

PROTEINAS VEGETALES COMO PANALÉRGENOS ALIMENTARIOS

Gabriel Salcedo y Rosa Sánchez-Monge
Unidad de Bioquímica, Departamento de Biotecnología,
E.T.S. Ingenieros Agrónomos, UPM, Madrid

RESUMEN

La mayoría de los alérgenos alimentarios de origen vegetal identificados hasta el momento son proteínas implicadas en mecanismos de defensa frente a plagas y patógenos, o proteínas de reserva acumuladas en las semillas. Nueve grupos de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs), además de diferentes clases de proteasas e inhibidores de enzimas hidrolíticas, incluyen miembros con actividad alergénica. Entre estas familias, los homólogos de Bet v 1, las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), recientemente propuestas como sistema modelo de alérgenos alimentarios, y diferentes alérgenos con dominios heveina responsables de la alergia a latex y del síndrome latex-frutas, están entre los mejor estudiados. Las proteínas alergénicas con función de reserva pueden agruparse en dos superfamilias: la de prolaminas, que agrupa a la fracción proteica mayoritaria de las harinas de trigo; cebada y centeno, y a las albuminas 2S, y la superfamilia de cupinas, que incluye a germinas, leguminas y vicilinas. Estas últimas constituyen un grupo emergente de potenciales panalérgenos presentes en legumbres, soja y frutos secos.

INTRODUCCIÓN

La identificación, caracterización y purificación de alérgenos alimentarios naturales, así como de sus correspondientes formas recombinantes, es esencial para mejorar los métodos de diagnóstico, y eventualmente de inmunoterapia, de las reacciones de hipersensibilidad asociadas a la ingestión, inhalación o contacto con alimentos¹. Además, puede contribuir a establecer las bases moleculares de la co-sensibilización a diversos alimentos (y pólenes), y de la estabilidad a tratamientos térmicos y de la resistencia a proteasas digestivas de determinadas fuentes alimentarias, así como a racionalizar los protocolos de evaluación de la potencial alergenicidad de alimentos transgénicos^{2,3}.

La mayoría de los alérgenos alimentarios de origen vegetal descritos hasta el momento, pueden encuadrarse en dos grandes grupos, atendiendo a su principal función *in planta* 4,5: 1) proteínas de defensa (incluidas las denominadas proteínas PR o "pathogenesis-related proteins"), implicadas en mecanismos de protección frente a plagas y patógenos; 2) proteínas de reserva, acumuladas principalmente en semillas maduras, y movilizadas durante la germinación como fuente de nitrógeno (aminoácidos) y esqueletos carbonados para el embrión y la nueva plántula en los momentos iniciales de desarrollo. Algunas familias de alérgenos relevantes de alimentos y pólenes, en especial profilinas⁶, no están incluidas en ninguno de estos grupos de proteínas vegetales.

PROTEÍNAS DE DEFENSA COMO ALÉRGENOS

La Tabla I resume los principales grupos de proteínas de defensa implicados en alergias alimentarias^{4,5}. Los datos inmunológicos y clínicos disponibles hasta el momento, así como el número de alérgenos identificados, varía considerablemente entre los diferentes grupos.

TABLA1.
PROTEÍNAS DE DEFENSA COMO ALÉRGENOS

Proteínas PR-1 (16kDa): Cuc m 3

Similitud con grupo 5 venenos insectos

1,3- β -glucanasas (PR-2; 35-45kDa): Hev b 2, Ole e 9

¿Alimentos: plátano, tomate, etc...?

Quitinasas y proteínas con dominio heveína (PR-3, PR-4 y PR-8)

Taumatinas (PR-5; 23kDa):

Mal d 2, Pru av 2, Cap a 1, Act c 2, uva.

Resistentes calor y proteasas (8 S-S)

70-30 % prevalencia (IgE)

Peroxidasas (PR-9; 36kDa)

harinas cereales, tomate

Glicosilación: ¿CCD?

Familia de Bet v 1 (PR-10)

Proteínas de transferencia de lípidos

LTPs (PR-14)

Proteasas

Cistein-proteasas: Act c 1, papaína, bromelaína, Gly m Bd 30k

Serín-proteasas: Cuc m 1

Inhibidores de α -amilasas

harinas cereales, arroz

Asma del panadero e ingestión

Inhibidores de proteasas

Tripsina: Kunitz: soja

Cistein-proteasas: Sola t 3, kiwi '

Otros: Sola t 2 y 4

En lo referente a alergia alimentaria, la información de cuatro de estos grupos, proteínas PR-1, 1,3-(β -glucanasas, peroxidases e inhibidores de proteasas, es muy limitada, aunque su amplia distribución en fuentes vegetales justifica la importancia potencial de los mismos.

Dos familias adicionales, taumatinas e inhibidores de α -amilasas de cereales, y el grupo de proteasas, han sido estudiados con suficiente detalle en algunos alimentos. En el caso de las taumatinas⁷, están bien documentadas como alérgenos de manzana (Mal d 2), kiwi (Act c 2) y cereza (Pru av 2), con porcentajes de IgE específica del 90% al 30% en sueros de diferentes series de pacientes alérgicos a estos frutos. Además, se han identificado alérgenos de pólenes (Cup a 3, Jun a 3) pertenecientes a esta familia. Los inhibidores de α -amilasas heterólogas presentes en harinas de cereales⁸, son proteínas de 12-16 kDa asociadas al asma del panadero y a reacciones de hipersensibilidad causadas por ingestión de las mismas. Homólogos alérgicos se han detectado y caracterizado en arroz y alforfón. Cisteín-(actinidina, Act c 1) y serín-proteasas (cucumisina, Cuc m 1) son alérgenos mayores de kiwi y melón, respectivamente.

Por último, tres grupos entre las proteínas de defensa, son, posiblemente, los caracterizados hasta el momento con mayor amplitud en el contexto de la alergia alimentaria:

Familia de Bet v 19. Proteínas de 18 kDa homólogas a Bet v 1, el alérgeno mayor de polen de abedul, se han localizado en numerosos alimentos: manzana (Mal d 1), cereza (Pru av 1), apio (Api g 1), zanahoria (Dau c 1), soja (Gly m 4), cacahuete (Ara h 8), etc. La mayoría son alérgenos relevantes en Europa Central y del Norte, responsables de co-sensibilización pólenes-alimentos, en general iniciada por Bet v 1. Se trata de proteínas labiles, fácilmente degradadas por enzimas digestivas, y habitualmente asociadas a síntomas locales y leves (síndrome de alergia oral). Sin embargo, algunos miembros de la familia, como Gly m 4, parecen involucrados en reacciones sisiémicas severas por ingestión en determinados pacientes.

Proteínas de transferencia de lípidos (LTPs)¹⁰. En el área mediterránea, virtualmente libre de abedules, el perfil de sensibilización a frutos de Rosaceas, en especial melocotón, es distinto que el anteriormente descrito para las zonas del Centro y Norte de Europa. Los alérgenos principales son polipéptidos de 9 kDa identificados como LTPs en melocotón (Pru p 3; sensibilización en un 70-90% de los pacientes), manzana (Mal d 3) y otras Rosaceas, mientras que pocos pacientes (<10%) presentan IgE específica frente a Bet v 1 o sus homólogos de alimentos. LTPs alergénicas también se han caracterizado en otros frutos (Cit s 3 y Cit 1 3 de cítricos, Vit v 1 de uva), frutos secos (avellana, castaña), hortalizas (lechuga, espárrago, zanahoria), cereales o productos derivados (maíz, trigo, cerveza), latex (Hev b 12) y pólenes (olivo, *Artemisia*, *Parietaria*). Ensayos *in vitro* e *in vivo* con alérgenos purificados han demostrado la presencia de epítopos IgE comunes, responsables de reacciones cruzadas entre diferentes miembros de esta familia de panalérgenos.

Las LTPs son altamente resistentes a enzimas digestivas (jugo gástrico simulado) y tratamientos térmicos, lo que explica que mantengan su actividad alergénica en bebidas y alimentos procesados (zumos, cerveza, mermeladas, etc.). Están, además, asociadas a síntomas sistémicos y severos, provocando hipersensibilidad por ingestión en pacientes no polínicos. Todas estas características justifican la reciente propuesta de considerarlas como modelo de alérgenos alimentarios vegetales, capaces de sensibilizar por vía digestiva. Datos recientes sugieren que también podrían actuar como alérgenos primarios por vía inhalatoria. La producción de formas recombinantes de varias LTPs de frutos, semillas y pólenes puede aportar nuevas herramientas moleculares de diagnóstico, y, eventualmente, de inmunoterapia. La equivalencia bioquímica e inmunológica (similar capacidad de unir IgE, de activar basófilos e inducir la liberación de mediadores) de las formas naturales y recombinantes ha sido confirmada en el caso del alérgeno mayor de melocotón Pru p 3. Datos preliminares sugieren que la modificación, por mutagénesis dirigida, de residuos claves para la unión a IgE, puede conducir en un futuro próximo a la obtención de variantes hipoalergénicas de LTPs presentes en alimentos de alto consumo¹¹.

Dominios heveina y alérgenos¹². La heveina es un polipéptido de 4.7 kDa (43 aminoácidos; 4 puentes disulfuro), con actividad antifúngica, identificado como uno de los alérgenos principales de latex (Hev b 6.02; 80% de prevalencia en pacientes adultos). Dominios N-terminales homólogos a la heveina se han localizado en diferentes tipos de proteínas vegetales implicadas en alergia. Los dos mejor estudiados incluyen: 1) proheveinas de 20 kDa, con un dominio C-terminal de 14 kDa, descritas en látex (Ncv b 0.01, precursor de heveina), rábano (Bra r 2) y tabaco, y 2) quitinasas de clase I y IV, de 32 kDa, con un dominio catalítico C-terminal de 26 kDa.

La hipersensibilidad a frutas, particularmente aguacate, castaña, plátano y kiwi, se ha descrito en un alto porcentaje (30-50%) de pacientes con alergia a latex, lo que ha permitido definir un síndrome latex-frutas. Los alérgenos principales implicados en dicho síndrome se han identificado como quitinasas de clase I en aguacate (Prs a 1), castaña (Cas s 5) y plátano (Mus a 1), y alérgenos homólogos se han detectado en kiwi y judía verde. Además, quitinasas de clase IV (similares en su estructura de dominios a las de clase I) son alérgenos relevantes de uva y polen de cedro japonés.

La presencia de dominios heveina en todas las proteínas alergénicas antes citadas, parece esencial para explicar su capacidad de ligar IgE, así como las reacciones cruzadas (co-sensibilización) entre las mismas. Los alérgenos de aguacate y castaña han sido los más estudiados en este contexto. Los datos disponibles indican que los epítopos IgL: secuenciales más relevantes de estas quitinas, en parte comunes con los de heveina de latex, se localizan en su dominio heveina, aunque también hay epítopos conformacionales en el dominio catalítico. En el caso de Prs a 1, que es fácilmente degradado por jugo gástrico simulado, el dominio heveina permanece inmunológicamente activo después de la digestión, siendo reactivo tanto *In vitro* como *In vivo*.

PROTEÍNAS DE RESERVA COMO ALÉRGENOS

Los grupos mayoritarios de proteínas de reserva en semillas de cereales, legumbres, frutos secos y especias están implicados en alergias alimentarias⁵. Estos grupos pueden clasificarse en dos grandes superfamilias de proteínas, de acuerdo a motivos comunes en su secuencia y/o estructura tridimensional (Tabla 2).

TABLA 2
PROTEÍNAS DE RESERVA COMO ALÉRGENOS

I . SUPERFAMILIA DE PROLAMINAS

Prolaminas (30-70kDa)

trigo, cebada, centeno
Ingestión y asma del panadero
Anafilaxis Inducida por ejercicio: Tri a 19 (ω -5 gliadina)

Albúminas 2S (12-15kDa)

Sin a 1, Bra j 1, Ara h 2, Ber e 1
Jug n 1, Ana o 3, Ric c 1, Ses i 1, girasol, etc...
Cadenas 3-5kDa + 8-10kDa unidas 2 S-S
Resistencia térmica y frente proteasas

II . SUPERFAMILIA DE CUPINAS (barril láminas β)

Germinas (25 kDa)

Cit s 1, pimienta, trigo
Glicosilación: ¿CCD? Deglicosilación: pérdida unión IgE
Cit s 1(n=29): *In vitro* (IgE específica): 72%; *In vivo* (SPT): 12%
Actividad enzimática: oxalato oxidasa, superóxido dismutasa
Proteínas defensa

Vicilinas (globulinas 7S)

Leguminas (globulinas 11S; 20-25kDa + 30-45kDa)

Ara h 3-4, glicininas G1-G2 Ana o 2, Cor a 9, Ber e 2, Fag e 1, etc...
Cadenas 20kDa + 30-40kDa unidas 1 S-S -> Hexámeros 300-450kDa

La superfamilia de prolaminas incluye a las proteínas mayoritarias de harinas de trigo, cebada y centeno y a albúminas 2S de leguminosas, frutos secos y especias. Las primeras están relacionadas con el asma del panadero, reacciones provocadas por ingestión de cereales, y anafilaxis inducida por ejercicio (Tri a 19 de trigo y sus homólogos en centeno y cebada). Las albúminas 2S¹⁴ son alérgenos importantes en cacahuete (Ara h 2), girasol, nuez, anacardo, mostaza (Bra j 1, Sin a 1), ricino, sésamo, etc.

La superfamilia de cupinas¹⁵ agrupa a proteínas tipo-germina, leguminas y vicilinas. Germinas alergénicas se han caracterizado en naranja (Cit s 1), pimienta y trigo, pero la relevancia clínica de la familia y el papel de sus N-oligosacáridos (que parecen responsables de la reactividad *In vitro*) esta aún por determinar. Las leguminas (globulinas 1 1 S),

abundantes en numerosas semillas de dicotiledóneas, son alérgenos relevantes en cacahuete (Ara h 3), soja, frutos secos (nuez del Brasil, anacardo, avellana) y alforfón.

Vicilinas (globulinas 7S). El segundo grupo mayoritario de globulinas de reserva son las vicilinas, proteínas de 50-60 kDa, sin puentes disulfuro, que forman *In planta* trímeros de 150-190 kDa. Las cadenas maduras de vicilina son modificadas posttraduccionalmente, mediante glicosilación y procesamiento proteolítico, de forma muy variable según la especie. Identificadas como alérgenos en frutos secos (Jug r 2 en nuez, Cor a 1 1 en avellana, Ana o 1 en anacardo) y otras semillas (sésamo), han sido ampliamente estudiadas en cacahuete (Ara h 1) y soja (Gly m Bd 60 k), y recientemente en legumbres más consumidas en el área mediterránea y países asiáticos (lenteja16, garbanzo, guisante17).

En leguminosas se han definido dos patrones distintos de consumo y sensibilización. En países anglosajones (USA, Reino Unido) y Japón, cacahuete y soja serían las especies principales, con una mínima significación clínica de las reacciones cruzadas entre ambas. En la zona mediterránea y asiática (p.e. India), lenteja, garbanzo y guisante son las responsables mayoritarias de reacciones alérgicas por ingestión, y los escasos datos publicados sugieren que en estas poblaciones puede haber una amplia reactividad cruzada con significación clínica entre las tres especies. Los alérgenos mayores de lenteja16 (Len c 1) y guisante17 (Pis s 1) son vicilinas de 47 kDa, con una alta identidad de secuencia (90%), una prevalencia (IgE específica) superior al 75% en las series de pacientes analizadas, y una completa reactividad cruzada *In vitro* entre ambas. Además de las cadenas maduras, se han detectado fragmentos reactivos (unión a IgE) derivados de las mismas. Sin embargo, aún queda por dilucidar la reactividad *In vivo* de estos alérgenos, su significación clínica y su papel en la co-sensibilización entre legumbres.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIFT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 896-904.
2. Van Ree R. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 235-240.
3. Taylor SL, Heile SL. Genetically engineered foods: implications for food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 249-252.
4. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36.
5. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-830.
6. Radauer C, Hoffmann-Sommergruber K. Profilins. In: *Plant food allergens* (Mills ENC, Shewry PR, eds). Blackwell Science, Oxford, UK, 2004: pp105-124.
7. Breiteneder H. Thaumatin-like proteins- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 2004; 59: 479-481.
8. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Armentia A, Gomez L, Barber D. The cereal a-amylase/trypsin inhibitor family associated with bakers' asthma and food allergy. In: *Plant food allergens* (Mills ENC, Shewry PR, eds). Blackwell Science, Oxford, UK, 2004: pp 70-86.
9. Hoffmann-Sommergruber K, Radauer C. Bet v 1-homologous allergens. In: *Plant food allergens* (Mills ENC, Shewry PR, eds). Blackwell Science, Oxford, UK, 2004; pp 125-140.
10. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins (LTPs) as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1336-1341.
11. Garcia-Casado G, Pachón LF, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Barber D, Salcedo G. Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 599-605.
12. Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Blanco C, Salcedo G. Latex allergy and plant chitinases. In: *Plant food allergens* (Mills ENC, Shewry PR, eds). Blackwell Science, Oxford, UK, 2004; pp 85-104.

13. Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varcla J, Carrillo T, Salcedo G. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1002-1007.
14. Monsalve RI, Villalba M, Rico M, Shewry PR, Rodriguez R. The 2S albumin proteins. In: *Plant food allergens* (Mills ENC, Shewry PR, eds). Blackwell Science, Oxford, UK, 2004; pp 42-56.
15. Mills ENC, Jenkins J, Marigheto N, Belton PS, Gunning AP, Morris VJ. Allergens of the cupin superfamily. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 925-929.
16. Lopez-Torrejon G, Salcedo G, Martin-Esteban M, Diaz-Perales A, Pascual CY, Sanchez-Monge R. Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1208-1215.
17. Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Pascual CY, Varela J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1747-1753.