

TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOTECNOLÓGICAS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ALERGENOS RECOMBINANTES DEL ACARO *Blomia  
tropicalis* EN DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN: *Escherichia coli* y *Pichia  
pastoris*

PASANTÍA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS  
DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

LEONAR ANTONIO ARROYO GAMERO

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2004

**TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOTECNOLÓGICAS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ALERGENOS RECOMBINANTES DEL ACARO *Blomia  
tropicalis* EN DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN: *Escherichia coli* y *Pichia  
pastoris***

**LEONAR ANTONIO ARROYO GAMERO**

**Trabajo de grado para optar al título de biólogo con énfasis en  
biotecnología**

**LUIS CARABALLO G. MD, PhD.  
DIRECTOR**

**PEDRO BLANCO T. MD, MSc.  
CODIRECTOR**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2004**

## INTRODUCCIÓN

Estamos entrando a una nueva era de la investigación biomédica, donde la biología molecular y disciplinas afines como la genética molecular, la biotecnología y la ingeniería genética son herramientas imprescindibles de ese avance. Estas disciplinas han progresado rápida y enormemente, revolucionando sobretodo, el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades.

La biología molecular esta empezando a resolver problemas que van mas allá del estudio de virus o células aisladas. Sus métodos están siendo aplicados en otros campos como son el desarrollo y diferenciación de tejidos completos y órganos, el sistema nervioso e incluso la clonación de seres vivos. La genética molecular por su lado, ha permitido estudiar e identificar genes involucrados en el desarrollo de enfermedades. Los avances biotecnológicos han permitido la producción de proteínas recombinantes en gran cantidad y biológicamente activas, con un potencial uso para el tratamiento de enfermedades. Las técnicas de ingeniería genética por su lado, se han utilizado para modificar proteínas con el fin de estudiar su estructura y función, o para utilizarlas en estrategias para el tratamiento de enfermedades.

La alergología no ha escapado a la influencia de esta revolución científica y tecnológica. El advenimiento de las técnicas de biología molecular y biotecnología ha permitido la producción de alérgenos recombinantes en gran cantidad, la producción de anticuerpos monoclonales y la obtención de moléculas con una disminuida capacidad de unión a la IgE (hipoalergénicas). Estos avances han facilitado la identificación y caracterización de alérgenos provenientes de diversas fuentes animales y vegetales (consultar, [www.allergen.org](http://www.allergen.org)), el estudio de los mecanismos implicados en la alergia

(1,2), y el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas (3-7). La genética molecular por su parte, esta teniendo un gran impacto en la alergología puesto que con su ayuda se han delimitado con gran precisión zonas cromosómicas donde se localizan genes implicados en la alergia.

El Instituto de Investigaciones inmunológicas de la universidad de Cartagena (I.I.I), se ha dedicado principalmente al estudio de los factores de riesgo de las enfermedades alérgicas, y cuenta con dos líneas de investigación la caracterización de alergenos y genética molecular del asma.

Mediante la tecnología del ADN recombinante, el I.I.I ha logrado clonar varios de los alergenos del acaro *B. tropicalis*, a partir de una biblioteca de ADN copia (ADNc). Esto ha permitido tener los alergenos de forma pura y en cantidades suficientes para caracterizarlos en mas detalle, y para explorar formas de manipular su alergenicidad de tal modo que puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades alérgicas. El I.I.I por lo tanto, es un Instituto con un amplio desarrollo tecnológico y científico, donde la biotecnología tiene una aplicación importante.

Con el objetivo general de profundizar los conocimientos teóricos y adquirir nuevas destrezas en biotecnología, inmunología e inmunoquímica y fortalecer mi vocación investigativa, el director de este centro investigativo me permitió realizar una pasantía de un año (febrero de 2003 a febrero de 2004) en sus instalaciones como parte de mi trabajo de grado, para optar al titulo de biólogo con énfasis en biotecnología. Para alcanzar el objetivo general me propuse conseguir los siguientes objetivos específicos durante el transcurso de la pasantía:

- Aumentar los conocimientos teóricos en Inmunología básica.

- Aumentar los conocimientos teóricos en Biotecnología.
- Aumentar los conocimientos teóricos en Inmunoquímica.
- Adquirir nuevas destrezas en Biotecnología de alergenos.
- Adquirir nuevas destrezas en lectura, análisis y presentación de artículos científicos.
- Fortalecer la vocación por la investigación científica.
- Familiarizarse con la rutina académica de un laboratorio de investigación científica.

Durante el transcurso de la pasantía desarrolle una serie de actividades académicas dentro del laboratorio biotecnología y fuera de este, bajo la supervisión de los investigadores Leonardo Puerta QF, Silvia Jiménez L.B y Luis Caraballo MD, destinadas a alcanzar los objetivos propuestos al iniciar la pasantía.

En este trabajo presento un informe crítico del trabajo realizado en la pasantía, donde describo brevemente el impacto y perspectivas del Instituto, así como las actividades que realicé durante todo el año y su importancia en mi formación profesional. También presento un artículo de revisión de un tema importante en mi área de profundización, realizado en el transcurso de la pasantía, cumpliendo de este modo los requisitos exigidos para la presentación del trabajo de grado en la modalidad de pasantía.

## CAPITULO I: INFORME CRÍTICO

El asma es un problema inflamatorio crónico de las vías respiratorias (8) que en la mayoría de los casos es causado por mecanismos alérgicos. En la etiología de esta enfermedad están involucrados factores ambientales y genéticos. Entre los factores ambientales se encuentran principalmente los alérgenos, los cuales en personas genéticamente predispuestas inducen una respuesta alérgica mediada por la inmunoglobulina E (IgE), que inicia el proceso inflamatorio crónico del árbol bronquial característico de esta enfermedad. Este problema está distribuido a nivel mundial, y en la mayoría de los países, su incidencia y mortalidad está incrementando rápidamente. La gravedad de este problema es tal que ya ha sido reconocido a nivel mundial por la mayoría de las sociedades científicas y organizaciones internacionales (9).

Los ácaros pertenecientes a la familia pyroglyphidae, como *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *Dermatophagoides farinae* (Df), *Euroglyphus maynei* (Em) y *Blomia tropicalis* (Bt) un acaro perteneciente a la familia Glyciphagidae, son la principal fuente de alérgenos del polvo de habitación e importantes factores etiológicos en las enfermedades respiratorias alérgicas como el asma y rinitis (10-12). Los factores genéticos son diversos, en la última década se ha producido un considerable avance en la investigación de los factores genéticos de las enfermedades alérgicas como el asma. Estudios de ligamiento genético por medio de rastreos genómicos, utilizando diversos marcadores genéticos en un gran número de familias con miembros afectados, han detectado ligamiento en varias regiones cromosómicas con fenotipos de enfermedades alérgicas (Atopia, IgE total elevada, IgE específica contra ácaros, asma, rinitis, dermatitis entre otras) (13).

Los estudios de mortalidad realizados en Colombia señalan que la mortalidad por esta enfermedad es alta, llegando a tasas de 1,6 por 10.000 habitantes, poniendo en evidencia la gravedad de este problema en el país (14). En Cartagena, una ciudad del caribe colombiano, se ha encontrado que la prevalencia de asma y de rinitis es alta, afectando al 12,2% y al 16,4% de la población general, respectivamente (15).

El I.I.I se ha dedicado al estudio de los factores etiológicos del asma en la ciudad de Cartagena, y presenta dos líneas de investigación: caracterización de alérgenos y genética molecular del asma. Los estudios epidemiológicos realizados en la última década en este instituto demostraron que el ácaro *Bíomia tropicalis*, es la especie de mayor prevalencia en la ciudad de Cartagena, seguido por el acaro *Dermatophagoides pteronissynus* (Dp) (16). Estudios posteriores demostraron que la sensibilización a *Bt* es alta entre los pacientes con asma y rinitis alérgica (17). El 80,5% y 38,3%, de los pacientes con asma y rinitis alérgica respectivamente, presentaron IgE específica a los alérgenos de *Bt*, poniendo en evidencia el importante papel alérgico de este ácaro en el desarrollo de enfermedades alérgicas en la ciudad de Cartagena.

El importante papel de los alérgenos de ácaros en el desarrollo de enfermedades respiratorias como el asma y rinitis alérgica u otras manifestaciones atópicas, ha motivado su identificación y caracterización por los grupos de alergología experimental a nivel mundial, con el fin de obtener conocimiento biológico de los mecanismos involucrados en la alergia, así como la obtención de proteínas que ayuden a realizar un mejor diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades alérgicas.

La investigación sobre las características de los alérgenos de *Bt* ha sido de particular interés en el I.I.I de la universidad de Cartagena, debido a la

relevancia clínica de este ácaro en la ciudad de Cartagena. Inicialmente aplicando ensayos de isoelectroenfoque se identificaron 18 alérgenos a partir del extracto del cuerpo de Bt, con puntos isoelectrónicos entre 2.7 y 7.2 (18). Posteriormente por medio de ensayos de inmunotransferencia del extracto del cuerpo de Bt, con sueros de pacientes alérgicos a este ácaro, lograron identificar 25 fracciones alérgicas, dentro de las cuales las bandas de 11-13 Kd, 14.4 Kd, 33-36Kd y 64 Kd presentaron mayor frecuencia de unión a la IgE de los alérgicos (19).

Con el fin de caracterizar mejor los alérgenos de Bt, se adoptó la estrategia de clonarlos utilizando técnicas de ADN recombinante. Utilizando esta tecnología se han logrado clonar tres alérgenos de Bt partiendo de una biblioteca de ADN copia (ADNc) y los han expresado como proteínas recombinantes, suministrando de esta manera información importante sobre los componentes alérgicos de este acaro (20-22). Estos alérgenos son Bt-M, el cual tiene un peso molecular de 8,3 Kd y que parece ser una clona parcial de Blo t 5, Blo t 12 que tiene un peso molecular de 14,2 Kd y Blo t 13, una proteína de unión ácidos grasos que tiene un peso molecular de 14,8 Kd. Otros alérgenos de *Bt*, han sido clonados, secuenciados y caracterizados (23), aumentando de este modo el número de alérgenos de Bt caracterizados.

Utilizando estas moléculas recombinantes se han realizado importantes avances en la caracterización de los alérgenos de Bt. Por medio de ensayos de inhibición de péptidos superpuestos, lograron detectar un epítopo alérgico mayor de carácter lineal en el alérgeno Bt-M (24). Empleando la proteína recombinante Blo t 13, se confirmó experimentalmente la función biológica del alérgeno en ensayos de unión a ligandos fluorescentes, convirtiéndose en el único alérgeno de Bt cuya función biológica se ha identificado experimentalmente (25). Por medio de un estudio colaborativo

con el centro nacional de biopreparados de La Habana (Cuba), se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra el alérgeno recombinante Blo t 13 (26).

Actualmente en el Instituto se llevan a cabo trabajos destinados a la determinación de la estructura terciaria del alérgeno Blo t 13, en asociación con la universidad de Glasgow (Escocia). También se adelanta un proyecto que busca la obtención moléculas recombinantes hipoalergénicas, de potencial utilidad en el tratamiento de enfermedades alérgicas (27).

En el transcurso de la pasantía me desempeñé en el laboratorio de biotecnología, donde permanecí tiempo completo y con dedicación exclusiva, bajo la asesoría y supervisión de los investigadores Leonardo Puerta Q.F, Silvia Jiménez L.B, y del director de la pasantía. Dentro del laboratorio de biotecnología participe en la realización de actividades y experimentos, que hacían parte de diferentes proyectos de investigación que se adelantan en el instituto.

1. Bajo la supervisión del investigador Leonardo Puerta, colaboré en los experimentos que hacían parte del proyecto “generación de una mutante de un alérgeno de unión a ácidos grasos (FABPs)”, dirigido por este mismo investigador, realizando la expresión del alérgeno Blo t 13/3M, un alérgeno recombinante mutante de Bt en la bacteria *Escherichia coli*.

El propósito principal de la caracterización de los alérgenos es su aplicación para el control de las enfermedades alérgicas. Durante el presente siglo la inmunoterapia (“hiposensibilización”) con extractos alérgénicos se ha mantenido como la única opción terapéutica capaz de modificar el curso natural de las enfermedades alérgicas, especialmente la anafilaxia por picaduras de insectos y los problemas respiratorios provocados por aeroalérgenos. Para mejorar la eficacia y reducir los riesgos de este

tratamiento, se han creado nuevas estrategias para la utilización de alergen recombinantes en inmunoterapia, una de ellas es la modificación genética de los alergen recombinantes para producir moléculas con una reducida capacidad de unión a la IgE (hipoalergen), pero que retienen los epitopes T. Actualmente se han producido moléculas hipoalergénicas de alergen de ácaros y de plantas (6, 7), las cuales han sido ensayadas en modelos animales con resultados muy satisfactorios, lo cual justificaría el posible uso de los recombinantes o sus derivados en el tratamiento de las alergias.

Para analizar la estructura antigénica de Blo t 13 y obtener moléculas de alergen con propiedades inmunogénicas distintas a la molécula original, se realizaron experimentos de mutagénesis dirigidos a alterar los codones codificadores de aminoácidos críticos para los perfiles hidropáticos, accesibilidad de residuos y movilidad de la molécula, los cuales fueron identificados utilizando el programa ProtScale, a través de ExPASy Molecular Biology Server, via internet. Los experimentos de mutagénesis se realizaron utilizando el método de Mega Primers (28) y, por medio de este, se obtuvieron tres clones de Blo t 13 con probables modificaciones en residuos críticos para la conformación y actividad antigénica del alérgeno. Uno de los clones mutantes Bo t 13/3M fue insertado en el vector pGEX 4T3-1 para expresarlo en la cepa de bacteria BL21, de *E. coli*.

El sistema de expresión procariótico, *E. Coli*, es fácil de manejar, es económico y puede ser bastante productivo para la expresión de proteínas recombinantes. Además, la facilidad con la que esta bacteria puede ser cultivada y manipulada utilizando diversas estrategias genéticas y el conocimiento obtenido por su estudio, la ha constituido en uno de los hospedadores mas utilizados para expresión de proteínas codificadas por genes clonados.

Una amplia variedad de cepas de bacterias pueden ser utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes, sin embargo, existen unas cepas de bacterias especialmente modificadas que son más eficientes y que pueden maximizar la expresión de recombinantes. Una de estas, es la cepa de bacteria BL21, la cual es defectiva en la producción de las proteasas citoplasmáticas OmpT y Lon, por lo que puede ayudar en la expresión de proteínas recombinantes por la minimización de los efectos de degradación proteolítica. Incluso, esta cepa puede ayudar en algunos casos a incrementar la cantidad de proteínas obtenidas en una forma intacta y soluble.

La mayoría de los alérgenos de ácaros han sido expresados utilizando el sistema procariótico *E. coli* (23). Varios de los alérgenos se han obtenido en este sistema, expresándolos directamente en el citoplasma de *E. coli*, y muestran una reactividad a la IgE similar a la del alérgeno nativo, cuando estos son comparados en ensayos *in vitro* e *in vivo*. De hecho algunos de estos han sido utilizados para determinar la estructura terciaria del alérgeno (29,30).

Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, presenta diversas dificultades. Por ser un organismo procariótico, *E. coli* no realiza muchas de las modificaciones postraduccionales que se realizan con facilidad en los organismos eucarióticos. Por otro lado, la expresión directa de proteínas en el citoplasma de *E. coli*, forma la mayoría de las veces agregados densos e insolubles de proteínas, llamados cuerpos de inclusión, los cuales pueden causar la producción de una proteína biológicamente inactiva.

Aunque estas limitaciones son generales para la producción de cualquier proteína recombinante, pueden ser críticas para la producción de alérgenos

recombinantes, debido a que mucha de la reactividad a la IgE de estas proteínas depende de su estructura conformacional.

La expresión de proteínas recombinantes como proteínas de fusión es una alternativa muy utilizada para superar problemas presentados en *E. coli*, tales como: inconsistencia en los niveles de expresión, falta de solubilidad y dificultad en la purificación de la proteína recombinante. En el I.I.I han optado por la expresión de los alérgenos como proteínas de fusión, utilizando los vectores de la serie pGEX, los cuales han sido utilizados para la expresión de diversos alérgenos de ácaros en *E. coli* y han resultado ser prácticos y eficientes (31).

Los plásmidos de la serie pGEX, permiten la expresión de proteínas como proteína de fusión unido a la glutatión S transferasa (GST), una proteína transportadora (32) (ver anexos, fig 1). La GST es una proteína citoplasmática de *Schistosoma japonicum* que tiene un peso de 26 KD, cuyo gen es bien expresado en *E. coli*. En estos vectores, la secuencia de ADNc que codifica para la proteína de interés esta insertada en el extremo 3' de la secuencia que codifica a la GST, en lugar de tener el codón usual de terminación. Como resultado, la iniciación de la traducción de la proteína recombinante unida a la proteína de fusión se produce de una manera uniforme, ayudando de esta manera a incrementar los niveles de expresión de la proteína recombinante.

La GST, además, es una proteína altamente soluble, una cualidad que se extiende a la proteína fusionada a ella, aumentando de esta manera la solubilidad de la proteína entera. Por otro lado la GST se une específicamente a la glutatión, por lo que la proteína unida a la GST puede ser purificada por medio de un único paso de purificación, a partir del lisado bacteriano crudo por medio de cromatografía de afinidad en glutatión

inmovilizado. Estos vectores cuentan además con una secuencia de reconocimiento para el factor Xa o para trombina que permite el corte y remoción de la GST de la proteína de interés después de la purificación por afinidad.

Los plásmidos de esta serie contienen el promotor tac, el cual es un promotor transcripcional controlable, que al ser inducido puede dirigir la producción de grandes cantidades del ARN mensajero a partir del gen clonado. Además está genéticamente modificado con el gen Lac I<sup>q</sup>, cuyo producto es una proteína represora que se une a la región operadora del promotor tac, previniendo la expresión hasta el momento de la inducción. La inducción del promotor tac es realizada químicamente con la adición de isopropil-B-tiogalactosapiranosido (IPTG), el cual es un análogo de la lactosa que se une al represor lac e impide que este se una a la secuencia operadora localizada en el promotor tac. De esta manera, la proteína puede ser expresada en el momento propicio para que se obtenga una cantidad óptima de esta. Además, esto evita la acumulación de proteínas que algunas veces pueden ser tóxicas para el crecimiento de las bacterias.

A pesar de las ventajas que ofrece la utilización de los vectores pGEX para la expresión de los alérgenos recombinantes en *E. coli*, algunas proteínas obtenidas utilizando este sistema no muestran una reactividad similar a la del alérgeno nativo y muchas veces la cantidad de proteína obtenida es baja. El problema más sobresaliente ha sido observado con la producción del grupo 1 de alérgenos de ácaros, los cuales se expresan pobremente en *E. coli* y además tienen solo cerca del 50% de la reactividad a la IgE del alérgeno nativo (33,34).

Por otra parte los alérgenos del grupo 3 (Der p 3 y Der f 3) expresados en *E. coli* como proteínas de fusión, han mostrado una alta reactividad a la IgE; sin

embargo, las cantidades de proteínas solubles obtenidas ha sido baja (35). El alérgeno Der f 6 fue insoluble tras su expresión como proteína de fusión, aunque después de la digestión con trombina del polipéptido renaturalizado se obtuvieron algunos fragmentos reactivos contra la IgE (36). Los alérgenos del grupo 10, producidos como proteínas de fusión en *E. coli*, tuvieron una reactividad a la IgE mas baja que el alérgeno nativo (37).

A raíz de los problemas presentados en el sistema de expresión procariótico, *E. coli*, muchos investigadores han sugerido la utilización de otros sistemas de expresión, que ofrezcan un mejor procesamiento de las proteínas, puesto que estos parecen ser indispensables para que algunos alérgenos recombinantes posean una reactividad a la IgE y una actividad biológica similar a la molécula nativa, lo cual es indispensable para realizar una completa caracterización de los alérgenos.

**2.** Bajo la supervisión de este mismo investigador colaboré también en la expresión de el alérgeno Blo t 13 en un sistema de expresión eucariótico, la levadura *Pichia pastoris*. Estos experimentos estaban enmarcados en el proyecto que se adelanta en el instituto de obtener la estructura terciaria del alérgeno Blot 13.

La definición de la estructura terciaria de un alérgeno, constituye una parte muy importante en la caracterización de los alérgenos, debido que al determinar la estructura, se pueden analizar mejor la regiones alérgicas e inmunogénicas, así como su relación con las regiones biológicamente activas. A demás, los cambios estructurales globales secundarios a la mutagénesis dirigida también se perciben mejor en estas condiciones.

La estructura del alérgeno Blo t 13, ha sido determinada utilizando el programa de modelage molecular SWISSMODEL, tomando como base la

estructura de varias secuencias homologas de proteínas de unión a ácidos grasos (humano, insecto y ratón), similares a Blo t 13 (25). El modelo de la estructura tridimensional obtenido para el alérgeno Blo t 13, se ajusta bastante a la estructura característica de las FABPs, sin embargo, esta tecnología no determina la estructura precisa del alérgeno.

Para obtener con certeza la estructura nativa del alérgeno Blo t 13, es preciso realizar estudios de espectroscopia (con resonancia magnética nuclear o dicroísmo circular) y cristalografía mediante difracción de rayos X. Estos estudios requieren grandes cantidades de proteína pura, por lo que estos estudios se ven favorecidos por la utilización de moléculas recombinantes, sin embargo es importante que los recombinantes sean similares a su contraparte nativa en estructura, función y reactividad inmunológica.

Algunos investigadores han utilizado moléculas recombinantes producidas en *E. coli*, para determinar la estructura terciaria del alérgeno nativo, como es el caso de Der p 2, cuya estructura terciaria fue determinada utilizando el alérgeno recombinante producido en *E. coli* (33,34). Aunque algunas proteínas producidas en *E. Coli* presentan los epitopes de unión a la IgE, estas, no se pliegan apropiadamente, lo cual impide determinar la estructura nativa de la proteína. Al expresar estas proteínas en un sistema eucariótico se pliegan correctamente, esto se debe a que el sistema eucariótico a diferencia del sistema procariótico, es capaz de realizar las modificaciones postraducción de las proteínas las cuales incluyen: el procesamiento del péptido señal, plegamiento, formación de puentes disulfuro, hidroxilación de prolinas, adición de lípidos y carbohidratos. La producción de estas modificaciones asegura la obtención de una proteína recombinante similar a la proteína nativa.

La levadura *P. pastoris* es un organismo eucariótico unicelular, que en las últimas décadas se ha convertido en una herramienta valiosa para expresar altos niveles de proteínas recombinantes de interés en biotecnología y para la industria farmacéutica. Al igual que *E. coli*, *P. pastoris* es fácil de manejar, además, ofrece muchas de las ventajas de los sistemas de expresión eucariótico (procesamiento proteínico, formación de puentes bisulfuro y glicosilación)(38). *P. pastoris* es una levadura metilotrofica, que es capaz de metabolizar el metanol (una fuente de carbono económica y disponible) como única fuente de carbono. El metabolismo del metanol es realizado por la enzima alcohol oxidasa, una enzima codificada por el gen AOX1, el cual es fuertemente inducido en presencia de metanol. Además, este sistema permite la expresión de la proteína heteróloga de dos maneras; de forma intracelular y de forma secretada en el medio de cultivo. En los últimos años, este sistema ha sido utilizado para la expresión de alérgenos recombinantes obteniéndose altos niveles de expresión, los cuales oscilan entre 5 y 200 mg por litro de cultivo (38).

Con el fin de obtener alérgenos con sus propiedades biológicas y aumentar el rendimiento de la producción, en el I.I.I, se ha venido adelantando la utilización del sistema eucariótico *P. pastoris*, para producir alérgenos recombinantes (39,40).

Durante la pasantía realicé la expresión del alérgeno recombinante Blo t 13, a partir de cepas GS115 de levadura *P. pastoris*, transformadas con el plasmido recombinante pPIC9-Blo t 13. La cepa de levadura GS115, es comúnmente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes, esta tiene un defecto en la actividad histidinol deshidrogenasa, la cual es codificada por el gen HIS4, de tal modo que no puede sintetizar el aminoácido histidina, por lo que para su crecimiento necesita el suministro de dicho aminoácido (41). Esta característica sirve como mecanismo de

selección de las células transformadas con el vector de expresión, cuando son crecidas en un medio deficiente en histidina.

Existen diversos vectores para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* (41), los cuales son seleccionados con base en las cualidades de la proteína y a las facilidades del laboratorio. El plásmido pPIC9, tiene varias características algunas de las cuales son generales para los vectores utilizados para la expresión en *P. pastoris* (Ver Anexos, fig 2). Utiliza el promotor del gen alcohol oxidasa de *P. pastoris*, el 5' PAOX1. Este promotor es usado para conseguir la expresión inducible del gen en presencia de metanol, aprovechando que este es fuertemente regulado. La regulación envuelve un proceso de dos pasos, un mecanismo de represión/desrepresión, mas un mecanismo de inducción. La desrepresión se logra con el crecimiento de la levadura en ausencia de una fuente de carbono represora como la glucosa, que en este caso fue el medio BMG (Buffer mínimo de glicerol). Sin embargo esto no es suficiente para producir niveles considerables del gen AOX1. La inducción de la expresión de la proteína se logra con el traslado de las levaduras a un medio de crecimiento mínimo en metanol (MM), donde el inductor se encuentra en una concentración del 5%.

Además de todas las características que son generales para la mayoría de los vectores de expresión, el pPIC9 posee una secuencia de ADN yuxtapuesta entre el 5'PAox1 y el MSC, que codifica para una secuencia señal de secreción de proteínas, el prepro MF-1 $\alpha$  o factor  $\alpha$ , de *S. cerevisiae*. El factor  $\alpha$  dirige el paso de las proteínas a través de la vía secretoria y lleva a la proteína que la porta al exterior de la célula. La expresión de proteínas heterólogas de forma secretada constituye una gran ventaja, debido a que *P. pastoris* secreta muy bajos niveles de proteínas nativas. Esto sumado a la baja cantidad de proteínas expresadas en el medio (MM), permite que la

proteína heteróloga secretada comprenda la mayor parte de las proteínas totales en el medio, y esto sirve como un primer paso en la purificación de la proteína expresada (41) .

Algunos alérgenos recombinantes que son difíciles de obtener en *E. coli*, han sido expresados en la levadura *P. Pastoris*, y se han obtenido buenos resultados. El caso más representativo lo constituyen los alérgenos del grupo 1 de los ácaros, los cuales han sido expresados en *P. pastoris* como proenzimas. Los alérgenos Der f 1 y Der p 1 expresados en *P. pastoris* han mostrado una reactividad a la IgE similar a la de la proteína nativa, y además presentan una actividad biológica normal. (42,43). El alérgeno Der p 4, un alérgeno con actividad  $\alpha$ -amilasa, ha sido expresado en *P. pastoris* de forma secretada, obteniéndose una buena cantidad de la proteína como una proteína activa y con una actividad de unión a la IgE del 40% (44).

La levadura *Sacharomises cerevisiae*, también ha sido utilizada para la expresión de alérgenos recombinantes, puesto que presenta similares ventajas a las presentadas por *P. pastoris*. Sin embargo, pocos alérgenos han sido producidos utilizando este sistema, debido a que en la mayoría de las ocasiones *S. cerevisiae* produce proteínas hiperglicosiladas, por lo que los investigadores prefieren utilizar usualmente a la levadura *P. pastoris* (38).

Otro sistema de expresión eucariótico utilizado para la expresión de alérgenos de ácaros es el sistema de expresión baculovirus-células de insecto, el cual ha resultado ser muy eficiente. Diversos factores lo hacen un sistema útil para la expresión de proteínas recombinantes. La mayoría de las proteínas expresadas permanecen solubles en el citoplasma de la célula, a diferencia del sistema de expresión procariótico, donde las proteínas son obtenidas muchas veces de forma insoluble. Por ser un organismo eucariótico superior, las células de insecto ofrecen un mejor procesamiento

de las proteínas. Además de esto, el genoma viral es grande y por esto puede aceptar segmentos grandes de ADN foráneo.

Una gran variedad de alérgenos recombinantes se ha expresado utilizando el sistema de expresión baculovirus. Algunos de ellos como, Sol i 2, Api m 2, Der p 1 y Der f 1, entre otros, han sido expresados tanto en el sistema procariótico como en el sistema baculovirus (45,46,47,48). Todos los alérgenos recombinantes producidos en el sistema baculovirus muestran una capacidad de unión a la IgE y una actividad biológica similar a la de la proteína nativa, a diferencia de lo observado en el sistema procariótico donde se obtienen estas moléculas con una reducida capacidad de unión a la IgE y/o con una disminuida actividad biológica.

No obstante el sistema de expresión baculovirus presenta algunas desventajas: en primer lugar, la cantidad de proteína obtenida con el sistema de expresión baculovirus no es tan alto como el obtenido en *P. pastoris*, en segundo lugar, los aditivos requeridos para el cultivo de células hace mas dispendiosa la purificación de la proteína recombinante, y en tercer lugar, se requieren técnicas y facilidades de laboratorio mas sofisticadas, para el cultivo de células de insecto en comparación al cultivo de *P. pastoris*.

**3.** Adicionalmente, bajo la asesoría de la investigadora Silvia Jiménez, colabore en los experimentos que estaban dirigidos al aislamiento y expresión de la secuencia codificadora de Blo t 1, un alérgeno de Bt. Estos experimentos estaban enmarcados en el proyecto “Alérgenos recombinantes de uso potencial en el manejo del asma alérgica, aplicación en el diagnóstico clínico fase II”.

Además del trabajo realizado en el laboratorio, durante la pasantía realice otras actividades, bajo la asesoría y supervisión de los investigadores

Leonardo Puerta y Luis Caraballo. Estas actividades incluyen; Asistencia al curso de inmunología, presentación de artículos científicos (clubes de revista), asistencia a seminarios y realización del artículo de revisión. Estas actividades son ilustradas claramente en los anexos.

El trabajo realizado en el laboratorio de biotecnología durante la pasantía fue muy importante para mi formación profesional, debido a que con este adquirí más conocimiento y destreza en técnicas, ensayos y metodologías que son utilizados corrientemente en biotecnología de alérgenos. Además, estas mismas técnicas, ensayos y metodologías tienen una gran aplicación en biología molecular y en biotecnología, y son utilizadas en otros centros investigativos y laboratorios dedicados a la investigación científica a nivel mundial. Por lo tanto, el trabajo realizado en el laboratorio, me ayudó a estar en un nivel más competitivo a nivel profesional.

El curso de inmunología fue muy edificante, ya que los investigadores del I.I.I, tienen un amplio recorrido investigativo y se mantienen actualizados en lo que respecta a los avances realizados en los temas concernientes al área de la inmunología. Este curso me ayudó a profundizar y a refinar los conocimientos que adquirí durante mi formación profesional en la Universidad de Sucre.

La presentación de artículos científicos y la asistencia a clubes de revista y seminarios fueron una actividad muy enriquecedora, puesto que por medio de estos adquirí más destreza en la lectura, análisis y presentación de artículos científicos. Además, la descripción de las técnicas y metodologías utilizados en los estudios socializados, enriquecieron mis conocimientos en inmunología, inmunoquímica y biotecnología de alérgenos. La realización del artículo de revisión por otra parte, me ayudó, tanto a adquirir más conocimiento y destreza en la lectura y análisis de artículos científicos, como

a familiarizarme y adquirir más destreza en la elaboración de documentos de carácter científico.

El conjunto de actividades efectuadas en el instituto durante la pasantía fortaleció mi vocación por la investigación científica. Además, por medio de esta experiencia me familiaricé con la rutina académica de un laboratorio de investigación científica, así como con el cuidado y responsabilidad que se maneja en un laboratorio de un nivel como este. Considero que el transcurso de este año alcance los objetivos que me propuse al inicio de la pasantía, la cual ha sido sin lugar a dudas una experiencia muy edificante, porque me permitió colocar en práctica los conocimientos que adquirí durante mi formación profesional en la universidad de Sucre y también, me dio la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y destrezas en un área investigativa relacionada con mi campo de acción profesional.

## REFERENCIAS

1. Caraballo L. Caracterización química y molecular de los alérgenos de *Blomia tropicalis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 1999;23:433-443.
2. Platt-Mills T.A.E, Vervloet D, Thomas W.R, Aalberse R.C, Chapman M.D. Indoor allergens and asthma: report of the third international workshop. J allergy clin immunol 1997;100: Suplement.
3. Chapman M.D, Smith A.M, Vailes L.D, Arruda L.K, Dhanaraj V, Pomes A. recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergy diseases. J Allergy Clin Immunol 2000;106:409-418.
4. Valenta R, Lidholm J, Neiderberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund A. The recombinant allergen-based concept of component resolved diagnosis and immunotherapy (CRD and CRIT). Clin Exp Allergy 1999;29:896-904.
5. Hsu C.H, Chua K.Y, Tao M.H, et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness *in vivo* by genetic immunization. Nat Med 1996;2:540-544.

6. Valenta R, Artala S, Focke-Tejkl M, Bugajska-Schetter A, Ball T, Twardos Z.A, Spitzaver S, Gonlud H, Kraft D. Genetically Engineered an synthetic allergen derivates: candidates for vaccination againts tipe I allergy. Biol Chem 1999;380:815-824.
7. Takai T, Yucota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, Okudaira H, Okumura Y. Engeneering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergic specific immunotherapy. Nat Biotechnol 1997;15:754-758.
8. Asthma. accession number (#600807), in online mendelian inheritance in man (OMIN).
9. Deen J, Vos T, Huttly S, Tulluch J. Injuries and noncommunicable diseases: emerging health problems of children in developing countries. Bulletin of the world health organization. 1999;77:518-524.
10. Platt-Mills T.A, De Week A.L, Dust mite allergens and asthma – a word wide problem. J Allergy Clin Immunol. 1989;83:416-72.
11. Platt-Mills T.A.E, Chapman M.D. Dust mite immunology, allergy diseases and enviromental control. J Allergy Clin Immunol. 1987;80:755-73.
12. Arlian L.G. Biology and ecology of mouse dust mite, Dermatophagoides spp and Euroglyphus spp. Inmunol Allergy Clin North Am. 1989;9:339-56.
13. Haaegerup A, Borglum A.D, Binderup H.G, Kruse T.A. Fine-escale mappin of type I allergy candidate loci suggest central susceptibility genes on chromosomes 3q, 4q and Xp. Allergy 2004;59:88-94.
14. Vergara C, Caraballo L. Asthma mortality in colombia. Ann allergy Asthma immunol. 1998 80:55-60.
15. Caraballo L, Cadavic A, Mendoza J. The prevalence of asthma in a tropical city of colombia. Annals of Allergy 1992;68:525-529.
16. Fernandez-caldas E. Puerta L, Mercado D, Locky R, Caraballo L. Mite fauna, Der p 1, Der f 1 and *Biomia tropicalis* allergens levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy. 1993;23:292-7.
17. Caraballo L, Puerta L, Cuadros G. Allergenic role of *Biomia tropicalis* in a caribbean city of Colombia. J Allergy Clin Immunol. 1992;89:248.

18. Mercado D, Puerta L, Caraballo L. Immunochemical study of allergens of *Blomia tropicalis* by isoelectrofocusion and immunobloting. J Allergy Clin Immunol 1992;89:150.
19. Caraballo L, Puerta L, Martinez B, et al. Identification of the allergens from the mite *Blomia tropicalis*. Clin exp Allergy 1994;24:1056-1060.
20. Caraballo L, Avjioglu A, Marrugo J, Puerta L, Marsh D. Cloning and expresión of complementary DNA coding for an allergen with common antibody-binding specificities with tree allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. J Allergy Clin Immunol 1996;98:573-579.
21. Puerta L, Caraballo L, Fernandez-Caldaz E, Avjioglu A, Marsh D, Lockey R, Dao M.L. Nucleotide sequence análisis of a complementary DNA coding for *Blomia tropicalis* Allergen. J Allergy Clin Immunol 1996;98:932-937.
22. Caraballo L, Puerta L, Jimenez S, Martinez B, Mercado D, Avjioglu A, Marsh D. Cloning And IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, Homologous with fatty acid-binding protein. Int Arch Allergy Immunol 1997;112:341-347.
23. Thomas W.R, Smith W-A, Halles B, Mills K, O'Brien R. Characterization and immunobiology of house dust mite. Int Arch Allergy Immunol. 2002;129:1-18.
24. Moreno L, Hamilton R, Rafnar T, Jiménez S, Marsh D, Caraballo L. Identification of a n IgE-binding epitope of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis* (Bt). J Allergy Clin Immunol 1997;99:S351(Abstract).
25. Puerta L, Kennedy M, Jiménez S, Caraballo L. Structural and ligand binding análisis of recombinant Blo t 13 allergens from *Blomia tropicalis* mite, a fatty acid-binding protein. Int Arch Allergy Immunol 1999.
26. Labrada M, Uyema K, Sewer M, Labrada A, González M, Caraballo L, Puerta L. Monoclonal antibodies against Blo t 13, a recombinant allergen from *Blomia tropicalis*. Int Arch Allergy Immunol. 2002;129:212-218.
27. Puerta L. Obtención y caracterización de un novel alérgeno mediante la tecnología del DNA recombinante. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2001;25:77-87.

28. Sarkar G and Sommer S. The "mega" primers method of site directed mutagenesis. *Biotechniques* 1990;8:404-407.
29. Mueller G, Benjamín D, Rule, G. Tertiary structure of the major house dust mite allergen Der p 2: Sequential structural homologies. *Biochemistry* 1998;37:12707-12714.
30. Smith A, Benjamín D, Derewenda U, Smith W, Thomas W, Chapman M. Sequence polymorphisms and antibody binding to the group 2 allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000.
31. Lynch N.R, Thomas W.R, Garcia N.M, Di prisco M.C, Puccio F.A, Lopez R, Hazell L, Shen H.D, Lind K.L, Chua K.Y. Biological activity of recombinant Der p 2, Der p 5 and Der p 7 allergen of house dust mite *Dermatophagoides pteronissynus*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:59-67.
32. GST Gene Fusion System. Handbook.18-1152-69. Amersham biosciences
33. Greene W.K, Cyster J.G, Chua K.Y, O'Brien R.M, Thomas W.R. IgE and IgG Binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen Der p I. *J Immunol* 1991;147:3768-3773
34. Greene W.R, Thomas W.R. IgE binding structures of the major house dust mite allergens Der p I. *Mol Immunol* 1992;29:257-262
35. Nishiyama C, yasuhara T, Yuuki T, Okumura Y. Cloning and expression in *Schericia coli* of cDNA encoding house dust mite allergen Der F 3, serine proteases from *Dermatophagoides farinae*. *FEBS Lett* 1995;377:62-66. 35.
36. Kawamoto S, Mizuguchi Y, Morimoto K et al. Cloning and expression of Der f 6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Biochim biophys Acta*. 1999;1454:201-207.
37. Aki T, Kodama T, Fujikawa A, et al. Immunochemical Characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from house dust mite *D. farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:74-78
38. Smidt M, Hoffman D.R. Expression systems for production of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:264-270.

39. Puerta L, Jimenez S, Lagares A, Caraballo L, High level expresión of the blomia tropicalis allergen Blo t 13 in the yeast *Pichia pastoris*. J allergy Clin Immunol 1999;103:S185
40. San juan H, Puerta L, Caraballo L. Expresión of Blomia tropicalis alleguen in the yeast *Pichia pastoris*. J allergy Clin Immunol 1998;101:S155.
41. Pichia Expresion Kit. A manual de methods for Expresion of recombinants proteins in pichia pastoris. Catalog No K1710-01, Invitrogen. 1998.
42. Best E.A, Stedman K.E, Bozic C.M, et al. A recombinant group 1 house dust mite allergen, rDer f 1, with biological activities similar to those of the native allergen. Protein Exp Purif 2000;20:462-471.
43. Yasuhara T, Takai T, Yuuki T, Okudaira H, Okumura Y. Biologically active recombinant forms of the major house dust mite group 1 allergen Der f 1 with full activities of both cysteine protease and IgE binding. Clin Exp Allergy 2001;31:116-124.
44. Mills K.L, Thomas W.R, Smith W, et al. Characterization of the group 4 allergens of the house dust mite. J Allergy Clin Immunol 2000;109:S180
45. Schmidt M, McConnell T, Hoffman D. Production of a recombinant imperted fire ant venom allergen, Sol I 2, in an native and immunoreactive form. J Allergy Clin Immunol 1996;98:82-88.
46. Soldatova L, Cramer R, Gmachl M, Kemeny D, Shmidt, Weber M, et al. Superior biologic activity of the recombinat bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. J Allergy Clin Immunol. 1998;101:691-698.
47. Takahashi K, Takai T, Yasuhara T, Yokota T, Okumura Y, Effects of site-directed mutagenesis in the cysteine residues and the N-glicosilation motif in the recombinant Der f 1 on secretion and protease activity. Int Arch Allergy Immunol 2001;124:454-460.
48. Jacquet A, Haumon M, Massaer M, et al. Biochemical and immunological characterization of a recombinant precursor form of the house dust mite allergen Der p1 produced by Drosophila cells. Clin Exp Allergy 2000;269:671-679.

**CAPITULO II  
ARTICULO DE REVISIÓN**

**PAPEL DE LOS EPITOPES DE CARBOHIDRATOS EN LA ACTIVIDAD DE  
LOS ALERGENOS**

**Leonar Arroyo \*, Leonardo Puerta, \*\***

\*Estudiante de Biología de la Universidad de Sucre, Sincelejo, en Pasantía

\*\*Profesor titular

Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

**RESUMEN**

Los carbohidratos presentes en alergenios derivados de plantas e invertebrados, en algunos casos, contienen epítipes que reaccionan con la Inmunoglobulina E. Esta reactividad es mediada por la presencia de los residuos de  $\alpha$  (1,3)-fucosa y  $\beta$ (1,2)-xilosa unidos al núcleo de manosa, los cuales están ampliamente distribuidos en plantas e invertebrados, pero no se encuentran en los mamíferos. La exposición al polen y a la picadura de abejas, inducen la producción de anticuerpos IgE contra epítipes de carbohidrato. Estos anticuerpos presentan reactividad cruzada con carbohidratos de estructura similar presentes en pólenes, en alimentos de origen vegetal y en invertebrados. Muchos casos de reactividad cruzada en los que están involucrados los epítipes de carbohidratos no están acompañados de síntomas clínicos, sugiriendo que los anticuerpos IgE dirigidos contra estos epítipes no tienen relevancia clínica. Estos anticuerpos producen resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico para alergia al polen y a los alimentos. Sin embargo, los alergenios Cup a 1, Lyc e 2 y Api g 5 poseen epítipes de carbohidratos, los cuales parecen ser importantes en casos de alergia al cedro, al tomate y al apio, respectivamente. Dichos

epítopes inducen la degranulación de basófilos, por lo que podrían jugar un papel en el desarrollo de síntomas clínicos. Los alergenicos recombinantes producidos en sistemas de expresión procariotas carecen de los epítopes de carbohidrato, por lo que no serían los reactivos apropiados para el diagnóstico de alergia a los alergenicos mencionados. Se necesitan más estudios para establecer la verdadera importancia de los epítopes de carbohidratos en las manifestaciones clínicas de las alergias.

**Palabras claves:** alergenicos, alergia, epítopes, IgE, alergenicos recombinantes.

## INTRODUCCIÓN

A principios de los años 80, se reportó por primera vez, que los anticuerpos IgE en el suero de pacientes alérgicos podrían estar dirigidos contra determinantes de carbohidratos presentes en las glicoproteínas (1). Estos determinantes se han descrito en varias fuentes de alergenicos de origen vegetal y en invertebrados (1-20). En algunos casos los anticuerpos IgE dirigidos contra los carbohidratos presentes en alergenicos dan lugar a reacciones cruzadas inesperadas entre organismos no relacionados que poseen determinantes de carbohidratos similares (1,11-20), por lo que han sido denominados determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada ("Cross-reactive Carbohydrates Determinants" - CCDs).

Los CCDs parecen ser los responsables de resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico de alergias mediante la cuantificación de niveles de IgE en el suero (RAST y ELISA), que no se acompañan con manifestaciones clínicas, por lo cual el diagnóstico de las alergias puede afectarse de manera significativa, cuando intervienen alergenicos que contienen estos determinantes (17,18,20).

Los alérgenos recombinantes se proponen actualmente como alternativas al uso de extractos alérgicos naturales en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas (21, 22). La mayoría de los alérgenos recombinantes se han obtenido utilizando sistemas de expresión procariótico (23), como la *E. coli*, estos sistemas no realizan la glicosilación de aquellas proteínas que en su forma natural se encuentran glicosiladas. De tal manera que si existen epítopes que comprometen o están constituidos por carbohidratos, la utilidad de los recombinantes obtenidos por esta vía pudiera estar afectada de manera importante. Por lo anterior, un mejor entendimiento de la naturaleza de estos epítopes, así como su impacto sobre el grado de alérgenicidad de moléculas nativas o recombinantes, reviste especial interés en el campo de la alergología y la biotecnología de alérgenos.

## **NATURALEZA DE LOS EPÍTOPES DE CARBOHIDRATOS**

La mayoría de las proteínas producidas por eucariotas, a diferencia de las proteínas producidas por los procariotas, están glicosiladas como resultado de las modificaciones de postraducción realizadas durante el paso a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Los carbohidratos unidos a las proteínas se clasifican en dos grupos: a) ligados a oxígeno (O-glicosilación), cuando la unión del carbohidrato se produce en el oxígeno del grupo hidroxilo de los aminoácidos serina, treonina e hidroxiprolina y b) ligados a nitrógeno (N-glicosilación) cuando la unión se da en el átomo de nitrógeno del grupo amino de la asparagina, siendo éste grupo el más común entre las proteínas (24). Existe una secuencia consenso para la N-glicosilación caracterizada por: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X, es cualquier aminoácido excepto prolina. Aunque existen algunos reportes de la existencia de secuencias consenso también para la O-glicosilación, éstas secuencias están menos definidas.

La N-glicosilación de la mayoría de las proteínas se inicia por la transferencia de un precursor del oligosacárido  $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , constituido por tres glucosas, nueve manosas, y dos moléculas de N-acetilglucosamina en el retículo endoplásmico, el cual es posteriormente modificado durante el transporte de la glicoproteína a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, por enzimas como glicosilasas y glicosiltransferasas, entre otras (24). Las glicoproteínas de origen vegetal, así como las de origen invertebrado, tienen carbohidratos complejos que presentan residuos del tipo  $\alpha(1,3)$ -fucosa unidos al residuo de glucosamina más próximo y/o residuos  $\beta(1,2)$ -xilosa unidos a la  $\beta$ -manosa. Estos residuos de fucosa y xilosa son típicos en carbohidratos complejos de plantas e invertebrados y no se encuentran en mamíferos, haciéndolos altamente inmunogénicos.

Kurosca y col (25), reportaron que la inmunización de cabras con la glicoproteína HRP (peroxidasa del rábano) indujo la producción de anticuerpos específicos contra los residuos  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa. Recientemente, Bardor y col (26), hallaron que en ratones C57CL/6 y en ratas inmunizadas con HRP se indujo la producción de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgM contra residuos  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa, los cuales reaccionaron con la fosfolipasa A2 y la hemocianina, proteínas que portan un residuo  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa respectivamente. Además, demostraron que en 53 individuos no alérgicos, el 53% contenían anticuerpos específicos contra el residuo  $\alpha(1,3)$ -fucosa y el 25% tenían anticuerpos contra el residuo  $\beta(1,2)$ -xilosa.

Utilizando métodos como: la eliminación (desglicosilación) de los residuos de azúcares (química o enzimáticamente); la utilización de anticuerpos o antisueros que reaccionan específicamente contra residuos  $\alpha(1,3)$ -fucosa y

$\beta(1,2)$ -xilosa, en glicoproteínas como la HRP y la bromelaina; ensayos de inhibición de la unión de IgE al alérgeno con glicopeptidos de bromelaina y el análisis por medio de resonancia magnética nuclear RMN y espectrometría de masa (MALDI-TOF), del carbohidrato liberado de la estructura proteica, se ha podido analizar la contribución de los residuos de carbohidratos en la actividad antigénica de algunas proteínas, así como también, caracterizar más detalladamente la estructura de los N-carbohidratos de glicoproteínas alérgicas, a los cuales se une la IgE.

Tretter y col (2), por medio de ensayos de inhibición de la unión de la IgE de pacientes alérgicos a la fosfolipasa A2 (PLA2), utilizando glicopeptidos de bromelaina, hallaron que el residuo (1,3)-fucosa unido al residuo N-acetilglucosamina más interno en la N-glicoproteína PLA2, forma un epítipo de unión a la IgE. Kubelka y col, en estudios posteriores, utilizando el análisis de RMN, determinaron la estructura primaria del determinante de carbohidrato presente en el alérgeno PLA2 (3). EL determinante de carbohidrato en PLA2, está conformado por un núcleo con dos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y una manosa, aunque puede ramificarse por la adición de dos residuos de manosa. Además, el núcleo también posee un residuo de  $\alpha(1,3)$ -fucosa unida al residuo GlcNAc más interno, el cual participa directamente en la unión a los anticuerpos IgE.

Van Ree y col (5), determinaron la estructura primaria de los N-carbohidratos presentes en los alérgenos mayores de los pólenes; Ole e 1 y Lol p 11 y el alérgeno mayor del maní; Ara h 1 (Fig 1). Los carbohidratos en Ole e 1 y Lol p 11 contienen, además del residuo  $\alpha(1,3)$  fucosa encontrado en PLA2, el residuo  $\beta(1,2)$  xilosa unido al núcleo de manosa, mientras que Ara h 1 contiene solo el residuo  $\beta(1,2)$  xilosa. Además, mediante ensayos de RAST, utilizando las proteínas desglicosiladas o defucosiladas, demostraron que estos residuos participan en la unión a la IgE. Sin embargo, sugirieron que

también otros factores podrían estar involucrados en la unión a la IgE. Estos epítopes también se han detectado en otros alérgenos, algunos alérgenos portan ambos epítopes, mientras que otros portan solo uno (Tabla 1).

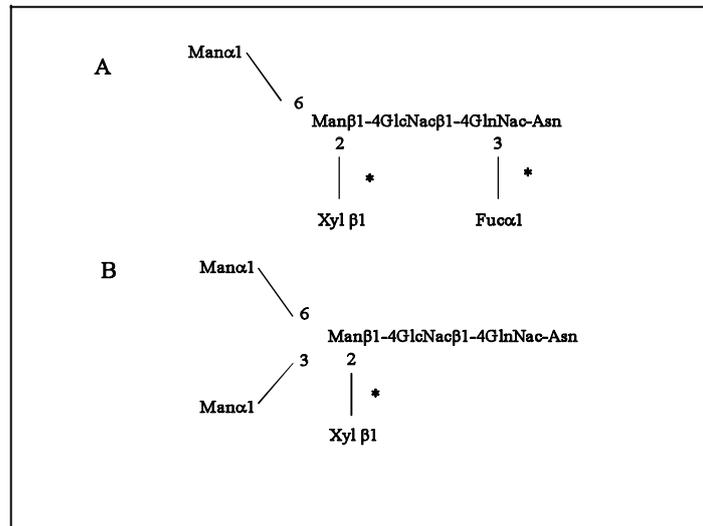


Figura 1. Estructura de N-carbohidratos aislados de los alérgenos Lol p 11 (A) y Ara h 1 (B). \* Residuos  $\beta$ (1,2) - xilosa y  $\alpha$ (1,3) – fucosa, epítopes de unión a la IgE. Tomado de Van Ree y col, 2000.

El epítope de Lewis<sup>a</sup>, Gal $\beta$ (1,3)Fucosa $\alpha$ (1,4)GlcNac, también se ha encontrado en N-carbohidratos de alérgenos de origen vegetal, sin embargo no ha sido asociado al reconocimiento por anticuerpos IgE. Los estudios en que se ha usado neoglicopéptidos (un conjugado de BSA y los motivos de Lewis<sup>a</sup>) y ensayos de RAST indican que este epítope no participan en la reactividad con la IgE (5).

**Tabla 1. Alergenos con epítopes de carbohidrato de unión a IgE**

Alergeno	Fuente del alergeno	Residuos en el N-carbohidrato		Referencia
		$\alpha$ (1,3)- fucosa	$\beta$ (1,2)-xilosa	
PLA2	<i>Apis mellifera</i>	+	-	2,3
Ole e 1	<i>Olea europea</i>	+	+	5
Lol p 11	<i>Lolium Perenne</i>	+	+	5
Ara h 1	<i>Arachis hipogaea</i>	-	+	5
Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>	+	+	7
Pla l 1	<i>Plantago lanceolata</i>	+	¿	8
Lyc e 2	<i>Lycopersicum esculentum</i>	+	+	9
Api g 5	<i>Apium graveolens</i>	+	+	10

### IMPLICACIONES SOBRE LA REACTIVIDAD CRUZADA

La reactividad cruzada está dada por la presencia de determinantes antigénicos comunes o estructuras similares en las proteínas comprometidas en dicha reactividad. La reactividad cruzada entre alergenos trabaja usualmente pero no siempre, “de acuerdo a una regla”: en términos generales, la reactividad cruzada refleja la relación filogenética entre organismos (27). Proteínas originadas en organismo filogenéticamente cercanos presentan un grado alto de identidad entre sus secuencias de aminoácidos, lo cual a su vez puede resultar en un alto grado de homología en la estructura. No obstante, en las últimas décadas se han reportado casos de reacciones cruzadas entre organismos filogenéticamente distanciados. Estos casos de reactividad cruzada han sido asociados a epítopes proteicos y de carbohidratos (27).

Los residuos  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa están ampliamente distribuidos en glicoproteínas de origen vegetal y en invertebrados, como resultado de esto, los anticuerpos IgE producidos contra éstas estructuras pueden reaccionar con diferentes fuentes alergénicas que contengan este patrón de glicosilación, dando origen a reacciones cruzadas entre diferentes fuentes de alérgenos poco o nada relacionadas (1,4,11,12,13, 17,18,20). Aalberse y col (1), realizaron el primer reporte señalando la participación de los carbohidratos en fenómenos de alergenicidad cruzada. En dicho reporte, los anticuerpos IgE en el suero de pacientes alérgicos al polen y al veneno de abeja reaccionaron con un amplio número de alimentos no relacionados (papa, espinaca, trigo, maní, miel entre otros), al polen y al veneno de la abeja. Al tratar los extractos de alimento con ácido periódico, se abolió la reactividad de la IgE a estos extractos, por lo que se concluyó que las estructuras responsables de la reactividad cruzada no eran de naturaleza proteicas si no que eran carbohidratos y los denominaron determinantes de carbohidrato de reactividad cruzada (CCDs).

Batanero y col (12) demostraron que el antisuero de conejo contra Ole e 1 y la IgE de pacientes alérgicos al polen de olivo reaccionaban contra la bromelaína y la HRP, glicoproteínas no relacionadas que contienen los residuos  $\alpha(1-3)$ -fucosa y/o  $\beta(1,2)$ -xilosa). La unión de la IgE y del antisuero fue eliminada por la desglicosilación de la bromelaína y la HRP. Petersen y col (13), hallaron que el suero de pacientes alérgicos al polen del pasto *Timoth y grass*, reaccionó con un amplio rango de proteínas en el extracto de tomate, y mediante oxidación del extracto de tomate con ácido periódico e inmunobloting, comprobaron que la reactividad era causada por la presencia de glicoproteínas que contenían residuos de fucosa.

Van Ree y col, (14) analizaron las estructuras envueltas en la reactividad cruzada entre polenes de malezas (*L. perenne* y *B. verrucosa*) y frutas de la familia rosaceae (durazno, pera y manzana), y por medio de ensayos de inhibición de RAST, hallaron que en la mayoría de los casos la reactividad cruzada entre polenes de maleza y frutas se debía a dos estructuras: profilinas y CCDs. Reindl y col (15), demostraron que la unión de la IgE de alérgicos al pepino, al extracto de pepino era fuertemente inhibida por extractos de latex, polen de abedul, hierba y maleza. En ensayos de inhibición, utilizando como inhibidor glicopeptidos de la bromelaina, detectaron que gran cantidad de IgE de alérgicos a pepino estaba dirigida contra epítopes de carbohidrato, lo cual contribuía a la reacción cruzada entre pepino y extractos de plantas. En un estudio posterior, este mismo grupo obtuvo resultados similares en casos de reactividad cruzada entre el Kaki (persimmon) y extractos de latex, polen de abedul, hierba y maleza(16).

Van Der Veen y col (17) reportaron, que un grupo de pacientes alérgicos al polen de *Loium perenne*, también presentó RAST positivo al maní debido a anticuerpos IgE dirigidos contra CCDs. Mari y col (18), hallaron que un paciente alérgico a *Loium perenne* y a *Parietaria judaica*, mostro resultados positivos en ensayos in vitro, frente a glicoproteínas y diversos extractos alérgicos de plantas. Por medio de la desglucosilación de las proteínas y extractos alérgicos, determinaron que gran parte de la reactividad cruzada era ocasionada por CCDs. Iacovacci y col (19), produjeron y caracterizaron un anticuerpo monoclonal que reconoce epítopes de carbohidratos en el extracto de polen de cedro. Por medio ensayos de ELISA, hallaron que el anticuerpo monoclonal reaccionó ante 19 extractos alérgicos de especies no relacionadas, sugiriendo que el epítope de carbohidrato esta presente en un amplio numero de extractos. Mari (20), en un análisis de distribución de IgE contra determinantes de carbohidratos, halló un alto grado de prevalencia de anticuerpos IgE contra epítopes de carbohidrato en pacientes

alérgicos a polen, dicha prevalencia incremento entre pacientes alérgicos a mas de un polen. Además, reporto una alta correlación entre el grupo de pacientes con anticuerpos IgE contra CCDs y la reactividad a diversos extractos alergénicos derivados de plantas.

Los anticuerpos IgE específicos contra carbohidratos se han encontrado con mayor frecuencia en el suero de pacientes alérgicos al polen y al veneno de la abeja (1, 11, 18, 20 ). Estos anticuerpos pueden reaccionar con un rango amplio de alergenos de pólenes, de alimentos de origen vegetal y de invertebrados.

### **IMPACTO CLINICO DE LOS CCDs**

La relevancia clínica (papel en el desarrollo de síntomas clínicos) de los anticuerpos IgE contra carbohidratos es hasta el momento, un asunto de bastante controversia. Varios grupos de investigación se han basado en resultados obtenidos en estudios de reactividad cruzada para afirmar que los anticuerpos IgE contra CCDs no tienen relevancia clínica. Van Der Veen y col (17) reportaron en 1997, que un grupo de pacientes alérgicos al polen de *Lolium perenne*, también presentó RAST positivo al maní debido a anticuerpos IgE dirigidos contra CCDs. No obstante, los pacientes no presentaron alergia al maní, y mostraron resultados negativos en pruebas cutáneas y en ensayos de liberación de histamina *in vitro*.

Mari y col (18), también reportaron que un paciente alérgico al polen presento reacción cruzada *in vitro*, frente a glicoproteínas y varios extractos derivados de plantas, debido anticuerpos IgE contra CCDs, sin embargo, el paciente no presento resultados positivos ante ninguno de los extractos en la prueba cutánea. Posteriormente Mari A. (20), halló que muchos de los pacientes con anticuerpos IgE contra CCDs, que reaccionan con diferentes

extractos alergénicos, presentaron resultados negativos en prueba cutánea frente a los mismos extractos. La ausencia de alergia clínica al polen y/o alimento en estos casos ha sido explicada por la pobre actividad biológica (pobre capacidad de inducir la degranulación de mastocitos y eosinófilos) de los anticuerpos IgE contra determinantes de carbohidrato, tanto en prueba cutánea como en pruebas de liberación de histamina *in vitro*.

No obstante, últimamente, en varios estudios se ha descrito que los anticuerpos IgE contra CCDs tienen capacidad de inducir la degranulación de los mastocitos y eosinófilos en ensayos de liberación de histamina *in vitro*. Mediante la utilización de basófilos sensibilizados pasivamente con sueros de pacientes alérgicos al polen de cedro, se demostró que la molécula nativa nCup a 1 fue capaz de inducir una fuerte liberación de histamina solo en aquellos basófilos sensibilizados pasivamente con los sueros que poseían exclusivamente anticuerpos IgE específicos contra los CCDs presentes en nCup a 1 (28). Estos resultados apoyan la hipótesis de la posible actividad biológica de los anticuerpos IgE específicos contra CCDs en la alergia al cedro. Por otra parte, Föetisch y col (29), hallaron que aproximadamente un tercio (3/12) de los sueros de pacientes alérgicos al tomate, tenían anticuerpos IgE específicos a CCDs. Estos anticuerpos mostraron la capacidad de inducir la liberación de histamina en basófilos estimulados con la forma glicosilada del alérgeno del tomate Lyc e 2, o con la glicoproteína HRP. Sin embargo, cuando los basófilos fueron estimulados con la forma recombinante no glicosilada de Lyc e 2 no se produjo la liberación de histamina. Estos resultados indican que los anticuerpos IgE contra CCDs podrían estar causando sensibilizaciones con relevancia clínica y señalan la necesidad de realizar investigaciones detalladas sobre casos individuales. Recientemente, se ha descrito que el alérgeno Api g 5, es capaz de inducir la liberación de histamina desde basófilos de alérgicos a maleza y a apio, solo en su forma nativa, pero no en su forma desglicosilada.

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

## **IMPLICACION DE LOS CCDs EN EL DIAGNOSTICO DE ALERGIAS**

Con frecuencia se observan resultados falsos positivos en pruebas de diagnóstico *in vitro* de alergia al polen y a los alimentos. Los anticuerpos IgE específicos contra carbohidratos pueden explicar en gran parte la producción de estos resultados falsos positivos y la poca eficacia de las pruebas diagnósticas *in vitro*. Van der Veen y col (17), mostraron que cerca del 20% de personas alérgicas a polen de pasto presentaron resultados falsos positivos en pruebas *in vitro* de alergia al maní debido a la presencia de anticuerpos IgE contra CCDs.

Por otro lado, Mari y col (18), describieron un caso especial de resultados falsos positivos en ensayos *In vitro*, frente diversas clases de polen y glicoproteínas, causados por anticuerpos IgE dirigidos contra CCDs. Estos hallazgos demuestran que las reacciones cruzadas provocadas por IgE contra carbohidratos constituyen un factor importante para la producción de falsos positivos en pruebas de diagnóstico para las alergias al polen y los alimentos. También explica parcialmente la poca eficacia del diagnóstico *in vitro* en estos casos.

## EFFECTO DE LOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN SOBRE LA PRESENCIA DE EPITOPES DE CARBOHIDRATOS EN LOS ALERGENOS RECOMBINANTES

Los alergenicos recombinantes se han señalado como un reemplazo ventajoso de los extractos alérgicos nativos para el diagnóstico y tratamiento de las alergias (21,22). Para la obtención de los recombinantes se han utilizado sistemas procarióticos, principalmente la bacteria *E. coli*, y sistemas eucarióticos como las levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), células de insecto y plantas (23). Dependiendo del sistema escogido los alergenicos pueden presentar modificaciones postraducción como: glicosilación, formación de puentes disulfuro y adición de lípidos (23). Generalmente las modificaciones postraducción, entre ellas la glicosilación, son necesarias para el plegamiento correcto, la función biológica y la alergenidad de ciertas proteínas (22,23). En esto, radica también el interés en evaluar la importancia de los epítipes de carbohidratos sobre la actividad de los alergenicos.

El sistema de expresión procariótico, *E. coli*, es de fácil manipulación, su mantenimiento es de bajo costo y es altamente productivo, razones por las que se ha usado con frecuencia para la expresión de alergenicos recombinantes. Este sistema no realiza la glicosilación de las proteínas, hecho que puede impedir obtener un correcto plegamiento de la proteína. En el caso de que el plegamiento correcto sea alcanzado, los alergenicos obtenidos por medio de este sistema, podrían ser utilizados en reemplazo del alérgeno nativo, en pruebas diagnosticas, cuando los epítipes de carbohidrato no tengan relevancia clínica. Mediante ensayos de liberación de histamina de basófilos y pruebas cutáneas se ha demostrado que la proteína nativa, nPLA2, y la proteína expresada en *E. coli* tienen una reactividad similar (30,31), hallazgos que indican que los epítipes de

carbohidrato en este alérgeno son de poca relevancia para su actividad inmunológica.

No obstante, el sistema de expresión procariótico no sería el más apropiado para expresar alérgenos en los que los determinantes de carbohidrato son indispensables para su reconocimiento y actividad biológica. Iacovacci y col (28), al comparar la reactividad entre el alérgeno recombinante rCup a 1 y el nativo nCup a 1 en alérgicos al cedro de Arizona, hallaron que 14/30 de los sueros reaccionan solamente con epítopes de carbohidratos y que la IgE proveniente de esos sueros fue capaz de inducir la liberación de histamina de los basófilos. Sus resultados sugirieron que dichos anticuerpos pueden tener un papel en los síntomas clínicos de alergia.

Por otro lado, Föetisch y col (29), hallaron que el alérgeno recombinante del tomate rLyc e 2 expresado en *E. coli* y por lo tanto carente de los residuos de azúcares, no reaccionó con algunos sueros de alérgicos al tomate en pruebas de ELISA, ni provocó la liberación de histamina de los basófilos, mientras que el alérgeno nativo nLyc e 2 sí reaccionó con todos los sueros de alérgicos al tomate e indujo la liberación de histamina de los basófilos. Este estudio resalta la importancia de escoger un sistema de expresión adecuado para la obtención del recombinante según la naturaleza del alérgeno y que los epítopes de carbohidratos, en algunos pacientes, sí parecen tener una relevancia clínica.

El sistema de expresión eucariótico por su parte, garantiza la producción de las modificaciones postraduccionales (23,32). Los sistemas de expresión eucarióticos basados en levaduras y en células de insecto, han sido utilizados en la última década para la producción de alérgenos recombinantes, obteniéndose proteínas con un plegamiento apropiado, actividad biológica y una reactividad a la IgE similar a la de la proteína nativa

(33,34,35,36). En los últimos años se ha utilizado el sistema de expresión vegetal para producir recombinantes, y se han obtenido recombinantes con un plegamiento apropiado y una reactividad similar a la proteína nativa (37).

Aunque el sistema de expresión basado en levadura, es capaz de producir la glicosilación de las proteínas, por ser organismos eucarióticos inferiores, no adicionan a las proteínas recombinantes, carbohidratos con los residuos fucosa y xilosa (23,32,38). Por esta razón *P. pastoris* y *S. Cerevisiae*, serian una mejor alternativa con respecto a *E. Coli*, para la aplicación de pruebas diagnosticas, cuando las proteínas no tienen determinantes de carbohidrato. El sistema de expresión en células de insecto y el sistema de expresión vegetal, por ser organismos eucarióticos superiores, son capaces de adicionar carbohidratos con los residuos  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa, convirtiéndose en los sistemas mas indicados para expresar alergenos que en su estructura nativa contengan carbohidratos con estos residuos (26, 39).

## CONCLUSIONES

1. Los carbohidratos en algunos alergenos representan sitios para la unión de los anticuerpos tipo IgE. Los residuos de  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa en estos carbohidratos constituyen los epítopes a través de los cuales se realiza la unión de dichos anticuerpos presentes en el suero de pacientes alérgicos.
2. Los anticuerpos IgE contra los CCDs ampliamente distribuidos en glicoproteínas de plantas e invertebrados, originan reacciones cruzadas entre fuentes de alergenos relacionadas y no relacionadas, principalmente entre pólenes y alimentos. Estas reacciones producen falsos positivos en pruebas *in vitro* para el diagnóstico de alergia a alimentos y a pólenes, las cuales no siempre están acompañadas de manifestaciones clínicas.

3. Existen estudios *in vitro* que muestran que los CCDs de algunos alérgenos son capaces de inducir la degranulación de basófilos sensibilizados pasivamente con sueros de pacientes alérgicos al polen o a ciertos alimentos. Por lo tanto, se sugiere que estos epítopes pudieran tener relevancia clínica en estos casos y sería importante tenerlos en cuenta para el diagnóstico de ciertos tipos de alergias.

4. En algunos alérgicos los anticuerpos IgE dirigidos a epítopes de carbohidratos en ciertos alérgenos parecen mediar manifestaciones clínicas. En estos casos los alérgenos recombinantes se deben obtener en un sistema de expresión que garantice su adecuada glicosilación. Por otro lado, para evitar falsos positivos en el diagnóstico de las alergias con alérgenos en los cuales los epítopes de carbohidratos no son relevantes, el remplazo de los alérgenos nativos por recombinantes no glicosilados parece ser lo indicado.

## REFERENCIAS

1. Aalberse R. C, Koshte V, Clemens J. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol.* 1981;68:356-364
2. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, Marz L, and Becker WM. Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;102:259-66.
3. Kubelka V, Altman F, Staudacher E, Tretter V, Marz L, Hard K, et al. Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from Honey bee Venom phospholipase A2. *Eur Journal Biochem.* 1993;213:1193-1204.
4. Faye L, Chrispeid MJ. Common antigenic determinants in the glycoproteins of plants, molluscs and insects. *Glycocon J* 1988; 5:245-256.
5. Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akerdas JP, Milazzo J-P, Looutelier-bourhis C, Rayon C, et al.  $\beta(1,2)$ -xylose and  $\alpha(1,3)$ -fucose residues have a

strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. J Biol Chem 2000; 275:11451-8.

6. Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Di Felice G, Tinghino R, Mari A and Pini C. Role of carbohydrate moieties in IgE binding to allergenic components of *Cupressus arizonica* pollen extract. Clin Exp Allergy 1999;29:1087-94.

7. Alissi C, Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Tinghino R, Butteroni C, et al. Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of arizona Cypres (*Cupressus arizonica*) polen. Allergy 2001; 56:978-984.

8. Calabozo B, Barber D, Polo F. studies on the carbohydrate moiety of Pla I 1 allergen. Identification of a major N-glycan and significance for the immunoglobulin IgE-binding activity. Clin Exp Allergy. 2002;32:1628.

9. Westphal S, Kolarich D, Föetisch K, Lauer I, Altmann F, Conti A, et al. Molecular Characterization and allergenic activity of Lyc e 2 ( $\beta$ -fructofuranoside), a glycosylated allergen of tomato. Eur J Biochem.2003;270:1327-1337

10. Bublin M, Radauer C, Wilson IB, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H. et al. Cross-reactive N-glycan of Api g 5, a high molecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients FASEB J. 2003;17:1697-1699.

11. Aalberse R.C and Van Ree R. Cross-reactive carbohydrate determinants. Clin Rev Allergy Immunol. 1997;15:375-387

12. Batanero E, Villalba M, Monsalve R and Rodriguez R. Cross-reactivity between the mayor allergen from olive pollen and unrelated glicoprotein: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. J Allergy Clin Immunol. 1996; 97:1264-71

13. Petersen A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak M, and Becker W-M, Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergen. J Allergy Clin Immunol 1996; 98:805-15

14. Van Ree R, Fernandez-Rivas M, Cuevas M, Van Wijngaarden M, and Aalberse R. C. Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. J Allergy Clin Immunol. 1995;95:726-34.

15. Reindl J, Anliker M.D, Karamloo F, Vieths S and Wüthrich B. Allergy caused by ingestion of Zucchini (*Cucurbita pepo*): Characterization of

allergens and cross-reactive to pollen and others foods. J Allergy Clin Immunol. 200;106:379-85.

16. Anliker M.D, Reindl J, Vieths S, and Wüthrich B. Allergy caused by ingestion of persimon (*Diospyros kaki*): detection of specific IgE and cross-reactivity to profilin and carbohydrate determinants. J Allergy Clin Immunol. 2000; 107:718-23.

17. Van der Veen M, Van Ree R, Aalberse R.C, Akkerdaas J, Koppelman S, Jansen H, et al. Poor biologic activity of cross-reactive directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J Allergy Clin Immunol 1997;100:327-34.

18. Mari A, Iacovacci P, Aferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G, et al. Specific to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. J Alergy Clin Immunol. 1999;103:1005-1011.

19. Iacovacci P, Pini C, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Schinia E, et al. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant Shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. Clin Exp Allergy 2001;31: 458-465.

20. Mari A. IgE to Cross-reactive carbohydrate determinants analysis of distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. Int Arch Allergy Immunol. 2002;129:286-295

21. Valenta R, Lidhol J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of componet-resolved diagnostic and immunotherapy (CRD and CRIT). Clin Exp Allergy. 1999;29:896-904

22. Chapman M, Smith A, Vailes L, Arruda L, Dhanaraj V, Pomes A, Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000;106:409-418

23. Schmidt M, Hoffman D. Expression systems for production of Recombinants Allergens. Int Arch Allergy Immunol. 2002;28:264-270

24. Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Raff M, Watson J. Molecular Biology of the Cell. Garland publishing, Inc. New York 1994 Pags 589-591, 604-609

25. Kurosaka A, Yano A, Itho N, Kuroba Y, Nakagawa T, Kawasaji T. The structure of neutral specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase

recognized by antihorseradish peroxidase antiserum. J Biol Chem 1991;166:4168-72

26. Bardor M, Faveeuw C, Fitchette A-C, Gilbert D, Galas L, Trottein F, et al. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core  $\alpha$  (1,3)-fucosa and core  $\beta$ (1,2)-xilosa. Glicobiology. 2003; 13: 427-434

27. Aalberse R.C, Akkerdaas, Van Ree R. Cross-reactivity of the antibodies IgE to allergens. Allergy. 2001;56 478-490

28. Iacovacci P, Afferni, C. Butteroni C, Pironi L, Puggioni E.M, Orlandi A, et al. Comparison between the native Glycosylated and the recombinant Cup a 1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. Clin Exp Allergy. 2002;32:1620-1627.

29. Föetisch K, Westpal S, Laurier I, Mechthild R, Altmann F, Kolarich D, et al. Biological activity of the IgE especific for cross- reactive carbohydrate determinant. J Allergy Clin immunol 2003;111:889-96.

30. Müller UR, Dudler T, Schneider T, et al. Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A<sub>2</sub> from Honeybee Venom is similar. J Allergy Clin Immunol 1995; 96:395-402

31. Müller U, Fricker M, Wymann D, Blaser K, Cramer R. Increased specificity of diagnostics test with the recombinant major bee venon allergen phospholipase A<sub>2</sub>. Clin Exp Allergy 1997; 27:915-20.

32. Cregg JM. Expresion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in: Fenedez JM, Hoefler JP, eds. Gene expression system. 1<sup>st</sup> ed. San Diego California Academic Press 1999:158-191

33. Smith P, Suphioglu C, Griffith I. J, Theriault K, Knox R.B, Singh M. B. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. J Allergy Clin Immunol. 1996;98:331-343

34. Chua KY, Kchal PK,Thomas WR, Vaughan PR; Macreadie IG. High-frekuensi binding of IgE to Der P1 allergen expressed in yeast. J Allergy Clin Immunol. 1992;89:95-102

35. Soldatova L, Cramer R, Gmachl M, Kemeny D, Shmidt, Weber M, et al. Superior biologic activity of the recombinat bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. J Allergy Clin Immunol. 1998;101:691-698

36. Schmidt M, McConnell T, Hoffman R. Production of a recombinant imported fire ant venom allergen, Sol i 2, in native and immunoreactive form. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:82-88
37. Krebitz M, Wiedermann U, Essl D, Steinkellner H, Wagner B, Turpen T, et al. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological *in vitro* and *in vivo* characterization. *FASEB J.* 2000;14:1279 -1288.
38. Van Ree R. Carbohydrate and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129:189-197
39. Altman F, Staudacher E, Wilson IBH, März L. Insect cells for the expression of recombinants glicoproteins. *Glycoconj J.* 1999;16:109-123.

# ANEXOS

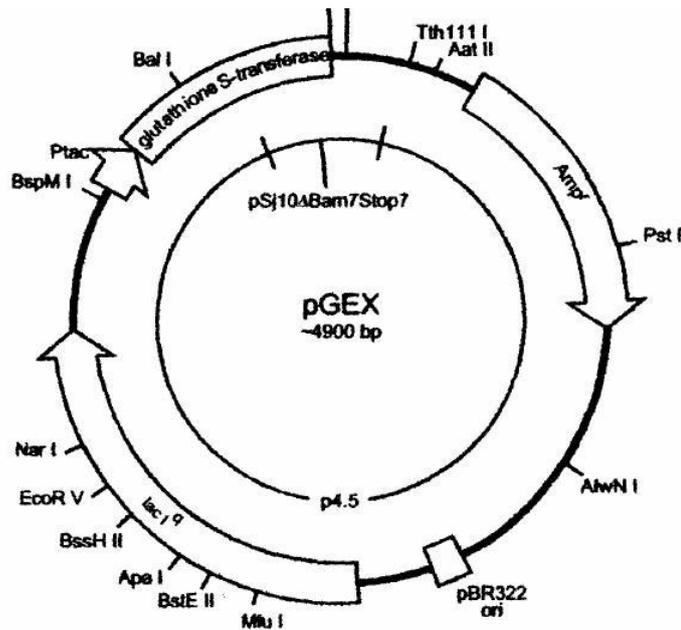


Fig 1. Diagrama del plásmido pGEX, mostrando sus características principales. Tomado de GST Gene Fusion System. Handbook. 18-1152-69. Amersham biosciences

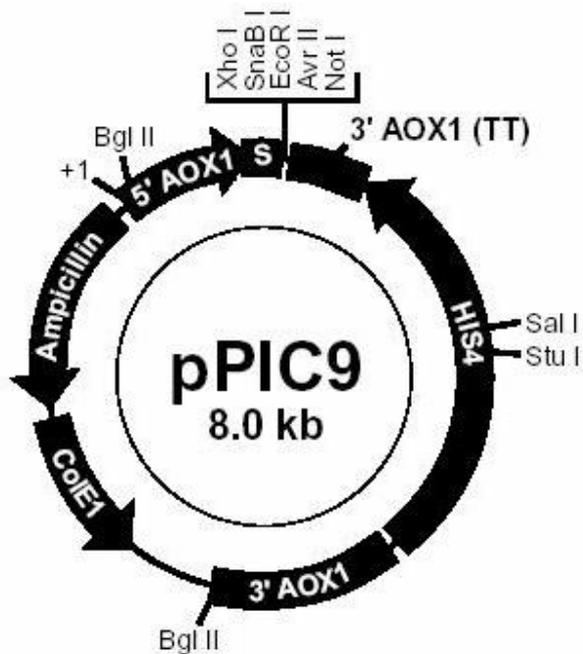


Fig 2. Diagrama del plásmido pPIC9, mostrando sus características principales. Tomado de Pichia Expression Kit. Invitrogen. 1998

## **CURSO DE INMUNOLOGÍA BÁSICA**

Durante el primer mes de la pasantía, asistí al curso teórico de inmunología, que fue impartido por el cuerpo de docentes investigadores del I.I.I

En el curso se desarrollo el siguiente contenido:

- Antígenos y alergenos
- Sistema HLA y procesamiento de antígenos
- Aspectos moleculares y funcionales de los anticuerpos
- Receptores y activación de los linfocitos T
- Moléculas de adhesión y tráfico celular
- Respuesta inmune innata (1ª parte)
- Respuesta inmune innata (2ª parte)
- Citoquinas y quimoquinas
- Respuesta inmune efectora
- Inmunidad frente a tumores
- Transplantes
- Autoinmunidad
- Inmunodeficiencias
- La respuesta alérgica

## **CLUBES DE REVISTA**

Durante la pasantía participe semanalmente en un club de revista y presente dos, uno en cada semestre. En los club de revista un investigador o estudiante presentó ante todos los pertenecientes al instituto, un articulo científico actualizado que todos previamente habían leído y analizado, referente a un tema de interés en el área de la inmunología, alergología o biotecnología de alergenos. Estos artículos posteriormente eran discutidos y debatidos en plenaria.

- Febrero 11 del 2003. Wentworth Jr. P, et al. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science* 2002; 298:2195-2199. Presentado por Franklin Torres, BT. Estudiante de maestría en el I.I.I.
- Febrero 25 del 2003. Wakabayashi C, et al. A Distinct Signaling Pathway Used by the IgG-Containing B Cell Antigen Receptor. *Science* 2002; 298:2392-2395. Presentado por Kelly Barrios, BT. Estudiante de maestría en el I.I.I.
- Marzo 3 del 2003. Mora C, et al. Cloning and Expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. *Clinical and Experimental Allergy* 2002; 32:1-7. Presentado por Silvia Jiménez, LB. Investigadora del I.I.I.
- Marzo 18 del 2003. Hori S, et al. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Fox p3*. *Science* 2003; 299:1057-1061. Presentado por Melba Muñoz, MD. Egresada de la universidad de Cartagena.
- Abril 01 de 2003. Pastorello E, et al. Identification of Grape and Wine Allergens as a Endochitinase 4, a Lipid-Transfer Protein, and a Thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 11:350-359. Presentado Por Vivían Villalba. Estudiante de medicina de la universidad de Cartagena.
- Abril 8 del 2003. Rihs H.-P, et al. Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (r Hev b 11.0102). *Allergy* 2003; 58:246-251. Presentado Por Dilia Mercado, QF. Investigadora del I.I.I.
- Abril 15 del 2003. Messaoudi I, et al. Direct link between MHC polymorphism, T cell avidity and diversity in immune defense. *Science* 2002; 298:1797-1800. Presentado por candelaria vergara, M.D. Estudiante de maestría en el I.I.I.

- Abril 22 del 2003. Thomas A. E, et al. The relevance of maternal immune responses to inhaled allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:123-30. **Presentado por Leonar Arroyo. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología de la universidad de sucre en pasantía en el I.I.I.**
- Abril 29 del 2003. Karisola P, et al. The major conformational epitopes of hevein (Hev b 6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. J Biol Chem. 2002;277:22656-61. Presentado por Ilich de la Hoz. Estudiante de medicina de la universidad de Cartagena.
- Mayo 2 del 2003. Diaz-Perales A, et al. Recombinant Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunological reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:628-33. Presentado por Javier Marrugo, MD, MsC. Docente investigador del I.I.I.
- Mayo 13 del 2003. Kruse S, et al. Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:117-22. Presentado por María Angélica Trespalacio. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología.
- Mayo 20 del 2003. Duetsch G, et al. STAT-6 as an asthma candidate gene: polymorphisms- screening association and haplotype analysis in a caucasian sib-pair study. Human molecular Genetics 2002;11:613-21. Presentado por Beatris Martinez. BT. MsC. Docente investigadora del I.I.I.
- Mayo 27 del 2003. Simpsom A, et al. Skin test reactivity and recombinant and dermatophagoides Spp. allergen among mite allergic patients in the UK. Allergy. 2003;58:53-56. Presentado por Dalgys martinez. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología de la universidad de sucre.
- Junio 3 del 2003. Stumvoll S, et al. Identification of cross-reactive and genuine parietaria judaica pollens allergens. J Allergy Clin Immunol.

2003;111:974-9. Presentado por Leonardo Puerta Q.F, PhD. Docente investigador del I.I.I

- Junio 10 del 2003. Ricci G, et al. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia uniCAP and ADVIA centaur, for diagnosis of allergic diseases in childrens. Allergy 2003; 58:38-45. Presentado por Maricela Mendoza L. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología de universidad de sucre en pasantía en el I.I.I.
- Junio 17 del 2003. Rodriguez perez R, et al. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. J allergy clin Immunol.2003;111:634-9. Presentado por Luz Hernández. Odontóloga. Investigadora del I.I.I
- Junio 24 del 2003. Ramos J. D, et al. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* paramyosin (Blo t 11). Allergy. 2003;58:412-419. Presentado por Franklin Torres, BT. Estudiante en maestría en el I.I.I.
- Julio 01 del 2003. Morafo F, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Th2-Th1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. 2003;111:1122-8. Presentado por Nacira. Estudiante de química de la Universidad de Cartagena.
- Julio 08 del 2003. Zhang Y, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. Nature Genetics 2003;34:181-186. Presentado por Luis Caraballo, MD, PhD. Docente investigador del I.I.I.
- Julio 15 del 2003. Autoevaluación de los clubes de revista.
- Julio 29 del 2003. Iacovacci P, et al. Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a 1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. Clin Exp Allergy 2002;32:1620-27. **Presentado por Leonar Arroyo. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología de la universidad de Sucre en pasantía en el I.I.I.**

- Agosto 5 del 2003. Chakir J, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1293-97. Presentado por Nathaly Acevedo Estudiante de medicina de la universidad de Cartagena.
- Agosto 12 del 2003. Derek C, et al. Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon. The Journal of Biological Chemistry 2003;278: 636-44. Presentado por: María Angélica Trespalacio. Estudiante de biología con énfasis en biotecnología en pasantía en el I.I.I.
- Agosto 19 del 2003. Maleki SJ, et al. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. J Allergy Clin Immunol 2003;112:190-95. Por Franklin Torres, BT. Estudiante de maestría en el I.I.I.
- Agosto 26 del 2003. Yao TC, et al. The RANTES promoter polymorphism: a genetic risk factor for near-fatal asthma in chinese children. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1285-92. Presentado por Beatriz Martínez, BT, MsC. Docente investigador del I.I.I.
- Septiembre 2 del 2003. Schmid-Grendelmeier P, et al. Native Art v1 and recombinant Art v1 are able to induce humoral and T cell-mediated *in vitro* and *in vivo* responses in mugwort allergy. J Allergy Clin immunol 2003;111:1328-36. Presentado por Yulieth Mora. Estudiante de microbiología con énfasis en alimentos de la universidad de Pamplona en pasantía en el I.I.I.
- Septiembre 9 del 2003. Chatel JM, et al. Various factors (allergen nature, mouse strain, CpG/recombinant protein expressed) influence the immune response elicited by genetic immunization. Allergy 2003;58:641-47. Por Leonardo Puerta, QF, PhD. Docente investigador del I.I.I.
- Septiembre 16 del 2003. Jambou F, et al. Circulating regulatory anti-Tcell receptor antibodies in patients with myasthenia gravis. J Clin Invest.

- 2003;112:265-74. Presentado por Dilia. Estudiante de maestría en microbiología de la universidad de Cartagena.
- Septiembre 23 del 2003. Miike Satoshi, et al. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. J Allergy Clin Immunol.2003;111:704 –713. Presentado por Rosa Valdiri. Estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.
  - Septiembre 30 del 2003. Mochizuki A, et al. The release of basogranulin in response to IgE-dependent and independent stimuli: Validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. J Allergy Clin Immunol.2003;112:102-108. Presentado por: Ganivet. Estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.
  - Octubre 7 del 2003. Claeys S, et al. Human *B*-defensins and toll –like receptors in the upper airway. Allergy 2003;58:748-753. Presentado por Mónica Moreno. Estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.
  - Octubre 14 del 2003. Cheong N, et al. Cloning of a group allergen from *Blomia tropicalis* mite. Allergy 2003;58:352-356. Presentado por Maricela Mendoza L. Estudiante de Biología con énfasis en biotecnología de la Universidad de Sucre en pasantía en el I.I.I.
  - Octubre 21 del 2003. Rodriguez-Perez R, et al. Peach profilin Cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet V 2. Allergy 2003;58:635-640. Presentado por Luz Elena Hernandez, investigadora Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena
  - Octubre 28 del 2003. Kuo I C, et al. An extensive study of human Ige cross-reactivity of Blo t 5 aand Der p 5. J Allergy Clin Immunol 2003;111:603-609. Presentado por Dalgys Martinez De la O. Estudiante de Biología de la Universidad de Sucre en pasantía en el I.I.I.
  - Noviembre 4 del 20003. Herranz J C, et al. Identification of Cucumis in (CuC m1), a subtilisin-like endopeptidase, as major allergen of melon fruit.

Clin Exp Allergy 2003;33:827-833. Presentado por: Nacira Perez, estudiante de Química de la U. de Cartagena.

- Noviembre 18 del 2003. Ueda H, et al. Association of the T cell Regulatory genes CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003;423:506-510. Presentado por Kelly Barrios, BT. Estudiante de Maestría en inmunología en el I.I.I.
- Noviembre 25 del 2003. Noguchi E, et al. Insertion/deletion coding polymorphisms in hHAVcr-1 are not associated with atopic asthma in the Japanese population. Genes and Immunity 2003; 4:170-173. Presentado por: Candelaria Vergara, estudiante de Maestría en inmunología en el I.I.I.
- Diciembre 2 del 2003. Weber E, et al. Identification, Characterization, and cloning of complementary Dna encoding a 60-kd house dust mite allergen(Der f 18) for human beings and dogs. J Allergy Clin Immunol.2003;112:79-86. Presentado por Silvia Jiménez, LB. Investigadora del I.I.I
- Diciembre 9 del 2003. Westphal S, et al. Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (*B*- fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. Eur J Biochem. 2003;270:1327-1337. Presentado por Vivian villalba. Estudiante de Medicina de la U. de Cartagena.
- Diciembre 16 2003. Cheong N, et al. Lack of human IgE cross- reactivity between mite allergens Blot 1 and Der p 1. Allergy 2003;58:912-920. Presentado por: Dilia Mercado Q.F, Investigadora del I.I.I.

## **SEMINARIOS**

Durante la pasantía, asistí a seminarios presentados por los estudiantes que adelantan sus estudios de maestría en inmunología en el instituto. En estos seminarios los estudiantes maestría realizaban una exhaustiva revisión bibliográfica sobre un tema de inmunología básica o sobre su línea de investigación (ver anexos).

Los seminarios fueron los siguientes:

- Marzo 31 del 2003. Caracterización y expresión de un gen de un alérgeno del ácaro *Blomia tropicalis*. Proyecto de trabajo de grado del tesista Franklin Torres, BT. Estudiante de Maestría en Inmunología en el I.I.I
- Julio 22 del 2003. Células NK en la respuesta inmune innata y adaptativa. Presentado por Candelaria Vergara, MD. Estudiante de Maestría en Inmunología en el I.I.I.
- Julio 23 del 2003. Regulación de la respuesta inmune. Presentado por Kelly Barrios, BT. Estudiante de Maestría en Inmunología en el I.I.I.
- Octubre 8 del 2003. Aislamiento del segmento de ADN codificador para el alérgeno Blo t 1 a partir de una biblioteca de ADNc del ácaro *Blomia tropicalis*. Sustentación trabajo de grado Franklin Torres, BT. Estudiante de Maestría en Inmunología en el I.I.I.
- Diciembre 17 del 2003. Estrategias de epidemiología genética en enfermedades complejas. Presentado por Candelaria Vergara, M.D. Estudiante de Maestría en inmunología de la U. de Cartagena.
- Diciembre 18 del 2003. Técnicas de genotipificación de marcadores para el estudio de enfermedades complejas. Presentado por Kelly Barrios. BT. Estudiante de Maestría en inmunología de la U. de Cartagena.

### **REVISIÓN DE TEMA**

Aproximadamente en el transcurso de dos meses, realicé el artículo de revisión correspondiente al capítulo II, con la asesoría del investigador Leonardo Puerta, con el cual discutí y debatí aspectos relacionados con el tema de revisión.