

## IMPORTANCIA DE LOS ANTÍGENOS CÍTRICOS EN LA PATOLOGÍA ALÉRGICA HUMANA

Silvia G. Irañeta<sup>a</sup>, Krikor Mouchián<sup>a</sup>, Angel Alonso,<sup>a</sup>  
Vilma G. Duschak<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Alergia, Hospital de Clínicas,

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Parasitología 'Dr. Mario Fatała Chaben', ANLIS, Ministerio de Salud y Ambiente, Buenos Aires, Argentina

\*Correspondencia a: Dra. Vilma G. Duschak

Instituto Nacional de Parasitología Departamento de Investigación, Area de Bioquímica de Proteínas y Glicobiología de Parásitos 'Dr. Mario Fatała Chaben', ANLIS.Malbrán,

Ministerio de Salud de la Nación, Avenida Paseo Colón 568 (1063), Piso 5

Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina)

Tel. +54 11 4331 4010, Fax +54 11 4331 7142, E-Mail:vduschak@conicet.gov.ar

**palabras clave:** polen del naranjo, naranja, síndrome polen-fruta, alergia ocupacional.

### Resumen

La importancia del estudio de la inmuno-reactividad cruzada entre los extractos alérgicos de polen del naranjo (OTPE) y de la naranja (OFE) radica en la alta incidencia de alergias que relacionan al polen con ciertos alimentos en todo el mundo. El propósito del presente estudio es determinar la relación antigénica entre los extractos de OTPE y de OFE. Sueros de conejos anti-OTPE y anti-OFE, tanto como sueros de pacientes alérgicos a OTPE y a OFE se aplicaron comparativamente en ensayos específicos para IgG y/o IgE (inhibición de ELISA, cross-over e inhibición de inmunoblot) usando extractos alérgicos de OTPE y de OFE como fase sólida. Los tratamientos con periodato y con proteinasa K se usaron para ensayos de depleción de carbohidratos y proteínas, respectivamente. La antigenicidad de OTPE y la presencia de estructuras comunes entre los extractos de OTPE y de OFE se demostraron mediante ensayos de inhibición de ELISA e inmunoblot cruzado usando antisueros de conejo específicos para cada uno de estos extractos. Una proteína de 30 kDa, blanco común de la respuesta IgE para los extractos de OTPE, de OFE y de mandarina (MFE), pero ausente en el extracto de limón (LFE) se identificó por ensayos de ELISA e inhibición de inmunoblot en pacientes con sensibilización primaria a OTPE en el contexto de exposición ocupacional. Además, por tratamientos bioquímicos se mostró que los epitopes antigénicos presentes en la proteína de 30 kDa contienen una estructura peptídica libre de carbohidratos. En conclusión, este trabajo describe la antigenicidad del polen del naranjo, la presencia de determinantes antigénicos comunes entre el polen y las frutas cítricas, y la presencia de una banda proteica de 30 kDa con reacción cruzada IgE específica, la cual comparte epitopes libres de carbohidratos. Este antígeno común, después de su aislamiento y purificación

podría ser de utilidad para la inmunoterapia con un alérgeno específico en los pacientes alérgicos al polen y a las frutas cítricas.

### Summary

It is important to study the cross-reactivity between orange tree pollen (OTPE) and orange fruit (OFE) due to the high incidence of pollen/food-related allergies worldwide. The aim of the present study was to determine the antigenic relationship between OTPE and OFE. OTPE and OFE rabbit antisera as well as sera from patients allergic to OTPE and OFE were comparatively applied in IgG- and/or IgE-specific ELISA inhibition, crossover or inhibition immunoblotting assays using OTPE and OFE allergenic extracts as solid phase. Periodate and proteinase K treatments were used for carbohydrate and protein depletion, respectively.

The antigenicity of OTPE and the presence of common structures between OTPE and OFE extracts were demonstrated by rabbit IgG-specific ELISA inhibition and crossover immunoblotting assays. A 30-kDa protein, common target of the IgE response on OTPE, OFE and mandarin extract, but absent in lemon extract, was identified by ELISA and immunoblot inhibition assays in patients suffering from primary sensitization to OTPE in the context of occupational exposure. Moreover, biochemical treatments showed that antigenic epitopes on the 30-kDa protein contain polypeptidic but no carbohydrate moieties. We can conclude that the antigenicity of OTPE, the presence of common antigenic determinants between pollen and citrus fruits and an IgE-specific cross-reactive protein band of 30 kDa sharing carbohydrate-free epitopes were described. After isolation and purification, this common antigen might be useful for allergen immunotherapy in pollen/fruit-related allergic patients.

### Introducción

Sabemos que los pólenes pueden causar enfermedades alérgicas respiratorias tales como la fiebre del heno y el asma estacional. Si bien el tratamiento de las mismas es en primer lugar farmacológico, evitar la exposición a los alérgenos y la inmunoterapia con extractos adecuados es el trípode sobre el que se sustenta el tratamiento en casos crónicos y severos [1]. Se ha estudiado la reactividad cruzada entre diferentes antígenos y se ha podido observar que los pacientes alérgicos polínicos son sensibles simultáneamente a diferentes variedades de pólenes y no a una sola especie [2]. Más aun, se ha podido demostrar la presencia de epitopes comunes entre pólenes pertenecientes a distintas familias y alimentos [3, 4], incluso se ha responsabilizado a los alérgenos polínicos como agentes sensibilizantes en muchos síndromes polen-fruta [5, 6].

En Argentina, los principales pólenes responsables de las rinitis alérgicas pertenecen al grupo de las gramíneas, las malezas y los árboles. En este trabajo consideraremos en forma particular al polen del naranjo, árbol perteneciente a la familia de las Rutáceas y cuyo fruto, la naranja, se consume masivamente. El cultivo de la naranja (*Citrus silensis*) involucra varias ocupaciones, incluyendo poda, injerto, y lo que los granjeros coloquialmente llaman, "rolling" para proteger al árbol de la agresión del viento. A pesar de que el consumo de naranjas es masivo, la sensibilización con *C. sinensis* no es común. La mayoría de los informes sobre la naranja, así como de otros cítricos describen reacciones alérgicas posteriores a la ingesta de la pulpa de la naranja o de su jugo [7], con manifestaciones incluyendo síndrome oral alérgico tales como prurito, edema de lengua y de faringe, dermatitis y reacción sistémica tales como la anafilaxia post ingesta [8, 9].

Los 3 alérgenos principales de la naranja descriptos: Cit s 1 (proteína tipo-germina, 23 kDa), Cit s 2 (profilina, 14 kDa), y Cit s 3 (proteína transportadora de lípidos [LTP], no específica, 9 kDa, con reactividad cruzada con Pru p 3) [10, 11, 12]. La participación de LTPs en alergia ocupacional es limitada, pero han sido identificados como los alérgenos mayores y considerados relevantes en alergia alimentaria [12]. Se han registrado síntomas respiratorios en trabajadores que remueven la cáscara de la naranja [13], y recientemente se ha descrito un caso de síntomas de alergia respiratoria ocupacional debido a alérgenos de la cáscara de la naranja (Cit s 1 and Cit s 3), los cuales están presentes solamente en el flavedo de la misma y causan broncoespasmo después de pelar la fruta [14]. El ácaro *Panonychus citri* ha sido implicado como un alérgeno ocupacional que afecta a los trabajadores de la industria de la naranja [15].

La mayoría de las reacciones alérgicas a frutas relacionadas con pólenes se asocian con el polen del abedul [16]. Este comparte con algunas frutas y extractos vegetales estructuras antigénicas como la proteína de 35kDa llamada Bet v 6 [16, 17]. En muchos alimentos como la manzana, el durazno, la naranja, la frutilla, los zuchini y la zanahoria se han encontrado proteínas con capacidad de unión a la IgE relacionadas con el alérgeno menor Bet v 6 del abedul. También, se ha podido demostrar por técnicas de RAST una alergenidad cruzada entre el polen del abedul y ciertas frutas incluida la naranja [18]. Sin embargo hasta el momento no se ha publicado ningún trabajo relacionado ya sea con la antigenicidad del polen del naranjo (OTPE) o con la posible relación antigénica o alérgica entre el OTPE y la naranja (OFE) u otros extractos alérgicos de cítricos.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio pudimos demostrar que extractos alérgicos elaborados con diferentes tipos de naranjas fueron capaces de inducir, en conejos, una respuesta inmunológica específica [19]. Incluso encontramos que estos antígenos eran inmunogénicos en niños alérgicos a las naranjas *Citrus aurantium* y *C. silensis* [20, 21]. En el presente estudio se demuestra que el OTPE así como los extractos de OFE y de mandarina (MFE) tienen capacidad antigénica en aquellos pacientes que sufren una primera sensibilización al OTPE a causa de una exposición ocupacional. También se describen los determinantes antigénicos comunes entre estos alérgenos, capaces de inducir una rinitis estacional.

### Materiales y métodos

**-Preparación de extractos alérgicos.** La materia prima para la elaboración del extracto de polen de *Citrus silensis* fue obtenida de Bayer Corporation (USA). La misma fue extraída en solución de buffer fosfato salino, (PBS, 0.1M de fosfato de sodio conteniendo 0.15 M de CLNa, PH: 7,3 ) con agitación por 24 hs a 4° C en una dilución 1/50. Luego fue centrifugada a 12.500 g por 40 minutos y dializada contra PBS. Las naranjas fueron cuidadosamente peladas y las semillas descartadas. La pulpa de la misma fue sometida a la técnica de Frugoni y Hansen para obtener el extracto correspondiente [22]. Los extractos de mandarina y de limón fueron obtenidos siguiendo la misma técnica. El extracto usado como control (*Periplaneta americana* = Pa) fue obtenido como se describió anteriormente [23]. Los extractos fueron esterilizados y conservados a -20°C. La concentración proteica de cada extracto, se determinó usando método de Bradford usando BSA como solución estándar [24].

**-Modificación química del extracto alérgico.** Para los ensayos de oxidación de hidratos de carbono, los extractos proteicos liofilizados fueron incubados en metaperiodato de sodio (50mM) en oscuridad con agitación por 72 hs a 4° C, siguiendo el método de Owhashi y col. [25]. La oxidación con ácido periódico fue también realizada sobre las proteínas del extracto separadas por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con el agregado de dodecilsulfato de sodio) y transferidas a membranas de nitrocelulosa [26], mediante incubación con ácido periódico en buffer acetato pH 4.5 por 18 hs a 4° C con agitación. Se usaron como controles tiras embebidas en buffer acetato de sodio. El tratamiento con proteasas fue hecho por incubación del extracto alérgico con proteinasa K (1 µg/ml) por una hora a 4° C.

**-Producción de anticuerpos específicos contra los extractos alérgicos.** Se obtuvieron anticuerpos contra OTPE y OFE mediante la inmunización de conejos con cada uno de los extractos alérgicos diluidos en PBS y emulsionados con adyuvante de Freund completo (1:1 V/V) como se describió [20]. Se utilizaron las técnicas de Outcherlony y hemaglutinación pasiva para determinar la antigenicidad de los extractos empleando el suero policlonal obtenido [27, 28].

**-Selección de pacientes.** La selección de pacientes atópicos sensibilizados primariamente a OTPE, se llevó a cabo entre trabajadores de una plantación de naranjas de San Pedro (Bs.As, Argentina). Se determinó atopía mediante el interrogatorio de la historia clínica, los síntomas alérgicos presentados correlacionados con los tests cutáneos (prick test) y RAST para ambos extractos. Los pacientes fueron divididos en dos grupos:

1°): cuatro pacientes con prick test y RAST positivos para OTPE y para OFE.

2°): dos pacientes con prick test y RAST positivos para OTPE y negativos para OFE, los cuales habían

estado recibiendo inmunoterapia durante dos años (ver Tabla 1).

Los síntomas que presentaron los pacientes fueron edema de párpados, rinitis estacional, rinoconjuntivitis y asma. Ninguno de ellos presentó urticaria, prurito labial, angioedema facial, glositis ni shock post ingestión de la fruta cítrica. Se excluyeron del estudio pacientes alérgicos a otros 3 pólenes de árboles presentes en la misma zona, y a otros alimentos (tomate, arroz, cacao y leche). Se incluyeron como controles no atópicos individuos sanos, sin antecedentes de alergia y con respuesta negativa a los extractos alérgicos de pólenes y de alimentos.

**Sueros de pacientes.** Se separó de la sangre de los pacientes seleccionados, mediante coagulación a 4° C y centrifugación a 1000 g por 15 minutos. Se dividieron en alícuotas de 1 ml y luego se almacenaron a -70°C.

**-Pruebas cutáneas.** Se realizaron prick tests para medir la reactividad a los extractos alérgicos de acuerdo a Aas y Belin [29]. Se realizaron durante la mañana y se leyeron los resultados a los 15 minutos en base al tamaño de la pápula en comparación con la pápula de histamina 1/1000 empleada como control positivo. Los pacientes evaluados no habían ingerido corticoides, antihistamínicos ni drogas inmunosupresoras durante una semana previa a la realización de las pruebas cutáneas.

**-RAST.** La determinación de IgE específica se realizó empleando discos de celulosa activados con bromuro de cianógeno, empleando 10 µg de proteína, en buffer bicarbonato/carbonato 0.1 M, pH 8.5 acorde con el método de Ceska y col. [30]. Después del bloqueo con metanolamina 0.05 M, los discos se incubaron con 50 µl de suero durante toda la noche a temperatura ambiente. Los anticuerpos IgE específicos fueron detectados mediante la técnica Phadebas-RAST (Farmacia, Uppsala, Suecia) y se midieron en PRU/ml. Se consideraron positivos cuando los valores eran mayores a 0.35 PRU/ml [31, 32].

**-ELISA e inhibición de ELISA.** Se realizó la técnica de ELISA como fue descripta por Sridaharay y col. [33]. Se cargaron los pocillos con 100 µl de cada extracto (10µg/ml en buffer de carbonato de sodio, pH 9,6) durante 2 hs a 37 °C con 3% de leche descremada en 0.1 M PBS. Luego se lavaron las placas cuatro veces con PBS conteniendo 0.05 % de Tween 20 y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:10 del pool de sueros humano durante 2 hs a 37°C. Luego de hacerse un lavado adicional con PBS conteniendo 0,05 % de Tween 20, se agregaron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1:2.000 de anti-IgE humana de cabra conjugada con peroxidasa, durante 2 hs a 37 °C. La reacción se reveló con fenilendiamina en buffer citrato, pH 4.6, se interrumpió con 50 µl de ácido sulfúrico 2.0 M y se leyó la absorbancia a 492 nm . Las técnicas de inhibición de IgE por ELISA se realizaron como se mencionó anteriormente, pero el pool de sueros se adsorbieron con los diferentes extractos alérgicos. Se agregó una dilución 1:10 del pool de sueros humanos para diferentes pocillos llenos con 5 µg de cada extracto proteico y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego se recolectaron y se usaron los sueros adsorbidos para la detección de IgE específica hacia diferentes extractos alérgicos. Tanto para la técnica de ELISA como para la de ELISA por inhibición se utilizaron como controles negativos, sueros de sujetos no atópicos y extractos alérgicos no relacionados. La determinación de IgG por inhibición de ELISA se realizó incubando durante 2 hs a temperatura ambiente 100 µl de antisuero de conejo con 100 µl de concentraciones crecientes de OTPE ú OFE como inhibidor. Luego se agregó a los pocillos cargados previamente con antígeno, el suero adsorbido. Se utilizaron como controles negativos el suero preinmune de conejo normal y el suero inmune incubado con PBS. Se detectaron los anticuerpos unidos a la placa con la adición de un suero anti IgG total de conejo acoplado a peroxidasa. Se calculó el porcentaje de inhibición como la reactividad total menos la reactividad residual después de la absorción por 100 dividido por la reactividad total.

**-SDS-PAGE.** Se realizó la electroforesis de 50 µg de extractos alérgicos y marcadores con peso molecular conocido en mini-geles de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio, según Laemmli [34].

**-Western blots e inhibición cruzada de los Western blots.** Se realizó la electroforesis de las muestras proteicas de OTPE y de OFE como se describió anteriormente y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa, según Towbin y col. [35]. Se colocaron las membranas durante 90 minutos en solución bloqueante (TBS, 50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6 conteniendo 3% de leche descremada en polvo) y luego se probaron con una dilución 1:100 del suero de conejo anti-OTPE o anti-OFE en una dilución 1:10 del pool de sueros humanos. Las tiras se incubaron durante 90 minutos con antisuero de conejo y se lavaron y trataron con anticuerpos IgG anti-conejo hecho en cabra (1:2.000) acoplado a fosfatasa alcalina durante 90 minutos a temperatura ambiente [36]. Se incubaron los sueros humanos individualmente y en pool durante toda la noche y las tiras se trataron durante 90 minutos a temperatura ambiente con anti IgE humana hecha en cabra acoplada a peroxidasa. Se usaron como controles negativos sueros de sujetos no atópicos y de conejos normales. Para la inhibición de la unión de la IgE se preincubó la dilución óptima de pool de sueros humanos (1/10) con 100 µg de cada extracto alergénico en agitación constante, durante toda la noche a 4° C. Luego se agregó el suero adsorbido a cada tira con los diferentes extractos alergénicos y se testaron con inmunoblotting, como se describió anteriormente. Se necesitaron 100 µg de extracto proteico para la inhibición completa de la IgE.

Tabla I. Características de la población de estudio

N° Pacientes	SEXO	Edad (años)	Síntomas	Test cutáneos	RAST (PRU/ml sueros)
1	M	30	RC/I (*)	OTPE ++++ OFE ++ PTE - LTE - BE -	OTPE 4,8 OFE 2,7 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35
2	M	27	RC/I (*)	OTPE +++ OFE ++ PTE - LTE - BE -	OTPE 3.9 OFE 0.60 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35
3	M	42	RC/A (*)	OTPE ++ OFE ++ PTE - LTE - BE -	OTPE 0.7 OFE 0.42 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35
4	F	54	R (*)	OTPE +++ OFE ++ PTE - LTE - BE -	OTPE 1.3 OFE 0.69 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35
5	F	63	RC/A (*)	OTPE +++ OFE - PTE - LTE - BE -	OTPE 3.4 OFE < 0.35 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35
6	M	38	RC/I (*)	OTPE ++ OFE - PTE - LTE - BE -	OTPE 0.70 OFE < 0.35 PTE < 0.35 LTE < 0.35 BE < 0.35

Los resultados del test cutáneo son dados como: + < ½ de la referencia positiva, ++ > ½ referencia positiva, +++ > referencia positiva, y ++++ > 2 veces la referencia positiva. RAST expresado como PRU/ml de suero. PRU; M, masculino; F, femenino; R, Rinitis; RC, Rinoconjuntivitis; A, Asma; I, Estornudo. Los extractos ensayados para tests cutáneos y RAST son el polen del naranjo (OTPE), de naranja (OFE), de plátano (PTE), de tilo (LTE) y de Blattaria sudamericana (BE). (\*) no se detectó glositis, shock, prurito labial, angioedema luego de la ingestión de la fruta.

## Resultados

### 1. Análisis de la composición de los extractos de polen del naranjo y del fruto cítrico (naranja)

Los perfiles proteicos de OTPE y OFE fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) seguidos de tinción con nitrato de plata (Fig. 1A) o de PAS (Fig. 1B) para teñir e identificar proteínas y glicoproteínas, respectivamente. A pesar de que la preparación de los extractos de polen contiene comunmente un paso de desengrasado con éter etílico, sorprendentemente cuando el polen del naranjo fue sometido a este tratamiento, este mostró una degradación completa del patrón proteico (Fig. 1A, línea b). Cuando el paso de desengrasado fue omitido, pudimos observar un perfil proteico inalterado (Fig. 1A, línea a). El patrón del extracto de naranja teñido con nitrato de plata, comunmente obtenido sin procedimiento de desengrasado se muestra en la Figura 1A, lane c. Cuando OTPE y OFE separados electroforéticamente fueron sometidos a la tinción de PAS (Fig. 1B, líneas a and b) se observó que la mayoría de las proteínas de ambos extractos eran glicoproteínas.

**2-Inmunoreactividad cruzada entre el suero de conejo Anti-OTPE y Anti-OFE en respuesta a extractos alergénicos.** Investigamos la relación antigénica entre los extractos de OTPE y de OFE. Se pudo observar una clara inhibición de la unión entre el suero anti-OTPE y su correspondiente antígeno al agregar concentraciones cada vez mayores de OFE (Fig. 2a). Del mismo modo, el agregado de OTPE inhibió el reconocimiento del suero anti-OFE hacia el extracto proteico de OFE (Fig. 2b). Como era de esperar, a la misma concentración antigénica, el porcentaje de inhibición fue más alto cuando se utilizó el antígeno homólogo como inhibidor en comparación al antígeno no homólogo (Fig. 2a, b). Es interesante remarcar que fueron necesarias concentraciones 5 y 3 veces mayores de OFE y OTPE como antígeno inhibidor, respectivamente, para obtener una inhibición del 50 % en la unión de la IgG de cada antisuero con su antígeno correspondiente.

Se analizó también la relación entre OTPE y OFE por inmunoblotting utilizando sueros de conejo obtenidos por la inmunización de los mismos con los extractos individuales. Se enfrentaron tiritas cargadas con OTPE ú OFE, por duplicado, con antisuero anti-OTPE ó anti-OFE (Fig. 3). El suero de conejo anti-OTPE reconoció componentes antigénicos de peso molecular entre 10 y 100 kDa (Fig. 3, OTPE, tira a) en OTPE. Se observó un patrón de reconocimiento similar con anti-OFE sobre OTPE sembrado como antígeno, sin reactividad alguna en la zona de las bandas proteicas de 80 a 90 kDa ni a 30 kDa, (Fig. 3, OTPE, tira b). En forma similar, el suero anti-OFE reconoció bandas en un amplio rango de peso molecular aparente cuando se lo enfrentó con OFE, sin observarse reactividad a pesos moleculares aparentes mayores de 80 kDa (Fig. 3, OFE, tira c). Por otra parte, el suero anti-OTPE mostró proteínas con reactividad cruzada al enfrentarse con el extracto OFE, sólo en un rango muy estrecho de peso molecular aparente entre 45 y 60 kDa (Fig. 3, OFE, tira d). En conjunto, estos resultados no sólo nos muestran que ambos extractos alergénicos son antigénicos sino también que los mismos comparten estructuras antigénicas.

**3-Evaluación de la reactividad cruzada entre el polen del naranjo y de cítricos en sueros de pacientes polínicos.** Si consideramos la reactividad cruzada que encontramos entre OTPE y OFE, es posible que los pacientes que presentan una primera sensibilización al OTPE en el contexto de una exposición ocupacional, puedan desarrollar respuestas IgE específicas hacia la OFE y otros cítricos. Para evaluar esta hipótesis, medimos las respuestas IgE a OTPE, a OFE, a MFE, a LFE y a BE en pacientes alérgicos a OTPE y a OFE mediante ensayos de ELISA, Western blot e inhibición de inmunoblot. De acuerdo a los hallazgos clínicos y de laboratorio se agruparon los sueros de pacientes de la siguiente manera: pool I, sueros de pacientes con pruebas positivas para OTPE y para OFE; pool II, sueros de pacientes con pruebas positivas para OTPE y negativos para OFE. Encontramos que los pacientes alérgicos a OTPE y OFE tenían niveles de anticuerpos IgE contra OTPE y contra OFE significativamente elevados en comparación con los sujetos no alérgicos (Fig. 4a). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los 3 extractos evaluados. En contraste, en estos pacientes los niveles de IgE específica contra LFE no difirieron de los obtenidos en los sujetos controles. Tampoco se observaron respuestas IgE contra el antígeno no relacionado BE.

Se estudió con mayor profundidad la presencia de epitopes IgE comunes entre OTPE y OFE y el extracto relacionado MFE mediante estudios cruzados de ELISA, midiendo los niveles remanentes de IgE después de la adsorción del suero con diferentes extractos proteicos. Los niveles de IgE disminuyeron significativamente en comparación con los sueros no adsorbidos, independientemente del extracto del cítrico empleado para la adsorción (Fig 4b). En oposición, la adsorción del pool I de sueros con BE no influyó en la capacidad de este suero para reconocer tanto al OTPE, al OFE o al MFE.

Estos resultados corroboran los hallazgos en las pruebas cutáneas y en el RAST, mostrando que los pacientes estudiados tienen niveles de IgE específica contra OTPE y OFE.

Para identificar las estructuras antigénicas de los extractos proteicos en estudio, se realizaron técnicas de inmunoblot e inhibición de inmunoblot. Los sueros del pool I analizados individualmente reconocieron en el extracto de OTPE 3 bandas proteicas de 30, 60 y 70 kDa, mientras que en el de OFE y MFE una banda de 30 kDa. No se observó reactividad ni en LFE ni en BE. Por otra parte, el pool de sueros de los controles no reconoció ninguna banda en ninguno de los extractos proteicos. Es interesante observar que el suero individual de los pacientes alérgicos al OTPE, pero no a OFE (pacientes 5 y 6, Tabla I) no reconoció la banda de 30 kDa en ninguno de los extractos de cítricos probados (Tabla II). Decidimos focalizar nuestra atención en esta banda proteica de 30 kDa detectada en OTPE, OFE y MFE para ver si el suero de los pacientes reconocía epitopes comunes en ella. No se detectó la unión de IgE contra estas bandas en OTPE y OFE después de la adsorción del pool I de sueros de pacientes atópicos, con OFE y OTPE, respectivamente (Fig. 4, líneas b), sugiriendo que la proteína de 30 kDa es un alérgeno que presenta epitopes comunes.

**4-Detección de IgE específica en suero de pacientes alérgicos al OTPE ú OFE mediante inmunotransferencia.** Decidimos focalizar nuestra atención en la banda proteica de 30 kDa detectada en OTPE, OFE y MFE para ver si el suero de los pacientes reconocía epitopes comunes en ella. No se detectó la unión de IgE hacia estas bandas en OTPE y OFE después de la adsorción del pool I de sueros de pacientes atópicos, con OFE y OTPE, respectivamente (Fig. 5, líneas b), sugiriendo que la proteína de 30 kDa es un alérgeno que presenta epitopes comunes.

Para identificar las estructuras antigénicas de los extractos proteicos en estudio, se realizaron técnicas de inmunotransferencia e inhibición de la inmunotransferencia. Los sueros del pool I analizados individualmente reconocieron en el extracto de OTPE 3 bandas proteicas de 30, 60 y 70 kDa, mientras que en el de OFE y MFE se observó una banda de 30 kDa (Fig 5, Tabla II). No se observó reactividad ni en LFE ni en P. am. Por otra parte, el pool de suero de los controles, no atópicos, no reconoció ninguna banda en ninguno de los extractos proteicos.

Es interesante observar que el suero individual de los pacientes alérgicos al OTPE pero no a OFE (paciente 5 y 6, tabla II) no reconoció la banda de 30 kDa en ninguno de los extractos de cítricos probados (Tabla II).

#### **5-Characterización parcial de los componentes antigénicos reconocidos por los anticuerpos IgE.**

Para lograr una mejor caracterización de los componentes antigénicos reconocidos por los anticuerpos IgE en pacientes atópicos se trataron los extractos OTPE y OFE con proteinasa K o ácido periódico. La eliminación de carbohidratos no modificó el reconocimiento inmunológico en ninguno de los extractos mientras que el tratamiento con proteinasa K disminuyó significativamente la respuesta IgE hacia OTPE y OFE (Tabla III). Estos datos muestran la naturaleza proteica de estos epitopes reconocidos por IgE y su bajo contenido en carbohidratos.

#### **Discusión**

Se ha estudiado mucho acerca de la asociación de la alergia polínica al abedul, las gramíneas y las malezas con ciertas frutas, nueces o vegetales. Se ha trabajado con la rama, la hoja y la flor del árbol del naranjo, demostrando la existencia de un aeroalérgeno del árbol del naranjo, de peso molecular aparente <14kDa, el cual es miembro de las familias de LTPs, sugiriendo que podría ser la Cit s 3, la responsable del asma y la dermatitis de contacto durante los meses de floración [37]. Sin embargo no hay trabajos publicados que

relacionen los pólenes con los cítricos [19]. Pacientes con hipersensibilidad a frutas o vegetales muchas veces experimentan reacciones alérgicas a una variedad de pólenes [6, 16], siendo poco frecuente encontrar pacientes polínicos sensibles a una sola especie. En este trabajo, hemos investigado la relación antigénica entre extractos de OTPE y de OFE en pacientes que se han sensibilizado primariamente con OTPE en un contexto de exposición ocupacional. Por primera vez, mostramos que OTPE es antigénico y que los extractos de OTPE, de OFE y de MFE comparten a su vez estructuras antigénicas. Más aun, una proteína de 30 kDa parece ser un disparador común de la respuesta IgE a los extractos de OTPE, de OFE y de MFE, pero no al de LFE en pacientes alérgicos exclusivamente a los extractos de OTPE y de OFE.

La asociación entre la sensibilización al polen del naranjo y la naranja podría explicarse por la presencia de epitopes comunes en proteínas homólogas o diferentes de estos extractos. Sin embargo, en nuestro estudio estos epitopes con reacción cruzada no parecen existir en todos los cítricos. No se encontraron niveles de IgE específica contra BE lo que confirma que el reconocimiento inmunológico es específico para el extracto alérgico probado. Al respecto podemos decir que en el reino vegetal se conservan las porciones alérgicas de los pólenes que son reconocidas específicamente por los idiotipos de los anticuerpos IgE y que también se ha descrito un nivel elevado de secuencias homólogas entre diferentes familias y alérgenos presentes en pólenes y alimentos relacionados [38, 39]. Es interesante observar que los experimentos realizados con antisuero de conejos sensibilizados con OTPE y con OFE muestran que las estructuras comunes están representadas en la proteína del extracto de OTPE más que en la de OFE. Por este motivo, es más probable que la alergia a la naranja se manifieste en pacientes previamente sensibilizados con OTPE. Por otra parte los mastocitos del tracto respiratorio están más expuestos que los de la mucosa oral a los alérgenos inhalatorios y por ende son activados más fácilmente a través de los anticuerpos IgE específicos.

Se pudo observar que la reactividad cruzada entre el OTPE y el OFE se debe fundamentalmente a la presencia de una proteína de 30 kDa. Los pacientes sensibles al OTPE y no a OFE reconocieron a esta proteína sólo en el OTPE. La ausencia del reconocimiento no se debió a la baja concentración de extracto de OFE ya que no se modificaron los resultados al aumentar la concentración del antígeno en diez veces. Estos datos sugieren la presencia de epitopes propios en la proteína de 30 kDa del OTPE capaces de disparar diferentes respuestas IgE en los casos de alergia a pólenes y alimentos o a pólenes en general. En contraposición a los análisis de Western blot con suero humano, los ensayos cruzados de inmunoblot no mostraron reactividad cruzada entre la proteína de 30 kDa del extracto de polen y del extracto de fruta y los anticuerpos de conejo dirigidos contra OTPE y contra OFE. Estos hallazgos podrían sugerir la existencia de diferentes epitopes IgE e IgG, que presentan reacción cruzada en estos extractos. En concordancia con estos resultados, observamos que los pacientes atópicos que han recibido inmunoterapia con OTPE durante 2 años aumentaron los niveles de IgG capaces de reconocer la proteína de 30 kDa del OTPE. Por el contrario, no se encontró ninguna reactividad IgG hacia esta proteína con OFE (datos no mostrados).

Se describieron algunas reductasas de peso molecular aparente de 35 kDa que podrían representar una nueva familia de alérgenos en pólenes y alimentos presentes en algunas frutas y vegetales llamadas Bet v 6 o proteínas relacionadas con Bet v 6 [8, 16]. También se mencionó la presencia de un alérgeno común de 30 kDa presente en un grupo de frutas relacionadas, pero en este estudio los pacientes eran sensibles a frutas, pero no a pólenes [40]. Más aún, también se ha relacionado un alérgeno de 30 kDa en la alergia al látex y algunas frutas [41]. Algunas proteínas de 30 kDa podrían migrar juntas en el SDS-PAGE y presentar inmunoreactividad a la IgE. Por lo tanto, no podemos inferir que la proteína de 30 kDa con reactividad alérgica cruzada sea la misma descrita por otros autores.

Por lo general, los alérgenos que producen reacciones de hipersensibilidad inmediata son proteínas y la mayoría de los estudios sugieren que son más de una [42]. Resultados de estudios anteriores realizados después de la depleción de proteínas y carbohidratos muestran la presencia en los extractos de OTPE y de OFE de epitopes proteicos. Esto sugiere que la antigenicidad de la proteína de 30 kDa no estaría relacionada con motivos de carbohidratos. El mapeo de epitopes podrá quizás, en un futuro confirmarnos estos hallazgos. Los pacientes evaluados en este estudio presentaban síntomas alérgicos, pero ninguno, síntomas de alergia oral. Esto indica que la proteína de 30 kDa podría no estar involucrada en el desarrollo de las manifestaciones clínicas severas de los episodios de alergia relacionados con frutas.



Por otro lado, se sabe que en las frutas, las profilinas son descritas como alérgenos menores con algunas excepciones como en el caso del melón, la sandía o la naranja. Con la intención de comprender el mecanismo de reactividad cruzada entre miembros de la familia de las profilinas, se identificó un mimotopo que podría estar involucrado en la reactividad cruzada entre las profilinas de frutas y pólenes [43]. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos con pacientes no evidenciaron reactividad cruzada entre proteínas de 14 kDa de peso molecular aparente entre el polen de naranjo y la naranja, las cuales podrían corresponder a profilinas.

En conclusión, hemos podido establecer la relación antigénica entre el OTPE y los cítricos. La presencia de epitopes comunes entre el OTPE y el OFE podría explicar el desarrollo de alergia a OFE en pacientes sensibilizados a OTPE. Estos resultados señalan que el aislamiento, la purificación y la caracterización molecular de los alérgenos con reactividad cruzada podrían ser útiles para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia compartida entre pólenes y frutas.

### Referencias

- 1-Woolcock AJ: Inhaled drugs in prevention of asthma. *Am J Respir Dis* 1977; 115: 191-194.
- 2-Pham NH, Baldo BA, Bass DJ: Cypress pollen allergy. Identification of pollen allergens and cross-reactivity between divergent species. *Clin Exp Allergy* 1994;24:558-565.
- 3-Suphioglu C: What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1335-1341.
- 4-Pauli G: Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: The role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:183-195.
- 5-Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, Spitzauer S, Froschl R, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Scheiner O, Kraft D, Valenta R: Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:116-125.
- 6-Caballero T, Martín-Esteban M: Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: A review. *Invest Allergol Clin Immunol* 1998; 8:6-16.
- 7-Navarro LA, Pastor-Vargas C, Liñana JJ, Martínez I, Maroto AS, Vivanco F, Bartolomé B. Anaphylaxis due to orange soft drinks. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(4):297-299.
- 8 -Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansalomi R: The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61: 47-52.
- 9-Morimoto K, Tanaka T, Sugita Y, Hide M. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to ingestion of orange. *Acta Derm Venereol*. 2004;143:152-153
- 10-Crespo JF, Retzek M, Foetisch K, Sierra-Maestro E, Cid-Sanchez AB, Pascual CY, Conti A, Feliu A, Rodriguez J, Vieths S, Scheurer S. Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:282-290.
- 11-Ahrazhem O, Ibáñez MD, López-Torrejón G, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D, Salcedo G. Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137:201-210.
- 12-García BE, Lombardero M, Echechipía S, Olaguibel JM, DíazPerales A, Sánchez-Monge R, Barber D, Salcedo G, Tabar AI. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer protein. *Clin Exp Allergy*. 2004;34 (2):291-295.
- 13- Sen D, Wiley K, Williams JG. Occupational asthma in fruit salad processing. *Clin Exp Allergy* 1998;28:363-367
- 14-Felix R, Martorell C, Martorell A, Pinceda F, Cerda JC, de las Marinas MD. Induced bronchospasm after handling of orange flavedo (zest). *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131(5): 1423-1425.
- 15- Burches E, Pelaez A, Morales C, Brasó JV, Rochina A, Lopez S, Benito M. Occupational allergy due to spider mites: *Tetranychus urticae* (Koch) and *Panonychus citri* (Koch). *Clin Exp Allergy*. 1996;26(11):1262-1267
- 16 -Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B: Current understanding of cross-reactivity of food allergens and

pollen. *Ann NY Acad Sci* 2002; 964: 47-68.

17-Wellhausen A, Schoning B, Pettersen A, Vieths S: IgE binding to a new cross-reactive structure: A 35 kDa in birch pollen, exotic fruit and other plant foods. *Z Ernahrungswiss* 1996; 35: 348-355.

18-Karamloo FA, Wangorsch A, Kasahara H, Davin L, Hausteiner D, Lewis NG, Vieths S: Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Eur J Biochem* 2001; 268:5310-5320.

19 Halmepuro L, Vuontela K, Kalimo K, Bjorksten F: Crossreactivity and IgE antibodies with allergens in birch pollen fruits and vegetables. *Int Arch Appl Immunol* 1984; 74: 235-240.

20 -Alonso A, Seoane MA, Irañeta S: Induction of anti-orange antibodies in rabbits. *Allergol Immunopathol* 1989; 17: 307-311.

21 -Alonso A, Seoane MA, Irañeta S: A citrus fruitexclusion diet in sensitive patients and its influence on specific antibodies. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1994; 4: 146-148.

22 -Frugoni C: Preparación de extractos alergénicos; in Hansen K, Wemer M (eds): *Alergia Clínica*. Barcelona, Salvat, 1970, pp 508-586.

23. Irañeta SG, Duschak VG, Rodriguez SM, Seoane MA, Albonico JF, Alonso A: Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1999; 4: 235-240.

24 -Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

25-Owhashi M, Horii Y, Ishii A: Eosinophil chemotactic factor in schistosome eggs: A comparative study of eosinophil chemotactic factors in the eggs of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 359-366.

26-Duschak VG, Riarte A, Segura EL, Laucella SA: Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas disease. *Immunol Lett* 2001; 78: 135-142.

27 -Outcherlony O: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1958; 5: 1-16.

28-Boyden SV: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med* 1951; 93: 107-112.

29 -Aas K, Belin L: Standardization of diagnostic work in allergy. *Acta Allergologica* 1972; 27: 439-468.

30-Ceska M, Eriksson R, Varga JM: Radioallergosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 49: 1-9.

31-Johansson SGO, Bennich H, Berg T: In vitro diagnostic of atopy allergy. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radio allergosorbent test. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1971; 41: 443-451.

32-De Filippi I, Yman L, Schoder H: Clinical accuracy of updated version of the Phadebas RAST test. *Ann Allergy* 1981;46: 249-255.

33-Sridahara S, Singh BP, Kumar L, Verma J, Gaur SN, Gangal SV: Antigenic and allergenic relationships among grass pollens in India. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75: 73-79.

34-Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

35-Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

36-McGadey A: A tetrazolium method for nonspecific alkaline phosphatase. *Histochemie* 1970; 23:180-184.

37-de las Marinas MD, Felix R, Martorell C, Cerda JC, Bartolome B, Martorell A. Cit s 3 as an occupational aeroallergen in an orange farmer. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(7):510-2.

38-Chakraborty P, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S: Comparative aerobiology, allergenicity and biochemistry of three common palm pollen from Calcutta, India. *Aerobiol*. 1996;12:47-50.

39-Mohapatra SS: Is cross-reactivity a real or an imaginary concept? *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:724

40-Wadee AA, Boting LA, Rabson AR: Fruit allergy: Demonstration of IgE antibodies to a 30 kDa protein present in several fruits. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:801-807.

41-Lavaud F, Prevost A, Cossart C, Guerin L, Bernard J, Kochman S: Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. Allergy to latex, avocado pear, and banana: Evidence for a 30 kDa antigen in immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1994;95: 558-563.

42-King TP: Immunochemical properties of some atopic allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1979;64:159-163

43-Tordesillas L, Pacios LF, Palacín A, Cuesta-Herranz J, Madcro M, Díaz-Perales A. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(1):174-181.

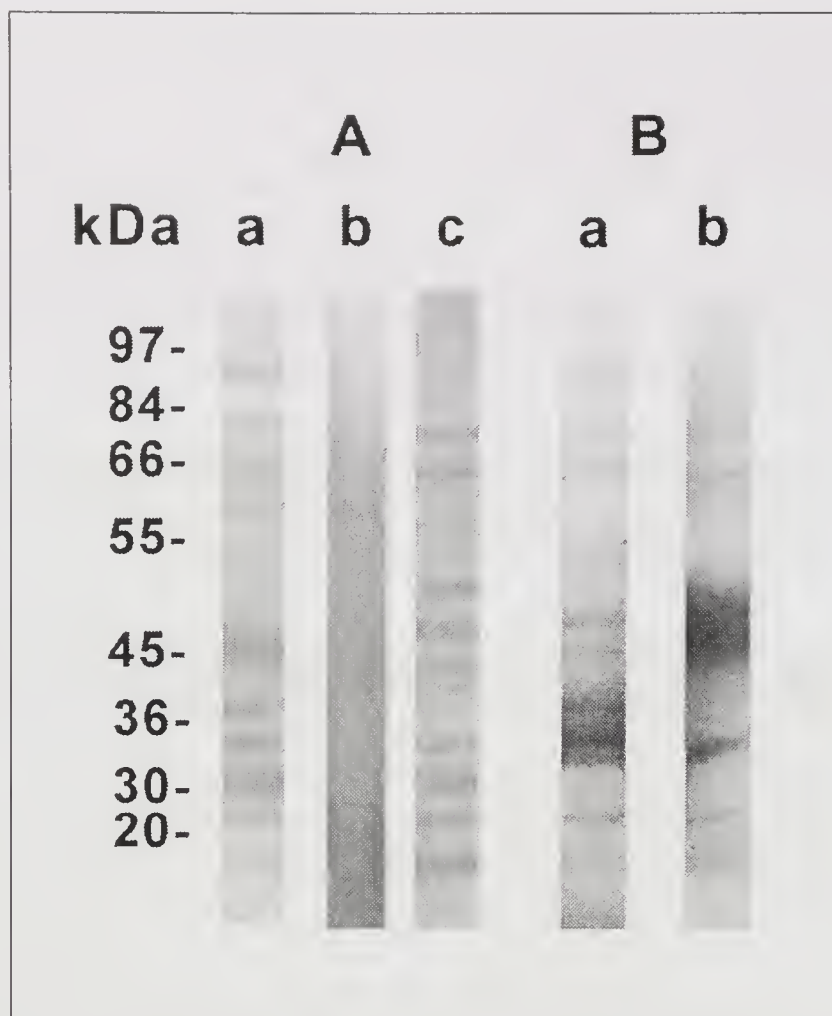
Tabla II. Detección de IgE específica anti-proteínas alergénicas de los extractos en pacientes alérgicos al OTPE y al OFE mediante inmunoblot.

Serum sample N°	OTPE: MW (kDa)			OFE : MW (kDa)	MFE: MW (kDa)	LFE : MW (kDa)	BE: MW (kDa)
	30	60	70	30	30	30	30
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-
PC	-	-	-	-	-	-	-

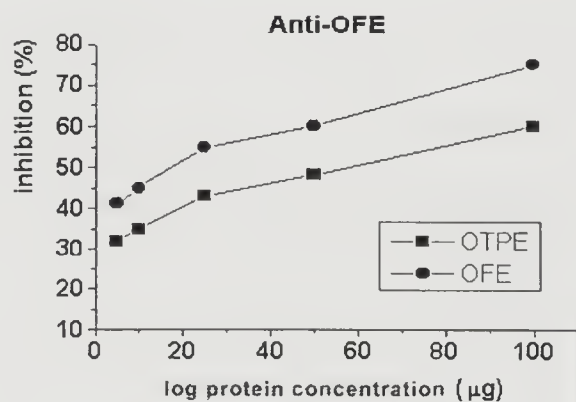
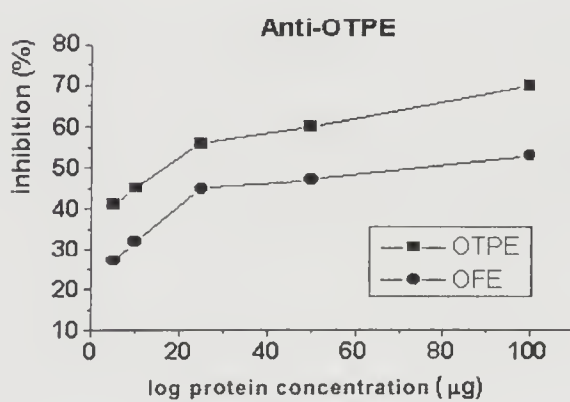
100 microgramos de OTPE, OFE, MFE, LFE y BE se separaron por SDS-PAGE, y luego de ser transferidos, se detectaron mediante inmunoblot utilizando sueros de los pacientes 1 a 4 con alergia a OTPE y a OFE y de los pacientes 5 a 6 sólo alérgicos al OTPE. El pool de sueros control (PC) fue obtenido de 5 pacientes no alérgicos

Tabla III. Caracterización de componentes antigénicos reconocidos por el suero de pacientes atópicos

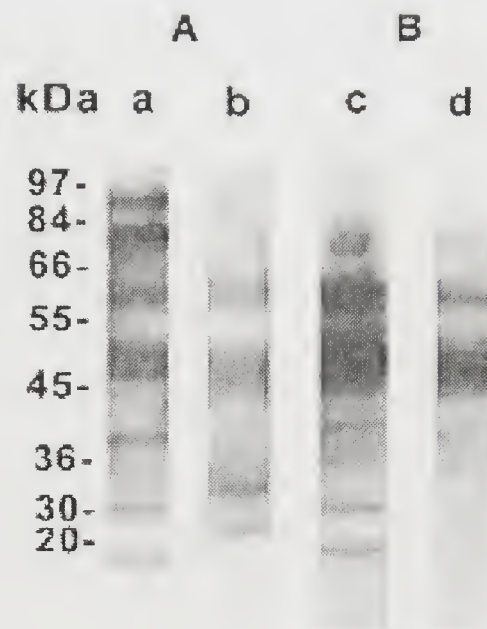
Extracto	OTPE	OFE
- sin tratamiento	0.505 ± 0.04	0.485 ± 0.04
-depletados de proteínas	0.120 ± 0.20	0.100 ± 0.20
-depletados de carbohidratos	0.490 ± 0.07	0.470 ± 0.07



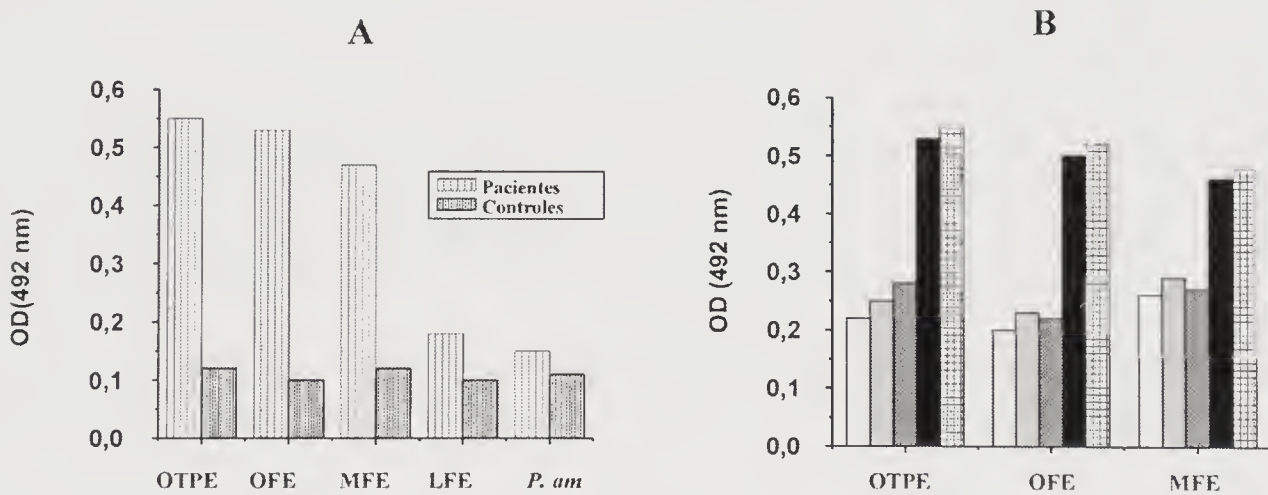
**Figura 1.** A- SDS-PAGE 12% teñido con nitrato de plata de extracto polen de naranjo OTPE con (a) o sin (b) procedimiento de desgrasado y de c) extracto de naranja OFE (15 µg proteína total del extracto sembrados en cada pocillo). B- 12 % SDS-PAGE de 50 µg de proteína total del extracto teñida con PAS de a) OTPE ú b) OFE.



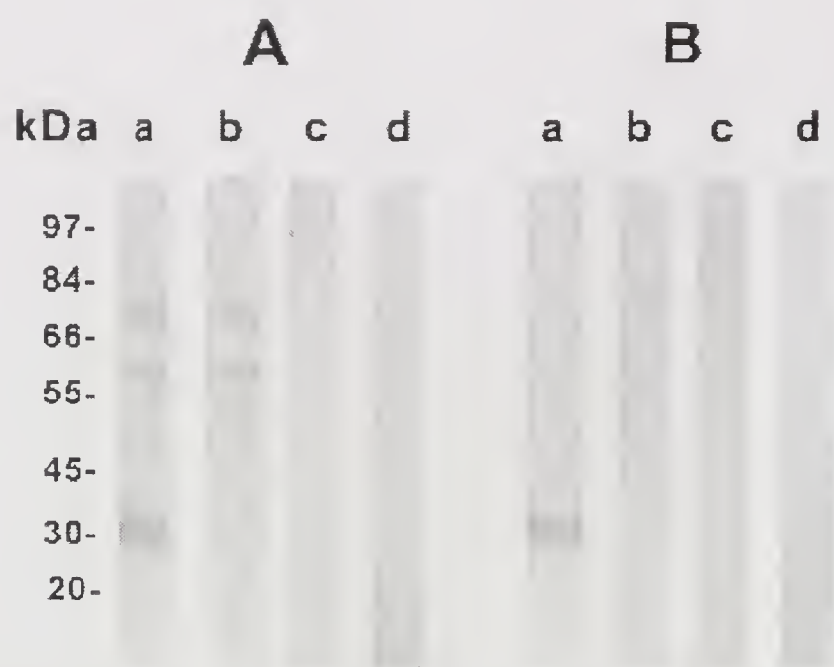
**Figura 2.** Relación antigénica entre los extractos alérgicos de OTPE y de OFE. Para el ensayo de ELISA de inhibición de IgG, se adsorbieron anti-OTPE (A) y anti-OFE (B) con diferentes concentraciones de OTPE (cuadros negros) ú OFE (círculos negros) y se agregaron a OTPE ú OFE como fase sólida, respectivamente.



**Figura 3.** Reactividad cruzada entre los los extractos alérgicos de OTPE y de OFE. Cincuenta microgramos de OTPE (A) o OFE (B) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con suero policlonal anti-OTPE (líneas a y d) o anti-OFE (líneas b y c)



**Figura 4.** Identificación de epitopes reconocidos por IgE compartidos entre OTPE y extractos de frutas cítricas. Niveles de Anticuerpos IgE específicos para los extractos alérgicos fueron medidos en sueros de pacientes atópicos A) pool I (pacientes, barras blancas), pool de sueros de controles no alérgicos (controles, barras negras). B) Después de adsorción con OTPE (barras blancas), OFE (barras gris claro), MFE (barras gris oscuro) o 3-BE (barras negras). También se muestran controles no adsorbidos (barras cuadrículadas). Los datos representan la media DO+SD de tres experimentos diferentes.



**Figura 5.** Presencia de epitopes comunes en el polen del naranjo y la naranja, blanco de IgE específicas en pacientes atópicos. 50 microgramos de OTPE (A) o de OFE (B) se separaron por SDS-PAGE. se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con el suero pool I antes (líneas a) y después de la absorción con OFE (A, línea b) o con OTPE (B, línea b). También se realizaron controles con pool de sueros de pacientes no atópicos (líneas c) y extractos alérgicos no relacionados (líneas d).

**Key words:** Orange pollen tree; pollen-fruits syndromes; citrus hypersensitivity; occupational orange allegry.