada *in vivo*, empleando el modelo murino de alergia alimentaria a leche de vaca mediado por IgE. Este modelo no sólo nos permitió confirmar la reactividad cruzada diferencial de P28 y P34, sino que además nos permitió profundizar la caracterización de epitopes de

estas moléculas, dado que P34 fue capaz de desencadenar signos clínicos de hipersensibilidad en ratones previamente sensibilizados únicamente a leche de vaca. Estos resultados confirman además la importancia de contar con modelos animales de este tipo, para realizar estudios que en pacientes están limitados por cuestiones éticas.

Diseño de una estrategia de inmunointervención segura para leche de vaca

En la actualidad se plantea como estrategia para el tratamiento de las enfermedades alérgicas la inducción de tolerancia a través de distintos tipos de inmunoterapias. Entre ellas la inmunoterapia alérgeno-específica utiliza el mismo alérgeno, o una proteína estructuralmente relacionada, para inducir linfocitos T con propiedades regulatorias (Treg). Sobre la base de los resultados de P34 como proteína de reactividad cruzada capaz de inducir reacciones alérgicas en ratones sensibilizados a LV e inducir la expansión *in vitro* de LT se planteó la hipótesis de que esta proteína podría funcionar en una inmunoterapia tolerogénica. Para tal fin empleamos el modelo murino de alergia alimentaria a LV y estudiamos un protocolo de inducción de tolerancia mediante la administración sublingual de P34 (inmunoterapia sublingual). Observamos un aumento de linfocitos Treg inducibles (linfocitos T CD4+ Foxp3+) en ganglios mesentéricos y en bazo, que serían los responsables de la inhibición de la reacción alérgica observada en animales sensibilizados y tratados. Estos resultados nos alientan a continuar con el estudio y la optimización de estas inmunoterapias empleando proteínas de reactividad cruzada y péptidos derivados de P34, de manera de hallar un protocolo experimental que minimice el riesgo de la inducción de reacciones adversas. En los ensayos clínicos en pacientes con ALV estas reacciones constituyen el principal obstáculo y son la causa de abandono de los tratamientos. En todos los trabajos publicados se observa que la administración de proteínas de leche por vía mucosal en pacientes alérgicos a leche bovina se desencadenan estas reacciones adversas. Sin embargo, con la inmunoterapia sublingual se ha logrado reducirlas, pero no eliminarlas. Esto puede deberse a que en este tipo de inmunoterapias las cantidades de proteínas necesarias para inducir tolerancia son entre 50–400 veces menor con respecto a una inmunoterapia oral. Dado que hemos identificado a NT-P34 como el péptido que contiene el o los epítopes B, y hemos identificado los aminoácidos inmunodominantes que serían los responsables de inducir las reacciones alérgicas por un lado, mientras que CT-P34 promueve la proliferación de linfocitos T, pero no es capaz de provocar una respuesta alérgica,

proponemos que la modificación de NT-P34 (mutagénesis dirigida) y su inclusión en una inmunoterapia junto a CT-P34 podrían ser candidatos potenciales para una vacuna mucosal. De esta manera planteamos continuar con esta línea de trabajo y sintetizar quimeras de P34 que contengan péptidos mutagenizados que posean epitopes B con capacidad reducida o nula de unir IgE, pero capaces de inducir la síntesis de IgG (anticuerpos bloqueantes), y con epitopes T para inducir LT con actividad regulatoria (epitopes T tolerizantes). Para ello proponemos mutagenizar el péptido NT-P34 sustituyendo las lisinas (K) y ciertos aminoácidos hidrofóbicos vecinos, por alaninas (A) o glicinas (G) a fin de disminuir su alergenicidad. Luego fusionaremos este péptido mutagenizado con el péptido CT-P34 para el tratamiento de los animales alérgicos por vías mucosales. El empleo de esta quimera recombinante constituiría una inmunoterapia desensibilizante y tolerizante que aún no ha sido estudiada en estos sistemas. Además es necesario optimizar dosis, tiempos y vías de administración del antígeno para lograr un tratamiento lo más eficiente y duradero posible. También hemos planteado la combinación de estos péptidos tolerizantes junto a adyuvantes pro-tolerogénicos (hidratos de carbono, péptidos derivados de parásitos), o pro-Th1 (OMP de *Brucella abortus*), o en forma combinada con terapias biológicas (anticuerpos monoclonales anti-IgE).

Existen numerosos ensayos clínicos en los cuales se inducen mecanismos de tolerancia mediante el empleo de péptidos que contienen epitopes T. Existen numerosos estudios en modelos animales y en pacientes que emplean péptidos derivados de diferentes alérgenos: péptidos derivados de Der p 2 del dermatofagoides (Hoynes et al., 1993; O'Hehir et al., 1991), de alérgenos del polen Bet v 1 y Phl p 1 (Ball et al., 2009; Bauer et al., 1997; Vrtala et al., 2000, 2001), del veneno de insectos como Api m 1 (Von Garnier et al., 2000; King et al., 1998), derivados del alérgeno mayor del gato Fel d 1 (Alexander et al., 2005; Briner et al., 1993; Pène et al., 1998). Las inmunoterapias han evolucionado marcadamente en las últimas décadas. Las vías primitivas de administración de los alérgenos fueron la intradérmica y subcutánea. Las innumerables reacciones adversas inducidas (muchas fatales) llevaron al estudio de vías alternativas, siendo las mucosales (oral o sublingual) las rutas que actualmente se emplean por ser una forma más segura y efectiva. Es indudable que el mejor conocimiento de los sistemas inmunes asociados a las mucosas ha impactado enormemente en este campo. De todas maneras, son pocos los trabajos que emplean péptidos hipoalergénicos para el tratamiento de

alergias alimentarias lo cual nos lleva profundizar los estudios en base a los resultados aquí mostrados. Recientemente se vio que la administración oral de péptidos T derivados del alérgeno ovomucoide (Ovm) del huevo en forma de monómero o trímero por vía oral alivia las reacciones alérgicas en ratones alérgicos al huevo (Rupa and Mine, 2012). Nuestro modelo murino de alergia alimentaria IgE–mediado nos brinda la posibilidad de contar con una herramienta *in vivo* muy importante para evaluar la eficiencia y seguridad de estas nuevas estrategias terapéuticas. Por otro lado somos conscientes que muchas de estas potenciales y novedosas terapias pueden funcionar correctamente en un modelo animal y luego fracasar en pacientes. Existen muchos ejemplos en la práctica clínica que indican que no siempre es posible extrapolar los resultados obtenidos en un animal al hombre.

Reforzamos entonces el concepto sobre la importancia del mapeo de epitopes B y T para el desarrollo de vacunas mucosales para el tratamiento de alergias alimentarias, y el empleo de modelos animales para validar protocolos propuestos. En este sentido son muy importantes los métodos computacionales de predicción de epitopes B (aplicado en esta tesis) y de epitopes T (utilizando diferentes servidores disponibles) (Bian and Hammer, 2004; Nielsen et al., 2010; Zhang et al., 2005) para complementar los estudios experimentales, reducir al mínimo el número de experimentos de validación y acelerar el proceso de mapeo de epitopes.

En conclusión, en este trabajo de tesis identificamos un nuevo alérgeno de soja de reactividad cruzada, Gly m Bd 30K previamente descrito como uno de los alérgenos mayores de la soja. Identificamos y caracterizamos sus epitopes B, iniciamos la caracterización de sus epitopes T e incluimos esta proteína en un protocolo de inmunoterapia tolerizante, demostrando que es eficaz en la disminución de los signos clínicos en ratones ALV, en la disminución de la producción de IgE y citoquinas Th2, y en la negativización de las pruebas cutáneas.

Mostramos entonces que disponemos de varias herramientas para avanzar en la resolución de una problemática sanitaria que afecta a gran parte de los niños en nuestra población.

GRÁFICOS Y TABLAS ADICIONALES

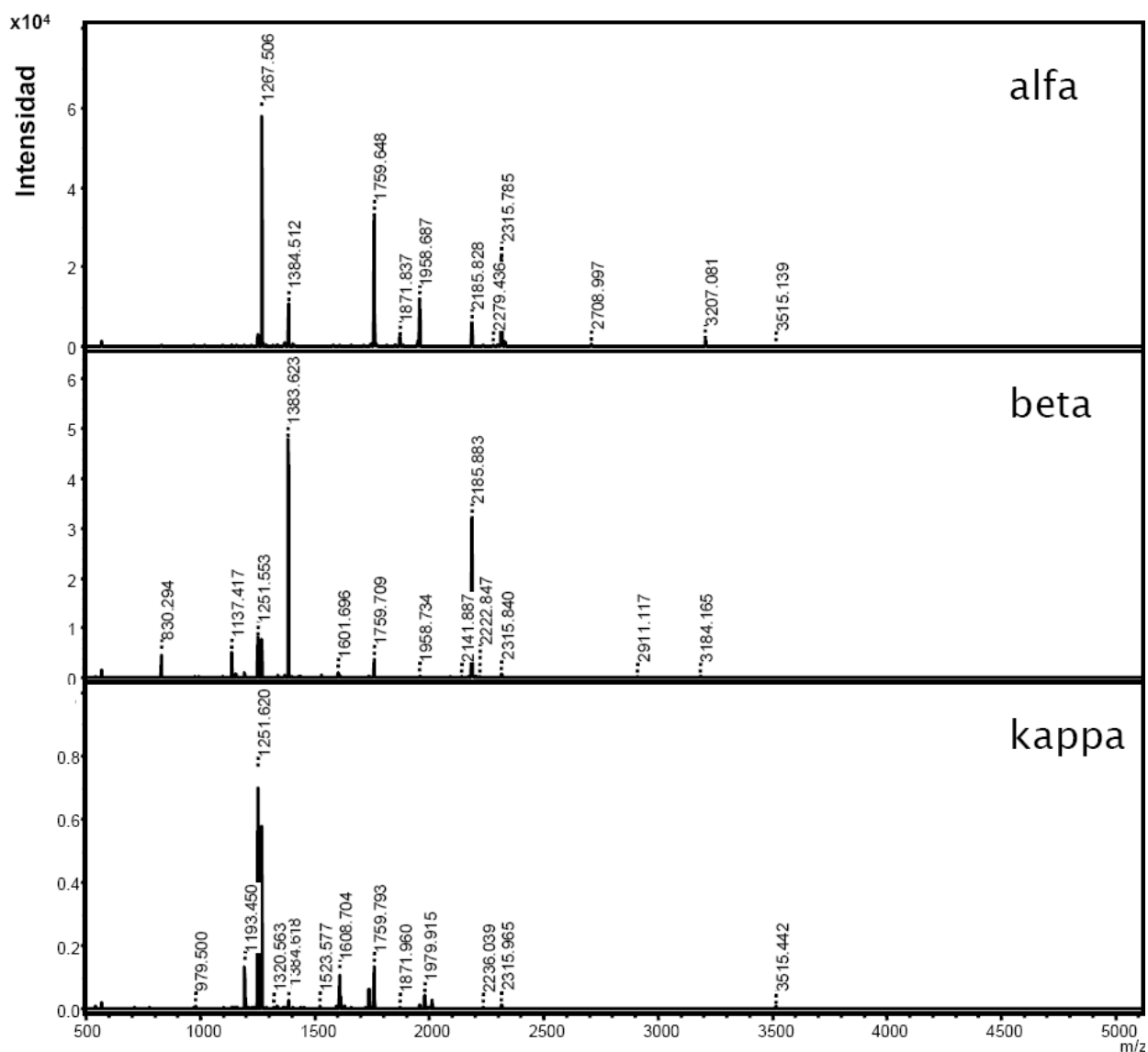


Figura 1. Espectros de masas MALDI-TOF correspondientes a las digestiones de las caseínas bovinas con tripsina. Los péptidos de m/z permiten identificar con certeza esta proteína (huellas peptídicas). El número en los espectros indica la masa molecular $[M+H]^+$.

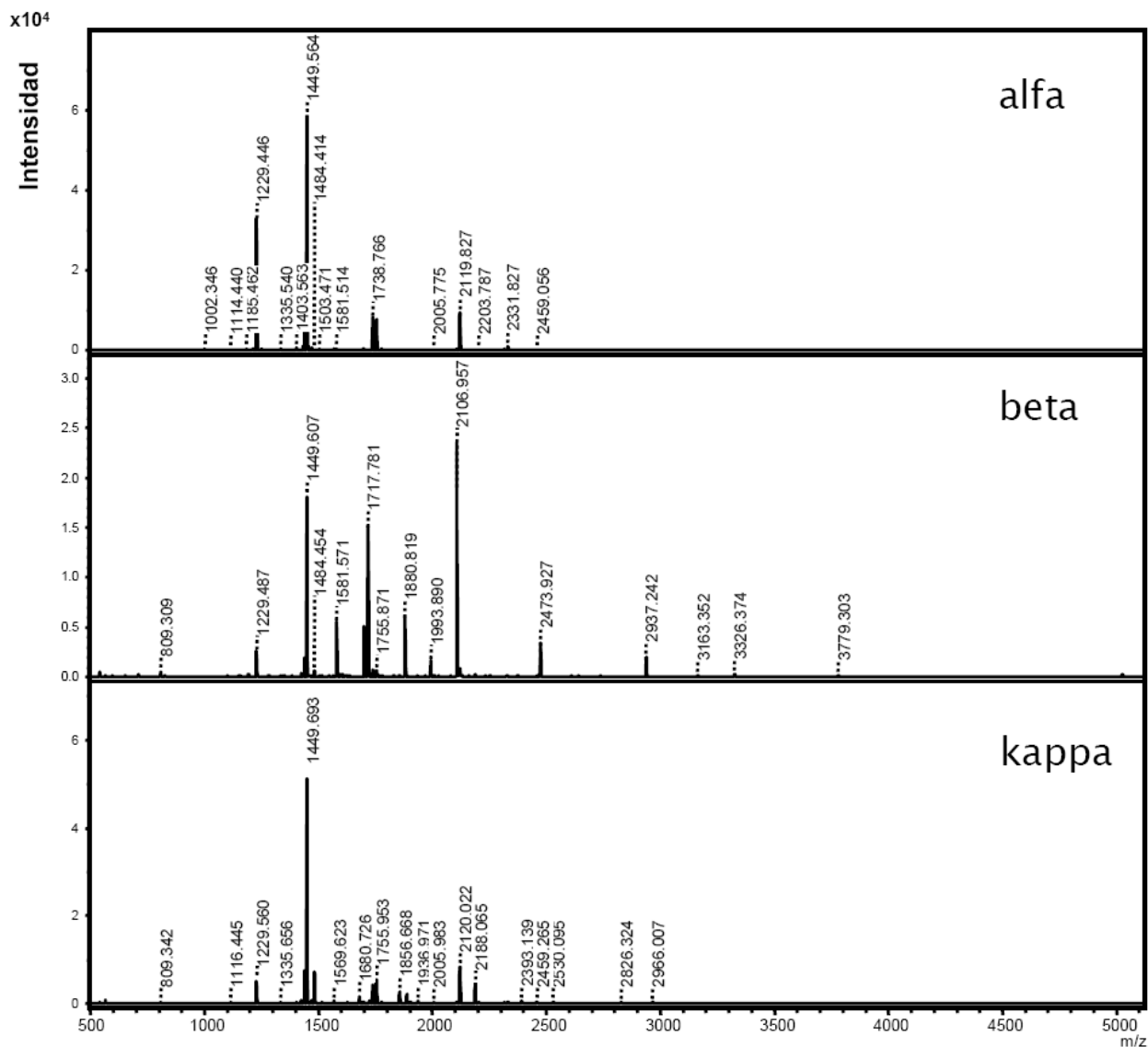


Figura 2. Espectros de masas MALDI-TOF correspondientes a las digestiones de las caseínas bovinas con Glu-C. Los péptidos de m/z permiten identificar con certeza esta proteína (huellas peptídicas). El número en los espectros indica la masa molecular $[M+H]^+$.

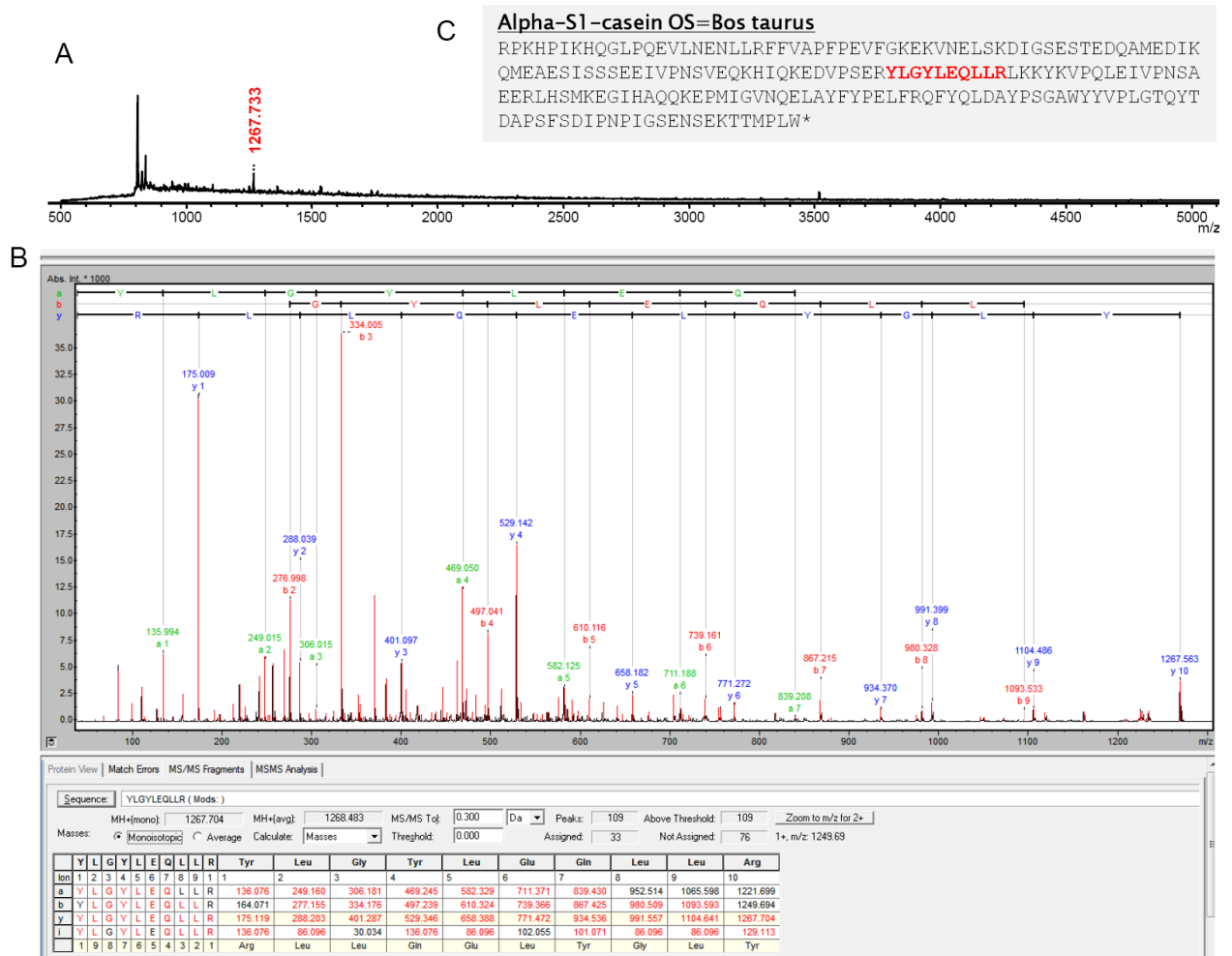


Figura 3. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la α -caseína con tripsina y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de α -caseína con tripsina. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 1267,733 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

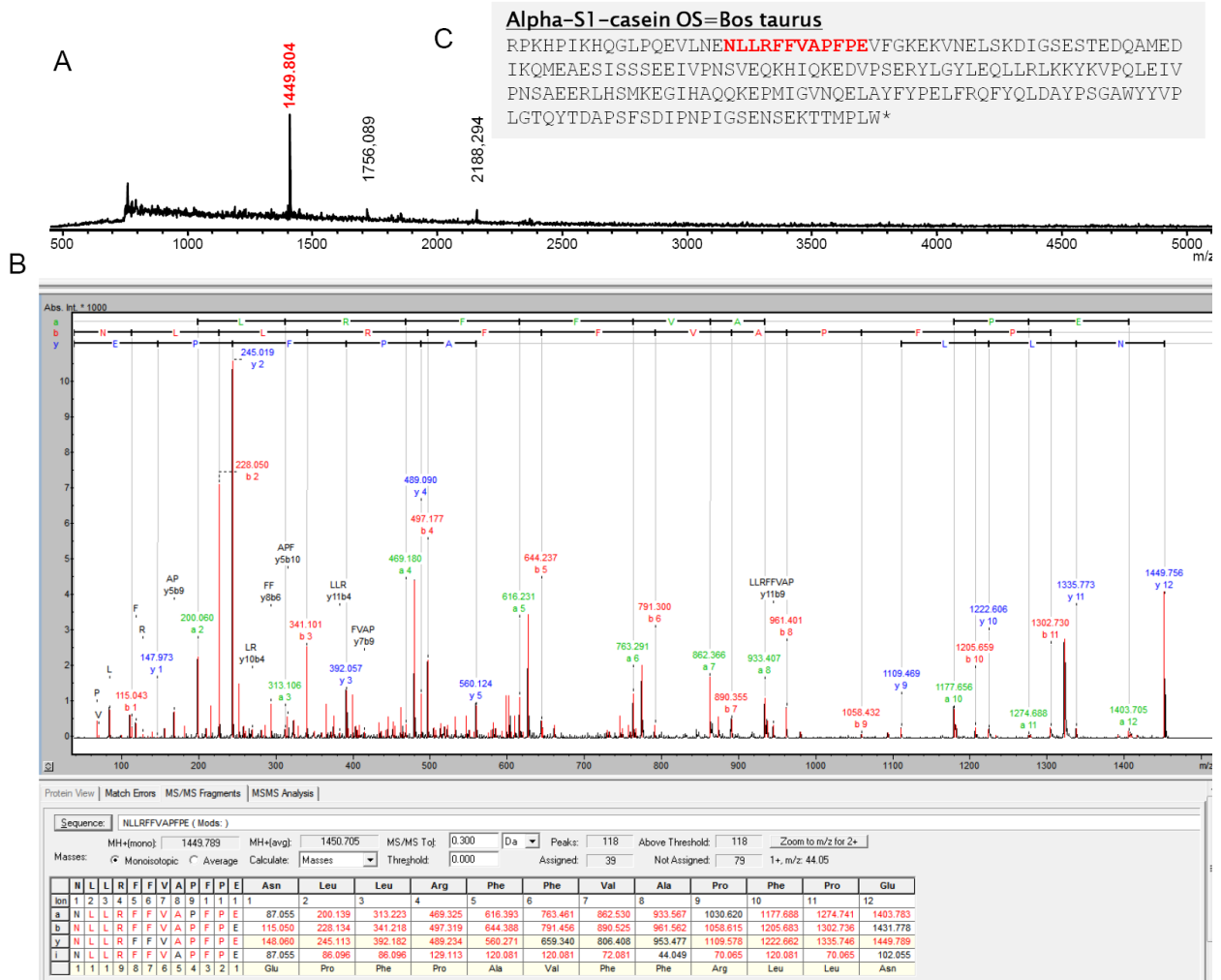


Figura 4. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la α -caseína con GluC y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de α -caseína con GluC. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 1449,804 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

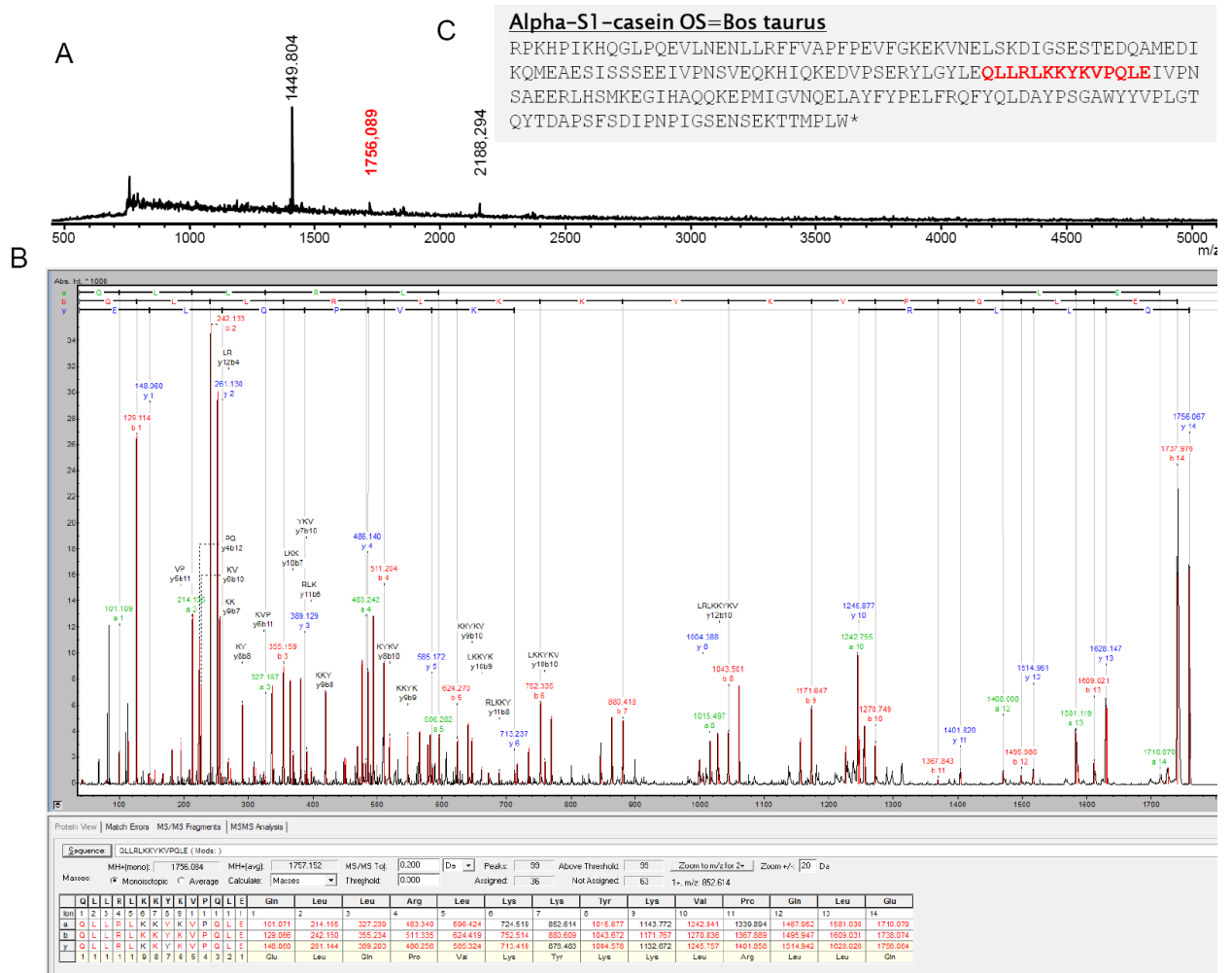


Figura 5. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la α -caseína con GluC y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de α -caseína con GluC. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 1756,089 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

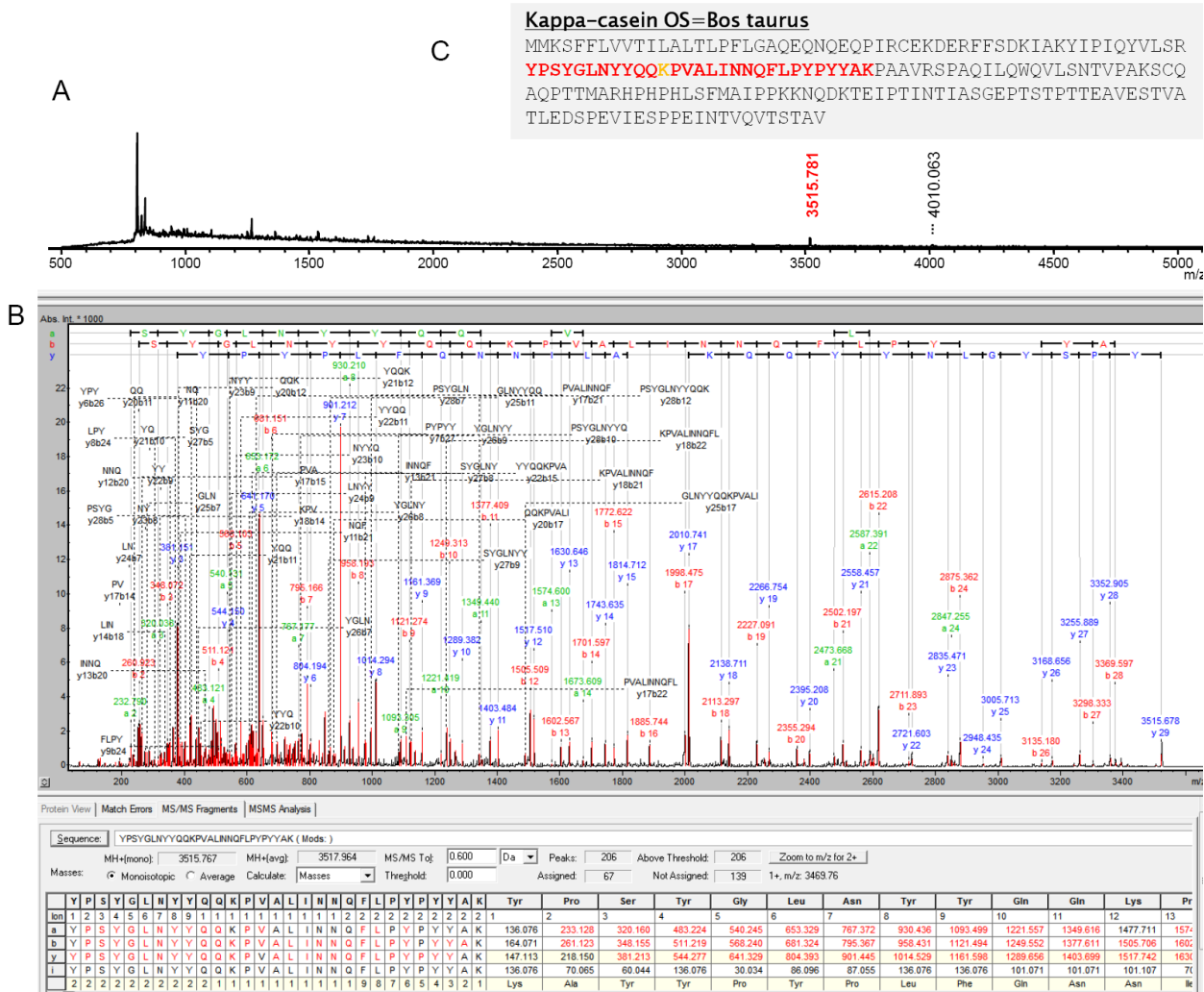


Figura 6. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la κ -caseína con tripsina y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de κ -caseína con tripsina. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 3515,781 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

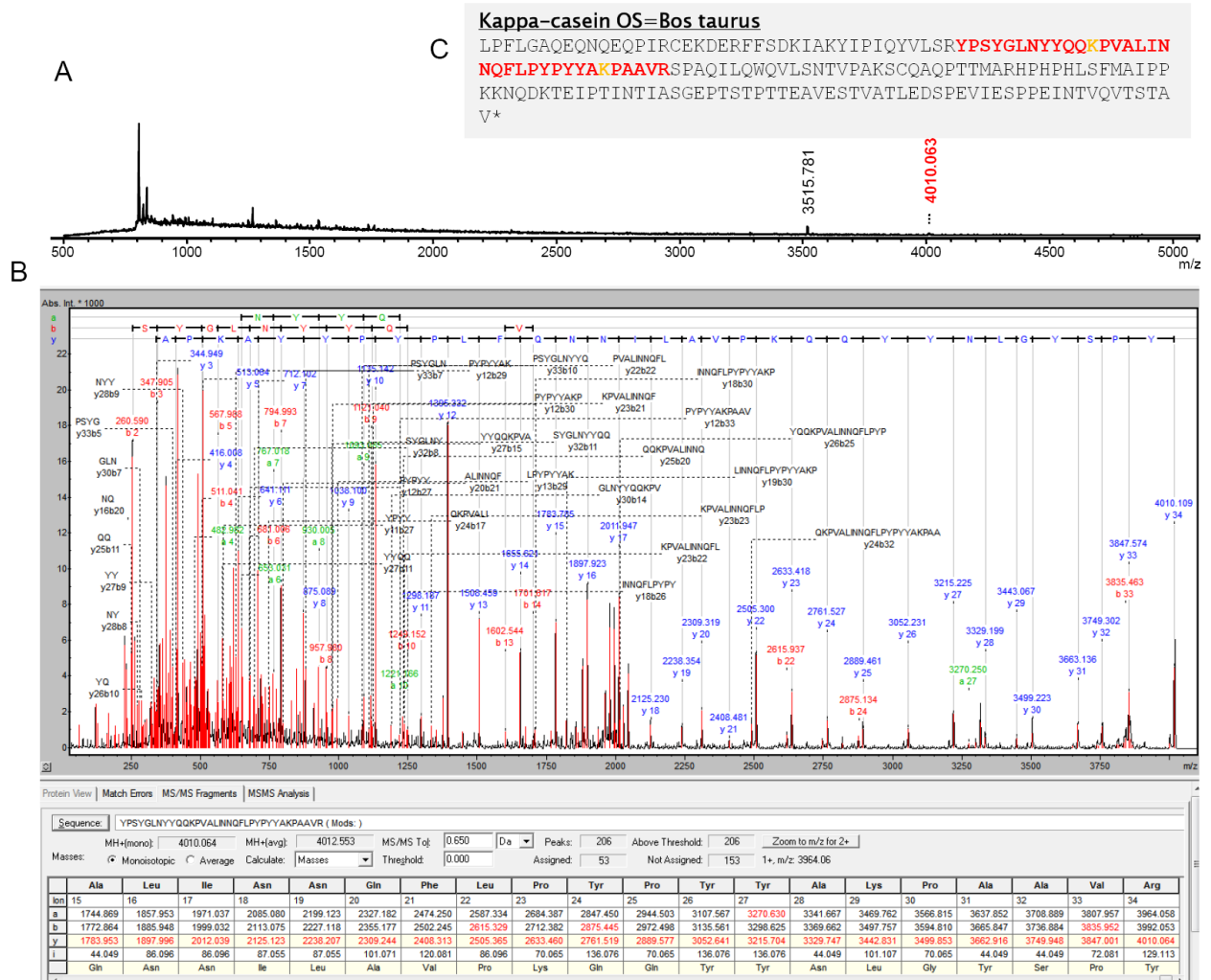


Figura 7. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la k-caseína con tripsina y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de κ -caseína con tripsina. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 4010,063 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

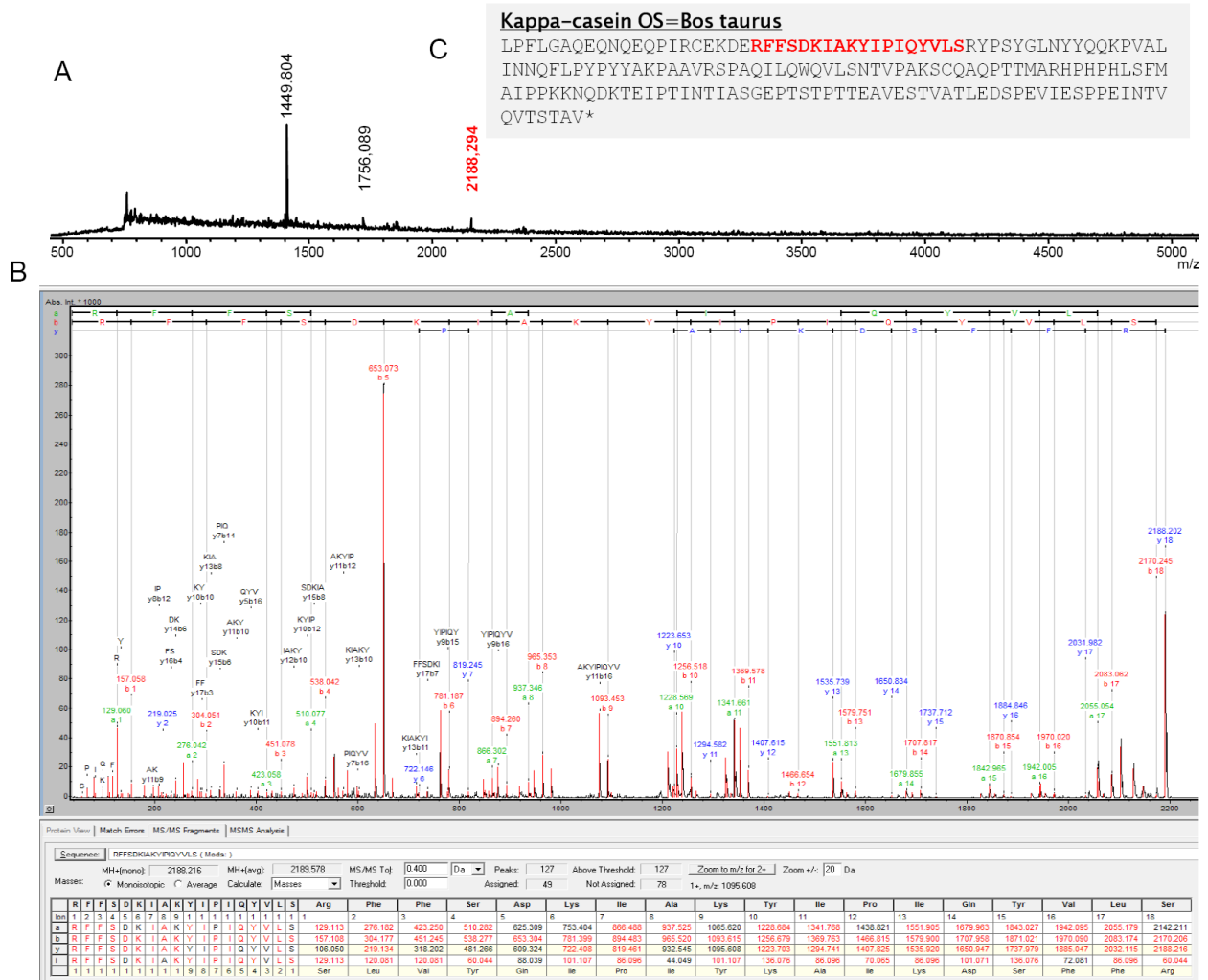


Figura 8. Espectros de masas del péptido producido por la digestión de la k-caseína con GluC y recuperado por inmunocaptura. A: EM MALDI-TOF del eluido post inmunocaptura de mAb1D5 del digerido de k-caseína con GluC. B: EM MALDI-TOF correspondiente al péptido de 2188,294 Da, identificación por huella peptídica de su secuencia. C: Secuencia aminoacídica marcada en rojo correspondiente al péptido capturado.

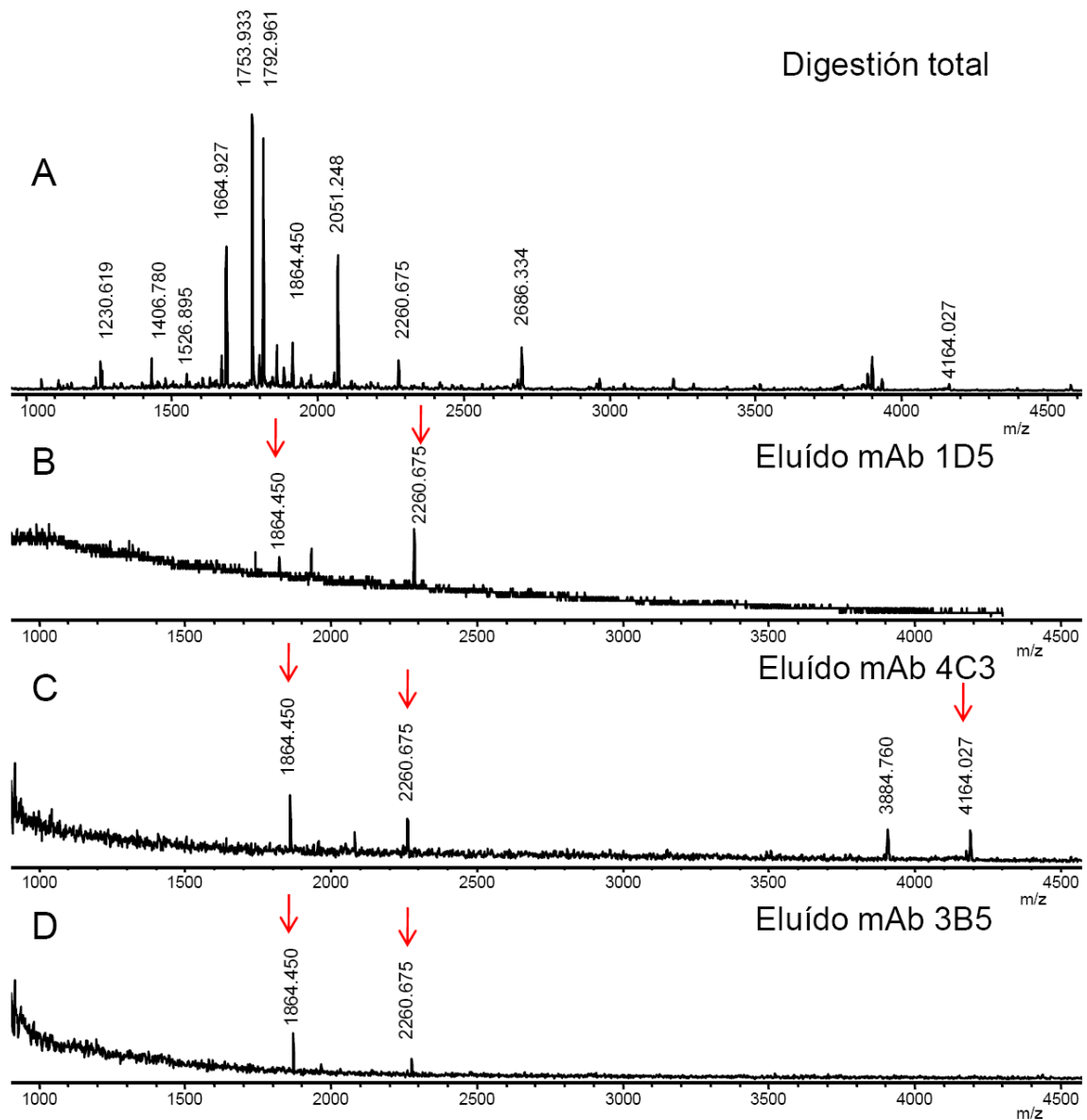


Figura 9. Espectros de masas correspondientes al mapeo de Gly m 5.0101 con los mAb-CB. A: EM MALDI-TOF de la digestión total de la proteína con GluC (huella peptídica). **B:** EM MALDI-TOF correspondiente al eluído de Gly m 5.0101 digerida con GluC post inmunocaptura con mAb1D5, se recuperaron los péptidos de masas 2260,675 Da y 1864,450 Da (flechas rojas). **C:** EM MALDI-TOF correspondiente al eluído de Gly m 5.0101 digerida con GluC post inmunocaptura con mAb4C3, se recuperaron los péptidos de masas 2260,675 Da, 1864,450 Da y 4164,027 Da (flechas rojas). **D:** EM MALDI-TOF correspondiente al eluído de Gly m 5.0101 digerida con GluC post inmunocaptura con mAb3B5, se recuperaron los péptidos de masas 2260,675 Da y 1864,450 Da (flechas rojas).

Tabla 1. *Resumen de los péptidos mapeados a partir de α -caseína y κ -caseína mediante inmunocaptura.*

Tripsina		
	M+1/Da	Secuencia
Alfa	1267,6	YLGYLEQLLR
Kappa	3515,8	YPSYGLNYYQQKPVALINNQLFPYPYYAK
	4010,1	YPSYGLNYYQQKPVALINNQLFPYPYYAKPAAVR
Glu-C		
	M+1/Da	Secuencia
Alfa	1449,8	NLLRFFVAPFPE
	1756,1	QLLRLKKYKVPQLE
Kappa	2188,3	RFFSDKIAKYIPIQYVLS

Tabla 2. *Resumen de los péptidos mapeados a partir de α S1-caseína y κ -caseína mediante dot blots.*

Tripsina			
	Muestra	M+1/Da	Secuencia
Alfa	Kappa vs TRP HPLC Tubos 27 – 35 min contaminacion	1267,6	YLGYLEQLLR
Kappa	Kappa vs TRP HPLC Tubos 33 – 34 min	3515,8	YPSYGLNYYQQKPVALINNQLFPYPYYAK
	Kappa vs TRP HPLC Tubo 33 min	4010,1	YPSYGLNYYQQKPVALINNQLFPYPYYAKPAAVR
Glu-C			
	Muestra	M+1/Da	Secuencia
Alfa	Alfa vs GluC HPLC Tubo 15 – 21 min	2120,2	RPKHPIKHQGLPQEVLE
	Alfa vs GluC HPLC Tubo 22 min	1449,8	NLLRFFVAPFPE
	Alfa vs GluC HPLC Tubo 21 min	1756,1	QLLRLKKYKVPQLE
Beta	Beta vs GluC HPLC Tubo 25 min	2794,6	MPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV
Kappa	Kappa vs GluC HPLC Tubo 21 min	2188,3	RFFSDKIAKYIPIQYVLS

Tabla 3. Alineamientos entre los péptidos de caseínas bovinas descritos como epítopes en la base de datos IEDB y diferentes proteínas de soja.

Nro	Secuencia	Proteína
1	AMEDIKQMEA	αS1-caseína bovina precursor
2	AQQKEPMIGV	
3	AWYYVPLGTQ	
4	AYFYPELFRQ	
5	AYFYPELFRQFYQLDAYP	
6	DAPSFSDIPN	
7	DAYPSGAWYY	
8	DIGSESTEDQ	
9	DIPNPIGSEN	
10	DIPNPIGSENSEKTTMPLW	
11	EKVNELSKDI	
12	ELAYFYPELF	
13	ELSKDIGSES	
14	ENSEKTTMPL	
15	GSENSEKTTM	
16	GSESTEDQAM	
17	GVNQELAYFY	
18	GYLEQLLRK	
19	GYLEQLLRKKYKVPQ	
20	HSMKEGIHAQ	
21	HSMKEGIHAQQKEPMIGVNQ	
22	IGVNQELAYFYPELFRQFYQ	
23	IHAQQKEPMI	
24	IKQMEAESIS	
25	IQKEDVPSEK	
26	ISSSEEIVPN	
27	IVPNSAEERL	
28	IVPNSVEQKH	
29	KEDVPSERYL	
30	KEDVPSERYLGYLEQLLRK	
31	KEGIHAQQKEPM	
32	KHIQEDVPS	
33	KHPIKHQGLP	
34	KHQGLPQEVN	
35	LPQEVNENL	
36	LRFFVAPFPE	
37	LRLKKYKVPQ	
38	MIGVNQELAY	
39	NENLLRFFVA	
40	NENLLRFFVAPFPEVFGKEK	
41	NLLRFFVAPF	
42	PNPIGSENSE	
43	PNSAEERLHS	

Nro	Secuencia	Proteína
44	PNSVEQKHIQ	α 1-caseína bovina precursor
45	SEKTTMPLW	
46	SESTEDQAMEDIKQMEAE	
47	SESTEDQAMEDIKQMEAESI	
48	SGAWYYVPLG	
49	SKDIGSESTE	
50	TQYTDAPSF	
51	VEQKHIQKEDVPSERYLGYL	
52	VFGKEKVNEL	
53	VFGKEKVNELSKDIGSESTE	
54	FPEVFGKEKVNELSKDIGSESTE	
55	PNSVEQKHIQKEDVPSERYL	
56	ENLCSTFCKE	α 2-caseína bovina precursor
57	EEVKITVDDKHYQKALNEIN	
58	EKNRLNFLKKISQRYQK FALPQYLKT	
59	KNTMEHVSSEESIISQETY	
60	KTVYQHQAAMKPKWIQPKTKVIPYVRYL	
61	LNPWDQVKNRNPITPTLNR	
62	SIISQETYKQEKMAINPSK	
63	TLNREQLSTSEENSKKTVDM	
64	ESQSLTLTDVENLHLPLPLL	β -caseína bovina precursor
65	FAQTQSLVYFPGPIPNSLPQNI	
66	RINKKIEKFQSEEQQTDELQDKIH	
67	TVMFPPQSVLSLSQSKVLPV	
68	AKYIPIQYVLSRYP	κ -caseína bovina precursor
69	CEKDERFFSDKIAK	
70	IESPPEINTVQVTS	
71	KKNQDKTEIPTINT	
72	RFFSDKIAKYIPIQYVLSRY	
73	RYPYGLNYYQKPVALLIN	

```

>P1;1pci
1pci:12:A:304:A::0.00:0.00

-----LTSTERLIQLFNSWMLNHNKIFYENVDEKLYRFEIFKDNLNLYIDETNKKNN---SYWLGLNEFADLSNDE
FNEKYVGSGLIDATIEQS---YDEEFINEDIVNLPENVDWRKKGAVTPVRHQSGSCGWAFSAVATVEGINKIRTGKLVLESEQ
ELVDCERRSHGCKGGYPPYALEYVAKNGIH-LRSKYPIYKAKQGTCTRAKQVGGPI-----VKTSQVGRVQPNNEGNNLNAIAK
QPVSVVVESKGRPFQLYKGGIFEGPCG-TKVDGAVTAVGYGKSGGKGYILIKNSWGTAWGEGYIRIKRAPGNSPGVCGLYKS
SYYPTKN-----*

>P2; P34
Gly m Bd 30K :1::360::::0.00:0.00

ISTHRSILDLDLTKFTTQKQVSSLFQLWKSEHGRVYHNHEEEAKRLEIFKNNLNLYIRDMNANRKSPHSHRLGGLNKFADITPQE
FSKKYLQAPKDVSQQIKMANKMKKKEQYSCDHPPASWDWRKKGVITQVKYQGGCGSGWAFSATGAIEAAHAIAATGDLVSLSEQ
ELVDCVEESEGCYNGWHYQSFVWLEHGGIATDDDYPYRAKEGRCKANKIQDKVTIDGYETLIMSDESTESETEQAFLSAILE
QPISVSIDAKDFHLYTGGIYDGENCTSPYGINHFVLLVGYGSADGVVYIWIQNTGNLLGVCGMNYF
ASYPTKEESETLV SARVKGHRRVDHSPL*

```

Figura 10. *Alineamiento profile-profile (1PCI y P34) con el servidor FFA503, subrayamos los aminoácidos no modelados en la secuencia de P34.*

BIBLIOGRAFÍA

- Adel-Patient, K., Wavrin, S., Bernard, H., Meziti, N., Ah-Leung, S., and Wal, J.-M. (2011). Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine β -lactoglobulin. *Allergy* *66*, 1312–1321.
- Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J., Rieu, D., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., et al. (2006). Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *42*, 352–361.
- Agren, L.C., Ekman, L., Löwenadler, B., and Lycke, N.Y. (1997). Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J. Immunol.* *158*, 3936–3946.
- Ahn, K.-M., Han, Y.-S., Nam, S.-Y., Park, H.-Y., Shin, M.-Y., and Lee, S.-I. (2003). Prevalence of soy protein hypersensitivity in cow's milk protein-sensitive children in Korea. *J. Korean Med. Sci.* *18*, 473–477.
- Akdis, M., and Akdis, C.A. (2007). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 780–791.
- Akdis, M., and Akdis, C.A. (2009). Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 645–660.
- Akdis, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2006). T regulatory cells in allergy. *Chem Immunol Allergy* *97*, 159–173.
- Alexander, C., Ying, S., B Kay, A., and Larché, M. (2005). Fel d 1-derived T cell peptide therapy induces recruitment of CD4⁺ CD25⁺; CD4⁺ interferon- γ ⁺ T helper type 1 cells to sites of allergen-induced late-phase skin reactions in cat-allergic subjects. *Clin. Exp. Allergy* *35*, 52–58.
- Asakawa, N., Sakiyama, N., Teshima, R., and Mitaku, S. (2010). Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. *J. Biochem.* *147*, 127–133.
- Awazuhara, H., Kawai, H., and Maruchi, N. (1997). Major allergens in soybean and clinical significance of IgG4 antibodies investigated by IgE- and IgG4-immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients. *Clin. Exp. Allergy* *27*, 325–332.
- Bach, J.-F. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine* *347*, 911–920.
- Ball, T., Linhart, B., Sonneck, K., Blatt, K., Herrmann, H., Valent, P., Stoecklinger, A., Lupinek, C., Thalhamer, J., Fedorov, A.A., et al. (2009). Reducing allergenicity by altering allergen fold: a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy* *64*, 569–580.
- Ballmer-Weber, B.K., Holzhauser, T., Scibilia, J., Mittag, D., Zisa, G., Ortolani, C., Oesterballe, M., Poulsen, L.K., Vieths, S., and Bindslev-Jensen, C. (2007). Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1489–1496.

- Bannon, G.A., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C.M., Helm, R., Stanley, J.S., King, N., Rabjohn, P., Sampson, H.A., and Burks, A.W. (2001). Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *124*, 70–72.
- Bauer, L., Bohle, B., Jahn-Schmid, B., Wiedermann, U., Daser, A., Renz, H., Kraft, D., and Ebner, C. (1997). Modulation of the allergic immune response in BALB/c mice by subcutaneous injection of high doses of the dominant T cell epitope from the major birch pollen allergen Bet v 1. *Clin. Exp. Immunol.* *107*, 536–541.
- Beardslee, T.A., Zeece, M.G., Sarath, G., and Markwell, J.P. (2000). Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *123*, 299–307.
- Berin, M.C., and Mayer, L. (2009). Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol* *2*, 24–32.
- Berkner, H., Neudecker, P., Mittag, D., Ballmer-Weber, B.K., Schweimer, K., Vieths, S., and Rösch, P. (2009). Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins. *Biosci. Rep.* *29*, 183–192.
- Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., et al. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *58*, 899–907.
- Bernhisel-Broadbent, J., and Sampson, H.A. (1989). Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *83*, 435–440.
- Beyer, K., Castro, R., Birnbaum, A., Benkov, K., Pittman, N., and Sampson, H.A. (2002). Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol.* *109*, 707–713.
- Bian, H., and Hammer, J. (2004). Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. *Methods* *34*, 468–475.
- Bindslev-Jensen, C., Sten, E., Earl, L.K., Crevel, R.W.R., Bindslev-Jensen, U., Hansen, T.K., Stahl Skov, P., and Poulsen, L.K. (2003). Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. *Food Chem. Toxicol.* *41*, 81–87.
- Bock, S.A., and Atkins, F.M. (1989). The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *83*, 900–904.
- Boehm, F., Martin, M., Kesselring, R., Schiechl, G., Geissler, E.K., Schlitt, H.-J., and Fichtner-Feigl, S. (2012). Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroenterol* *12*, 97.

- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* *31*, 513–525.
- Breiteneder, H., and Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *106*, 27–36.
- Breiteneder, H., and Mills, E.N.C. (2005). Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 14–23; quiz 24.
- Briner, T.J., Kuo, M.C., Keating, K.M., Rogers, B.L., and Greenstein, J.L. (1993). Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 7608–7612.
- Broide, D.H. (2009). Immunomodulation of allergic disease. *Annu. Rev. Med.* *60*, 279–291.
- Bruno, G., Giampietro, P.G., Del Guercio, M.J., Gallia, P., Giovannini, L., Lovati, C., Paolucci, P., Quaglio, L., Zoratto, E., and Businco, L. (1997). Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol* *8*, 190–193.
- Brusic, V., and Petrovsky, N. (2003). Bioinformatics for characterisation of allergens, allergenicity and allergic crossreactivity. *Trends Immunol.* *24*, 225–228.
- Burks, A.W., Cockrell, G., Connaughton, C., Guin, J., Allen, W., and Helm, R.M. (1994a). Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *105*, 143–149.
- Burks, A.W., Casteel, H.B., Fiedorek, S.C., Williams, L.W., and Pumphrey, C.L. (1994b). Prospective oral food challenge study of two soybean protein isolates in patients with possible milk or soy protein enterocolitis. *Pediatr Allergy Immunol* *5*, 40–45.
- Burks, A.W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M., and Bannon, G.A. (1997). Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.* *245*, 334–339.
- Busse, P.J., Järvinen, K.-M., Vila, L., Beyer, K., and Sampson, H.A. (2002). Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *129*, 93–96.
- Campbell, D.E., Hill, D.J., and Kemp, A.S. (1998). Enhanced IL-4 but normal interferon-gamma production in children with isolated IgE mediated food hypersensitivity. *Pediatric Allergy and Immunology* *9*, 68–72.
- Cantani, A., and Lucenti, P. (1997). Natural history of soy allergy and/or intolerance in children, and clinical use of soy-protein formulas. *Pediatr Allergy Immunol* *8*, 59–74.
- Cardoso, C.R., Provinciatto, P.R., Godoi, D.F., Vieira, T.S., Ferreira, B.R., Teixeira, G., Rossi, M.A., Cunha, F.Q., and Silva, J.S. (2008). B cells are involved in the modulation of pathogenic gut immune response in food-allergic enteropathy. *Clin. Exp. Immunol.* *154*, 153–161.

Carter, J.M., and Loomis-Price, L. (2004). B cell epitope mapping using synthetic peptides. *Curr Protoc Immunol Chapter 9*, Unit 9.4.

Cerecedo, I., Zamora, J., Shreffler, W.G., Lin, J., Bardina, L., Dieguez, M.C., Wang, J., Muriel, A., De la Hoz, B., and Sampson, H.A. (2008). Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 589-594.

Ceska, M. (1981). Radioimmunoassay of IgE using paper disks. *Meth. Enzymol.* *73*, 646-656.

Chatchatee, P., Järvinen, K.M., Bardina, L., Beyer, K., and Sampson, H.A. (2001a). Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 379-383.

Chatchatee, P., Järvinen, K.M., Bardina, L., Vila, L., Beyer, K., and Sampson, H.A. (2001b). Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* *31*, 1256-1262.

Cehade, M., and Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 3-12; quiz 13.

Chothia, C. (1976). The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* *105*, 1-12.

Cinader, B. (1984). Chairman's report to the WHO-IUIS Nomenclature Committee, Kyoto, 25 August 1983. *Immunology* *52*, 585-587.

Cocco, R.R., Järvinen, K.-M., Sampson, H.A., and Beyer, K. (2003). Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 433-437.

Cocco, R.R., Järvinen, K.-M., Han, N., Beyer, K., and Sampson, H.A. (2007). Mutational analysis of immunoglobulin E-binding epitopes of beta-casein and beta-lactoglobulin showed a heterogeneous pattern of critical amino acids between individual patients and pooled sera. *Clin. Exp. Allergy* *37*, 831-838.

Codina, R., Lockey, R.F., Fernández-Caldas, E., and Rama, R. (1997). Purification and characterization of a soybean hull allergen responsible for the Barcelona asthma outbreaks. II. Purification and sequencing of the Gly m 2 allergen. *Clin. Exp. Allergy* *27*, 424-430.

Codina, R., Arduzzo, L., Lockey, R.F., Crisci, C., and Bertoya, N. (2000). Sensitization to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 570-576.

Codina, R., Arduzzo, L., Lockey, R.F., Crisci, C.D., Jaén, C., and Bertoya, N.H. (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. *Clin. Exp. Allergy* *32*, 1059-1063.

- Comeau, M.R., and Ziegler, S.F. (2010). The influence of TSLP on the allergic response. *Mucosal Immunol* *3*, 138–147.
- Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 435–446.
- Curciarello, R., Lareu, J.F., Fossati, C.A., Docena, G.H., and Petruccelli, S. (2008). Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 1559–1565.
- Dearman, R.J., and Kimber, I. (2009). Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin. Exp. Allergy* *39*, 458–468.
- Docena, G., Rozenfeld, P., Fernández, R., and Fossati, C.A. (2002). Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* *57*, 83–91.
- Docena, G.H., Fernandez, R., Chirido, F.G., and Fossati, C.A. (1996). Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* *51*, 412–416.
- Dubois, P., Degraeve, E., and Vandenas, O. (1998). Asthma and airway hyperresponsiveness among Belgian conscripts, 1978–91. *Thorax* *53*, 101–105.
- Dunwell, J.M., Khuri, S., and Gane, P.J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *64*, 153–179.
- Dunwell, J.M., Purvis, A., and Khuri, S. (2004). Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* *65*, 7–17.
- Dunwell, J.M., Gibbings, J.G., Mahmood, T., and Saqlan Naqvi, S.M. (2008). Germin and germin-like proteins: Evolution, structure, and function. *Critical Reviews in Plant Sciences* *27*, 342–375.
- Durham, S.R., Varney, V.A., Gaga, M., Jacobson, M.R., Varga, E.M., Frew, A.J., and Kay, A.B. (1999). Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin. Exp. Allergy* *29*, 1490–1496.
- Ehn, B.-M., Ekstrand, B., Bengtsson, U., and Ahlstedt, S. (2004). Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 1398–1403.
- Eigenmann, P.A., Huang, S.-K., and Sampson, H.A. (1996). Characterization of ovomucoid-specific T-cell lines and clones from egg-allergic subjects. *Pediatric Allergy and Immunology* *7*, 12–21.
- Elsayed, S., Hill, D.J., and Do, T.V. (2004a). Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptides. *Scand. J. Immunol.* *60*, 486–493.

Elsayed, S., Eriksen, J., Øysaed, L.K., Idsøe, R., and Hill, D.J. (2004b). T cell recognition pattern of bovine milk alphaS1-casein and its peptides. *Mol. Immunol.* *41*, 1225–1234.

Enomoto, A., Shon, D.H., Aoki, Y., Yamauchi, K., and Kaminogawa, S. (1990). Antibodies raised against peptide fragments of bovine alpha s1-casein cross-react with the intact protein only when the peptides contain both B and T cell determinants. *Mol. Immunol.* *27*, 581–586.

Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., Basagaña, M., Tella, R., Castelló, J.V., Alonso, R., De Mateo, J.A., Cerdá-Trias, T., et al. (2005). Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 1073–1079.

Enrique, E., Malek, T., Pineda, F., Palacios, R., Bartra, J., Tella, R., Basagaña, M., Alonso, R., and Cisteró-Bahíma, A. (2008). Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a follow-up study. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *100*, 283–284.

Farrokhyar, F., Swarbrick, E.T., and Irvine, E.J. (2001). A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* *36*, 2–15.

Fernández-Rivas, M., Garrido Fernández, S., Nadal, J.A., Díaz de Durana, M.D.A., García, B.E., González-Mancebo, E., Martín, S., Barber, D., Rico, P., and Tabar, A.I. (2009). Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* *64*, 876–883.

Ferreira, C.T., and Seidman, E. (2007). Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. *J Pediatr (Rio J)* *83*, 7–20.

Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., et al. (1996). Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J. Exp. Med.* *183*, 599–609.

Ferreira, F., Hirthenlehner, K., Briza, P., Breiteneder, H., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., and Ebner, C. (1997). Isoforms of atopic allergens with reduced allergenicity but conserved T cell antigenicity: possible use for specific immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *113*, 125–127.

Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., and Mari, A. (2004). Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* *59*, 243–267.

Finkelman, F.D., Rothenberg, M.E., Brandt, E.B., Morris, S.C., and Strait, R.T. (2005). Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 449–457; quiz 458.

Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H.Y., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P.R., Szabo, S.J., et al. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* *295*, 336–338.

- Fitzsimmons, C.M., and Dunne, D.W. (2009). Survival of the fittest: allergology or parasitology? *Trends Parasitol.* *25*, 447–451.
- Flinterman, A.E., Pasmans, S.G.M.A., Den Hartog Jager, C.F., Hoekstra, M.O., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knol, E.F., and Van Hoffen, E. (2010). T cell responses to major peanut allergens in children with and without peanut allergy. *Clinical and Experimental Allergy* *40*, 590–597.
- Fraser, H. (2011). *The Peanut Allergy Epidemic: What's Causing It and How to Stop It* (Skyhorse Publishing).
- Fu, C.J., Jez, J.M., Kerley, M.S., Allee, G.L., and Krishnan, H.B. (2007). Identification, characterization, epitope mapping, and three-dimensional modeling of the alpha-subunit of beta-conglycinin of soybean, a potential allergen for young pigs. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 4014–4020.
- Galfrè, G., and Milstein, C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzymol.* *73*, 3–46.
- Ganeshan, K., Neilsen, C.V., Hadsaitong, A., Schleimer, R.P., Luo, X., and Bryce, P.J. (2009). Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 231–238.e4.
- Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H., and Coombs, R.R.A. (1963). *Clinical Aspects of Immunology*.
- Gijzen, M., González, R., Barber, D., and Polo, F. (2003). Levels of airborne Gly m 1 in regions of soybean cultivation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 803–805.
- Gomez de Agüero, M., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., and Dubois, B. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* *122*, 1700–1711.
- González, R., Varela, J., Carreira, J., and Polo, F. (1995). Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* *346*, 48–49.
- González, R., Duffort, O., Calabozo, B., Barber, D., Carreira, J., and Polo, F. (2000). Monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1. Its application to assess environmental exposure to soybean dust. *Allergy* *55*, 59–64.
- Green, T.D., LaBelle, V.S., Steele, P.H., Kim, E.H., Lee, L.A., Mankad, V.S., Williams, L.W., Anstrom, K.J., and Burks, A.W. (2007). Clinical characteristics of peanut-allergic children: recent changes. *Pediatrics* *120*, 1304–1310.
- Gu, X., Beardslee, T., Zeece, M., Sarath, G., and Markwell, J. (2001). Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *126*, 218–225.

- Han, N., Järvinen, K.M., Cocco, R.R., Busse, P.J., Sampson, H.A., and Beyer, K. (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*, 198–204.
- Hartl, A., Kiesslich, J., Weiss, R., Bernhaupt, A., Mostböck, S., Scheiblhofer, S., Flöckner, H., Sippl, M., Ebner, C., Ferreira, F., et al. (1999). Isoforms of the major allergen of birch pollen induce different immune responses after genetic immunization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *120*, 17–29.
- Haste Andersen, P., Nielsen, M., and Lund, O. (2006). Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci.* *15*, 2558–2567.
- Helm, R.M., and Burks, A.W. (2002). Animal models of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *2*, 541–546.
- Helm, R., Cockrell, G., Herman, E., Burks, A., Sampson, H., and Bannon, G. (1998). Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *117*, 29–37.
- Helm, R.M., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C.M., Herman, E., Sampson, H.A., Bannon, G.A., and Burks, A.W. (2000a). Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 378–384.
- Helm, R.M., Cockrell, G., Connaughton, C., Sampson, H.A., Bannon, G.A., Beilinson, V., Livingstone, D., Nielsen, N.C., and Burks, A.W. (2000b). A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *123*, 205–212.
- Herman, E. (2005). Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. *Crop Science* *45*, 462–467.
- Herman, E.M., Helm, R.M., Jung, R., and Kinney, A.J. (2003). Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* *132*, 36–43.
- Hiemori, M., Bando, N., Ogawa, T., Shimada, H., Tsuji, H., Yamanishi, R., and Terao, J. (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*, 238–245.
- Hiemori, M., Ito, H., Kimoto, M., Yamashita, H., Nishizawa, K., Maruyama, N., Utsumi, S., and Tsuji, H. (2004). Identification of the 23-kDa peptide derived from the precursor of Gly m Bd 28K, a major soybean allergen, as a new allergen. *Biochim. Biophys. Acta* *1675*, 174–183.
- Hill, D.J., Hosking, C.S., De Benedictis, F.M., Oranje, A.P., Diepgen, T.L., and Bauchau, V. (2008). Confirmation of the association between high levels of immunoglobulin E food sensitization and eczema in infancy: an international study. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 161–168.
- Hobbs, A.A., and Rosen, J.M. (1982). Sequence of rat alpha- and gamma-casein mRNAs: evolutionary comparison of the calcium-dependent rat casein multigene family. *Nucleic Acids Res.* *10*, 8079–8098.

- Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R., and Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1088–1097.
- Holt, P.G., Macaubas, C., Stumbles, P.A., and Sly, P.D. (1999). The role of allergy in the development of asthma. *Nature* *402*, B12–17.
- Holzhauser, T., Wackermann, O., Ballmer-Weber, B.K., Bindslev-Jensen, C., Scibilia, J., Perono-Garoffo, L., Utsumi, S., Poulsen, L.K., and Vieths, S. (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. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 452–458.
- Hosoyama, H., Obata, A., Bando, N., Tsuji, H., and Ogawa, T. (1996). Epitope analysis of soybean major allergen Gly m Bd 30K recognized by the mouse monoclonal antibody using overlapping peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *60*, 1181–1182.
- Høst, A., and Halcken, S. (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*, 587–596.
- Hoyne, G.F., O’Hehir, R.E., Wraith, D.C., Thomas, W.R., and Lamb, J.R. (1993). Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J. Exp. Med.* *178*, 1783–1788.
- Ivanciuc, O., Schein, C.H., and Braun, W. (2003). SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res.* *31*, 359–362.
- Ivanciuc, O., Midoro-Horiuti, T., Schein, C.H., Xie, L., Hillman, G.R., Goldblum, R.M., and Braun, W. (2009a). The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. *Mol. Immunol.* *46*, 873–883.
- Ivanciuc, O., Schein, C.H., Garcia, T., Oezguen, N., Negi, S.S., and Braun, W. (2009b). Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *54*, S11–19.
- James, L.C., and Tawfik, D.S. (2003). The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness. *Protein Sci.* *12*, 2183–2193.
- James, L.C., Roversi, P., and Tawfik, D.S. (2003). Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* *299*, 1362–1367.
- Järvinen, K.M., and Chatchatee, P. (2009). Mammalian milk allergy: clinical suspicion, cross-reactivities and diagnosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *9*, 251–258.
- Järvinen, K.M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., and Sampson, H.A. (2001). IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow’s milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *126*, 111–118.

- Järvinen, K.-M., Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P.J., and Sampson, H.A. (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *110*, 293-297.
- Jenkins, J.A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P.R., Breiteneder, H., and Mills, E.N.C. (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 163-170.
- Ji, C., Boyd, C., Slaymaker, D., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Midland, S.L., Sims, J.J., Herman, E., and Keen, N. (1998). Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 3306-3311.
- Joussemet, M., Depaquit, J., Nicand, E., Mac Nab, C., Meynard, J.B., Teyssou, R., Fabre, G., and Buisson, Y. (1999). [Fall in the seroprevalence of hepatitis A in French youth]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *23*, 447-445.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* *22*, 2577-2637.
- Kalinski, A., Weisemann, J.M., Matthews, B.F., and Herman, E.M. (1990). Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain family. *J. Biol. Chem.* *265*, 13843-13848.
- Kattan, J.D., Cocco, R.R., and Järvinen, K.M. (2011). Milk and soy allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* *58*, 407-426, x.
- Katz, Y., Goldberg, M.R., Zadik-Mnuhin, G., Leshno, M., and Heyman, E. (2008). Cross-sensitization between milk proteins: reactivity to a "kosher" epitope? *Isr. Med. Assoc. J.* *10*, 85-88.
- Kawasaki, K., and Weiss, K.M. (2003). Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4060-4065.
- Kawasaki, K., Buchanan, A.V., and Weiss, K.M. (2007). Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization. *Cells Tissues Organs (Print)* *186*, 7-24.
- Kay, A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* *344*, 30-37.
- King, T.P., Jim, S.Y., Monsalve, R.I., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M., and Spangfort, M.D. (2001). Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s. *J. Immunol.* *166*, 6057-6065.
- Kleine-Tebbe, J., Vogel, L., Crowell, D.N., Hausteiner, U.-F., and Vieths, S. (2002). Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.* *110*, 797-804.
- Klemola, T., Vanto, T., Juntunen-Backman, K., Kalimo, K., Korpela, R., and Varjonen, E. (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. *J. Pediatr.* *140*, 219–224.

Klemola, T., Kalimo, K., Poussa, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Valovirta, E., and Vanto, T. (2005). Feeding a soy formula to children with cow's milk allergy: the development of immunoglobulin E-mediated allergy to soy and peanuts. *Pediatr Allergy Immunol* *16*, 641–646.

Koehler, C., Carlier, L., Veggi, D., Balducci, E., Di Marcello, F., Ferrer-Navarro, M., Pizza, M., Daura, X., Soriani, M., Boelens, R., et al. (2011). Structural and biochemical characterization of NarE, an iron-containing ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* *286*, 14842–14851.

Krishnan, H.B., Kim, W.-S., Jang, S., and Kerley, M.S. (2009). All three subunits of soybean beta-conglycinin are potential food allergens. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 938–943.

Krogulska, A., Borowiec, M., Polakowska, E., Dynowski, J., Młynarski, W., and Wasowska-Królikowska, K. (2011). FOXP3, IL-10, and TGF- β genes expression in children with IgE-dependent food allergy. *J. Clin. Immunol.* *37*, 205–215.

L'Hocine, L., and Boye, J.I. (2007). Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* *47*, 127–143.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 243–270.

Larché, M. (2006). Peptide immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* *26*, 321–332, viii.

De Leon, M.P., Drew, A.C., Glaspole, I.N., Suphioglu, C., O'Hehir, R.E., and Rolland, J.M. (2007). IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens. *Mol. Immunol.* *44*, 463–471.

Leung, D.Y.M., Sampson, H.A., Yunginger, J.W., Burks, A.W., Jr, Schneider, L.C., Wortel, C.H., Davis, F.M., Hyun, J.D., and Shanahan, W.R., Jr (2003). Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* *348*, 986–993.

Li, X.-M., Srivastava, K., Grishin, A., Huang, C.-K., Schofield, B., Burks, W., and Sampson, H.A. (2003). Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 159–167.

Lillehoj, H.S., Kim, C.H., Keeler, C.L., Jr, and Zhang, S. (2007). Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens. *Poult. Sci.* *86*, 1491–1500.

Lin, J., Bardina, L., Shreffler, W.G., Andrae, D.A., Ge, Y., Wang, J., Bruni, F.M., Fu, Z., Han, Y., and Sampson, H.A. (2009). Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *124*, 315–322, 322.e1–3.

- Linhart, B., and Valenta, R. (2005). Molecular design of allergy vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 646–655.
- Linhart, B., and Valenta, R. (2012). Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine* *30*, 4328–4335.
- López-Torrejón, G., Salcedo, G., Martín-Esteban, M., Díaz-Perales, A., Pascual, C.Y., and Sánchez-Monge, R. (2003). Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 1208–1215.
- Lu, X., DeFelippis, M.R., and Huang, L. (2009). Linear epitope mapping by native mass spectrometry. *Anal. Biochem.* *395*, 100–107.
- Magnolfi, C.F., Zani, G., Lacava, L., Patria, M.F., and Bardare, M. (1996). Soy allergy in atopic children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *77*, 197–201.
- Masoodi, T.A., and Shafi, G. (2010). Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinformation* *4*, 430–435.
- Matricardi, P.M., Bockelbrink, A., Beyer, K., Keil, T., Niggemann, B., Grüber, C., Wahn, U., and Lau, S. (2008). Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 493–500.
- Miles, S., Fordham, R., Mills, C., Valovirta, E., and Mugford, M. (2005). A framework for measuring costs to society of IgE-mediated food allergy. *Allergy* *60*, 996–1003.
- Mills, E.N., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P.S., Gunning, A.P., and Morris, V.J. (2002). Allergens of the cupin superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 925–929.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Becker, W.-M., Rihs, H.-P., Helbling, A., Wüthrich, B., and Ballmer-Weber, B.K. (2004). Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *113*, 148–154.
- Morafo, V., Srivastava, K., Huang, C.-K., Kleiner, G., Lee, S.-Y., Sampson, H.A., and Li, A.-M. (2003). Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 1122–1128.
- Morita, H., Kaneko, H., Ohnishi, H., Kato, Z., and Kondo, N. (2011). Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy* *66*, 985–986.
- Moroz, L.A., and Yang, W.H. (1980). Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *N. Engl. J. Med.* *302*, 1126–1128.
- Nakajima-Adachi, H., Hachimura, S., Ise, W., Honma, K., Nishiwaki, S., Hirota, M., Shimojo, N., Katsuki, T., Ametani, A., Kohno, Y., et al. (1998). Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine alpha(s)1-casein from the same patients allergic to cow's milk: existence of alpha(s)1-casein-specific B cells and T cells characteristic in cow's-milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *101*, 660–671.

- Nallamsetty, S., Austin, B.P., Penrose, K.J., and Waugh, D.S. (2005). Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* *14*, 2964–2971.
- Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Garoffo, L.P., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., and Conti, A. (2004). Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol Nutr Food Res* *48*, 363–369.
- Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A., and Leung, D. (1997). Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* *99*, 744–751.
- Nguyen, K.D., Vanichsarn, C., Fohner, A., and Nadeau, K.C. (2009). Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}/– regulatory T cells in human allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *123*, 933–939.e10.
- Nielsen, M., Justesen, S., Lund, O., Lundegaard, C., and Buus, S. (2010). NetMHCIIpan-2.0 – Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure. *Immunome Res* *6*, 9.
- Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K.A., Sicherer, S.H., Shreffler, W.G., Noone, S., Wanich, N., and Sampson, H.A. (2008). Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 342–347, 347.e1–2.
- O'Hehir, R.E., Busch, R., Rothbard, J.B., and Lamb, J.R. (1991). An in vitro model of peptide-mediated immunomodulation of the human T cell response to *Dermatophagoides* spp (house dust mite). *J. Allergy Clin. Immunol.* *87*, 1120–1127.
- Oezguen, N., Zhou, B., Negi, S.S., Ivanciuc, O., Schein, C.H., Labesse, G., and Braun, W. (2008). Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes. *Mol. Immunol.* *45*, 3740–3747.
- Oftedal, O.T. (2012). The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* *6*, 355–368.
- Ogawa, A., Samoto, M., and Takahashi, K. (2000). Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* *46*, 271–279.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Okajima, H., Nishikawa, K., and Sasaoka, K. (1991). Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* *37*, 555–565.
- Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu, Y.L., Hirano, H., and Nishikawa, K. (1993). Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *57*, 1030–1033.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K., and Kitamura, K. (1995). Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *59*, 831–833.

- Orsi, O., Fernández, A., Follett, F.R., Marchisone, S., Saieg, G., Busoni, V.B., Tabacco, O., and Toca, C. (2009). [Cow's milk protein allergy: proposed guidelines for the management of children with cow's milk protein allergy]. *Arch Argent Pediatr* 107, 459–467.
- Parvataneni, S., Gonipeta, B., Tempelman, R.J., and Gangur, V. (2009). Development of an adjuvant-free cashew nut allergy mouse model. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149, 299–304.
- Pène, J., Desroches, A., Paradis, L., Lebel, B., Farce, M., Nicodemus, C.F., Yssel, H., and Bousquet, J. (1998). Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 571–578.
- Peron, J.P.S., De Oliveira, A.P.L., and Rizzo, L.V. (2009). It takes guts for tolerance: the phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. *Autoimmun Rev* 9, 1–4.
- Petrucelli, S., Chirido, F.G., and Añón, M.C. (2005). Immunochemical reactivity of soybean β -conglycinin subunits. *Food and Agricultural Immunology* 16, 17–28.
- Pieper, U., Eswar, N., Stuart, A.C., Ilyin, V.A., and Sali, A. (2002). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic Acids Res.* 30, 255–259.
- Pons, L., Ponnappan, U., Hall, R.A., Simpson, P., Cockrell, G., West, C.M., Sampson, H.A., Helm, R.M., and Burks, A.W. (2004). Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: modulation of the peanut-allergic response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 915–921.
- Prescott, S.L., Macaubas, C., Holt, B.J., Smallacombe, T.B., Loh, R., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 160, 4730–4737.
- Pugliatti, M., Sotgiu, S., Solinas, G., Castiglia, P., Pirastru, M.I., Murgia, B., Mannu, L., Sanna, G., and Rosati, G. (2001). Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk. *Acta Neurol. Scand.* 103, 20–26.
- Purkey, M.T., Smith, T.L., Ferguson, B.J., Luong, A., Reisacher, W.R., Pillsbury, H.C., 3rd, and Toskala, E. (2013). Subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis: an evidence based review of the recent literature with recommendations. *Int Forum Allergy Rhinol.*
- Rabjohn, P., Helm, E.M., Stanley, J.S., West, C.M., Sampson, H.A., Burks, A.W., and Bannon, G.A. (1999). Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J. Clin. Invest.* 103, 535–542.
- Reineke, U., Volkmer-Engert, R., and Schneider-Mergener, J. (2001). Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 59–64.
- Rihs, H.P., Chen, Z., Ruëff, F., Petersen, A., Rozynek, P., Heimann, H., and Baur, X. (1999). IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1293–1301.

- Rogers, P.R., and Croft, M. (1999). Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J. Immunol.* *163*, 1205–1213.
- Romagnani, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* *12*, 256–257.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., et al. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 638–646.
- Roy, K., Mao, H.Q., Huang, S.K., and Leong, K.W. (1999). Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* *5*, 387–391.
- Rozenfeld, P., Docena, G.H., Añón, M.C., and Fossati, C.A. (2002). Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin. Exp. Immunol.* *130*, 49–58.
- Ruiter, B., Trégoat, V., M'rabet, L., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knol, E.F., and Hoffen, E. (2006). Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clin. Exp. Allergy* *36*, 303–310.
- Ruiter, B., Rozemuller, E.H., Van Dijk, A.J., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Tilanus, M.G., Knol, E.F., and Van Hoffen, E. (2007). Role of human leucocyte antigen DQ in the presentation of T cell epitopes in the major cow's milk allergen alphas1-casein. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *143*, 119–126.
- Rupa, P., and Mine, Y. (2012). Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy* *67*, 74–82.
- Russo, M., Nahori, M.A., Lefort, J., Gomes, E., De Castro Keller, A., Rodriguez, D., Ribeiro, O.G., Adriouch, S., Gallois, V., De Faria, A.M., et al. (2001). Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *24*, 518–526.
- Sampson, H.A. (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* *103*, 717–728.
- Sampson, H.A. (2004). Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *113*, 805–819; quiz 820.
- Santiago, H. da C., Bennuru, S., Ribeiro, J.M.C., and Nutman, T.B. (2012). Structural differences between human proteins and aero- and microbial allergens define allergenicity. *PLoS ONE* *7*, e40552.
- Santiago, H.C., Bennuru, S., Boyd, A., Eberhard, M., and Nutman, T.B. (2011). Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 479–486.

- Savage, J.H., Matsui, E.C., Skripak, J.M., and Wood, R.A. (2007). The natural history of egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1413–1417.
- Schade, R.P., Van Ieperen–Van Dijk, A.G., Van Reijssen, F.C., Versluis, C., Kimpen, J.L., Knol, E.F., Bruijnzeel–Koomen, C.A., and Van Hoffen, E. (2000). Differences in antigen–specific T–cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow’s milk allergy: relevance of TH2 cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* *106*, 1155–1162.
- Schein, C.H., Ivanciuc, O., and Braun, W. (2007). Bioinformatics approaches to classifying allergens and predicting cross–reactivity. *Immunol Allergy Clin North Am* *27*, 1–27.
- Schulmeister, U., Hochwallner, H., Swoboda, I., Focke–Tejkl, M., Geller, B., Nystrand, M., Härlin, A., Thalhamer, J., Scheiblhofer, S., Keller, W., et al. (2009). Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1–casein, a major cow’s milk allergen. *J. Immunol.* *182*, 7019–7029.
- Schulten, V., Radakovics, A., Hartz, C., Mari, A., Vazquez–Cortes, S., Fernandez–Rivas, M., Lauer, I., Jahn–Schmid, B., Eiwegger, T., Scheurer, S., et al. (2009). Characterization of the allergic T–cell response to Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein in peach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *124*, 100–107.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med.* *206*, 3101–3114.
- Scott, J.K. (1992). Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 241–245.
- Scott, J.K., and Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* *249*, 386–390.
- Shibasaki, M., Suzuki, S., Tajima, S., Nemoto, H., and Kuroume, T. (1980). Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* *67*, 441–448.
- Shreffler, W.G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak–Wegrzyn, A., and Sampson, H.A. (2009). Association of allergen–specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 43–52.e7.
- Sicherer, S.H. (2001). Clinical implications of cross–reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *108*, 881–890.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2007). Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 491–503; quiz 504–505.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2009). Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu. Rev. Med.* *60*, 261–277.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2010). Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S116–125.

- Silvanovich, A., Nemeth, M.A., Song, P., Herman, R., Tagliani, L., and Bannon, G.A. (2006). The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Toxicol. Sci.* *90*, 252–258.
- Skripak, J.M., Matsui, E.C., Mudd, K., and Wood, R.A. (2007). The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1172–1177.
- Skripak, J.M., Nash, S.D., Rowley, H., Brereton, N.H., Oh, S., Hamilton, R.G., Matsui, E.C., Burks, A.W., and Wood, R.A. (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 1154–1160.
- Smaldini, P., Curciarello, R., Candreva, A., Rey, M.A., Fossati, C.A., Petruccelli, S., and Docena, G.H. (2012). In vivo Evidence of Cross-Reactivity between Cow's Milk and Soybean Proteins in a Mouse Model of Food Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* *158*, 335–346.
- Soriani, M., Petit, P., Grifantini, R., Petracca, R., Gancitano, G., Frigimelica, E., Nardelli, F., Garcia, C., Spinelli, S., Scarabelli, G., et al. (2010). Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm. *J. Biol. Chem.* *285*, 30126–30138.
- Spuergin, P., Mueller, H., Walter, M., Schiltz, E., and Forster, J. (1996). Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy* *51*, 306–312.
- Srivastava, K.D., Kattan, J.D., Zou, Z.M., Li, J.H., Zhang, L., Wallenstein, S., Goldfarb, J., Sampson, H.A., and Li, X.-M. (2005). The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 171–178.
- Srivastava, K.D., Bardina, L., Sampson, H.A., and Li, X.-M. (2012). Efficacy and immunological actions of FAHF-2 in a murine model of multiple food allergies. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *108*, 351–358.e1.
- Steckelbroeck, S., Ballmer-Weber, B.K., and Vieths, S. (2008). Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 1323–1330.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* *299*, 1259–1260.
- Suckau, D., Köhl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., and Przybylski, M. (1990). Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 9848–9852.
- Szaflarska-Szczepanik, A., and Gasiorowska, J. (2003). [Prevalence of soya allergy in children with cow's milk allergy]. *Med Wieku Rozwoj* *7*, 241–248.
- Thomas, K., Bannon, G., Hefle, S., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G., MacIntosh, S., and Privalle, L. (2005). In silico methods for evaluating human allergenicity to novel proteins: International Bioinformatics Workshop Meeting Report, 23–24 February 2005. *Toxicol. Sci.* *88*, 307–310.

Thorstenson, K.M., and Khoruts, A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.* *167*, 188–195.

Till, S., Durham, S., Dickason, R., Huston, D., Bungre, J., Walker, S., Robinson, D., Kay, A.B., and Corrigan, C. (1997). IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN- γ expression. *Immunology* *91*, 53–57.

Du Toit, G., Katz, Y., Sasieni, P., Mesher, D., Maleki, S.J., Fisher, H.R., Fox, A.T., Turcanu, V., Amir, T., Zadik-Mnuhin, G., et al. (2008). Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 984–991.

Tordesillas, L., Cuesta-Herranz, J., Gonzalez-Muñoz, M., Pacios, L.F., Compés, E., Garcia-Carrasco, B., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G., and Diaz-Perales, A. (2009). T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects. *Molecular Immunology* *46*, 722–728.

Tsuji, H., Bando, N., Hiemori, M., Yamanishi, R., Kimoto, M., Nishikawa, K., and Ogawa, T. (1997). Purification and characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *61*, 942–947.

Tsuji, H., Hiemori, M., Kimoto, M., Yamashita, H., Kobatake, R., Adachi, M., Fukuda, T., Bando, N., Okita, M., and Utsumi, S. (2001a). Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Biochim. Biophys. Acta* *1518*, 178–182.

Tsuji, H., Hiemori, M., Kimoto, M., Yamashita, H., Kobatake, R., Adachi, M., Fukuda, T., Bando, N., Okita, M., and Utsumi, S. (2001b). Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Biochim. Biophys. Acta* *1518*, 178–182.

Tunis, M.C., Dawicki, W., Carson, K.R., Wang, J., and Marshall, J.S. (2012). Mast cells and IgE activation do not alter the development of oral tolerance in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 705–715.e1.

Tuomilehto, J., Karvonen, M., Pitkäniemi, J., Virtala, E., Kohtamäki, K., Toivanen, L., and Tuomilehto-Wolf, E. (1999). Record-high incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Finnish children. The Finnish Childhood Type I Diabetes Registry Group. *Diabetologia* *42*, 655–660.

Vandezande, L.M., Wallaert, B., Desreumaux, P., Tsicopoulos, A., Lamblin, C., Tonnel, A.B., and Janin, A. (1999). Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy. *Clin. Exp. Allergy* *29*, 652–659.

Verhoef, A., Alexander, C., Kay, A.B., and Larché, M. (2005). T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity. *PLoS Med.* *2*, e78.

Vrtala, S., Akdis, C.A., Budak, F., Akdis, M., Blaser, K., Kraft, D., and Valenta, R. (2000). T cell epitope-containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, induce blocking antibodies. *J. Immunol.* *165*, 6653–6659.

- Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Susani, M., Akdis, M., Kussebi, F., Akdis, C.A., Blaser, K., Hufnagl, P., Binder, B.R., Politou, A., et al. (2001). Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J.* *15*, 2045–2047.
- Wal, J.M. (2001). Structure and function of milk allergens. *Allergy* *56 Suppl 67*, 35–38.
- Wal, J.-M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *93*, S2–11.
- Wang, J., and Sampson, H.A. (2011). Food allergy. *J. Clin. Invest.* *121*, 827–835.
- Wang, J., Lin, J., Bardina, L., Goldis, M., Nowak-Węgrzyn, A., Shreffler, W.G., and Sampson, H.A. (2010). Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 695–702, 702.e1–702.e6.
- Wanich, N., Nowak-Węgrzyn, A., Sampson, H.A., and Shreffler, W.G. (2009). Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 789–794.e20.
- Wensing, M., Knulst, A.C., Piersma, S., O’Kane, F., Knol, E.F., and Koppelman, S.J. (2003). Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 420–424.
- Van Wijk, F., Hoeks, S., Nierkens, S., Koppelman, S.J., Van Kooten, P., Boon, L., Knippels, L.M.J., and Pieters, R. (2005). CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization. *J. Immunol.* *174*, 174–179.
- Wills-Karp, M., Nathan, A., Page, K., and Karp, C.L. (2010). New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal Immunol* *3*, 104–110.
- Xia, L., Willison, L.N., Porter, L., Robotham, J.M., Teuber, S.S., Sathe, S.K., and Roux, K.H. (2010). Mapping of a conformational epitope on the cashew allergen Ana o 2: a discontinuous large subunit epitope dependent upon homologous or heterologous small subunit association. *Mol. Immunol.* *47*, 1808–1816.
- Xiang, P., Beardslee, T.A., Zeece, M.G., Markwell, J., and Sarath, G. (2002). Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Arch. Biochem. Biophys.* *408*, 51–57.
- Xiang, P., Haas, E.J., Zeece, M.G., Markwell, J., and Sarath, G. (2004). C-Terminal 23 kDa polypeptide of soybean Gly m Bd 28 K is a potential allergen. *Planta* *220*, 56–63.
- Yanagihara, Y. (1999). Molecular regulation of human IgE synthesis. *Allergology International* *48*, 111–119.
- Zeiger, R.S., Sampson, H.A., Bock, S.A., Burks, A.W., Jr, Harden, K., Noone, S., Martin, D., Leung, S., and Wilson, G. (1999). Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow’s milk allergy. *J. Pediatr.* *134*, 614–622.

Zhang, G.L., Khan, A.M., Srinivasan, K.N., August, J.T., and Brusica, V. (2005). MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides. *Nucleic Acids Res.* *33*, W172–179.

Zhang, T., Pan, W., Takebe, M., Schofield, B., Sampson, H., and Li, X.-M. (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. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 1808–1818.

Zhao, Y., and Chalt, B.T. (1994). Protein epitope mapping by mass spectrometry. *Anal. Chem.* *66*, 3723–3726.

Ziegler, S.F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 845–852.

Zoppi, G., and Guandalini, S. (1999). The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *28*, 541–543.