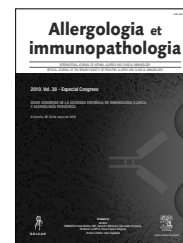




Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



MESA REDONDA: ALÉRGENOS RECOMBINANTES. PUESTA AL DÍA
(MODERADORA: M. FERNÁNDEZ-BENÍTEZ)

Los alérgenos recombinantes en el laboratorio

R. Rodríguez

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España*

Introducción

La utilización de las técnicas de la biología molecular en la investigación clínica ha revolucionado los métodos de análisis, diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades. En inmunología, estas técnicas han posibilitado el estudio de genes y proteínas, análisis de la organización génica de inmunoglobulinas, mecanismos de expresión y control de esos genes, bases moleculares de diversas anomalías inmunológicas, análisis de receptores, de complejos de histocompatibilidad, de mediadores celulares, de antígenos, etc., lo que ha permitido mejorar el conocimiento de estas moléculas y de los procesos en los que participan. Numerosos campos de aplicación encontramos para estas técnicas en el área de la alergia, no sólo dentro del ámbito científico sino también para la práctica clínica. Así, la preparación de alérgenos recombinantes para su utilización en protocolos de diagnóstico e inmunoterapia es uno de los ejemplos más relevantes. El empleo de alérgenos recombinantes purificados, de forma individual o en mezclas, permite disponer de productos homogéneos y bien definidos, en las cantidades adecuadas, y en ausencia de materiales indeseables que pudieran perjudicar la estabilidad del alérgeno o la eficacia del procedimiento clínico en el que se aplica la molécula. Una muestra de las ventajas que ofrece el uso de estos alérgenos es la proliferación en los últimos años de propuestas para su utilización, como es la diagnosis resuelta por componentes (CDR), bien usando sistemas convencionales, bien empleando sistemas automatizados, microensayos, etc.^{1,2}.

Herramientas en la producción recombinante de alérgenos

La opción que parece más apropiada para obtener alérgenos proteicos puros consiste en su producción recombinante en una célula huésped a partir de su cDNA, ya que la obtención de estos alérgenos de sus fuentes naturales presenta numerosos inconvenientes, como pueden ser la baja disponibilidad del material de partida, la baja concentración del alérgeno en dicho material, la contaminación con otros alérgenos, su inestabilidad bioquímica, etc. En el caso de los alérgenos recombinantes, además de manejar un producto bien definido, homogéneo y estable, podemos aspirar a disponer de cantidades ilimitadas de producto, e incluso introducir modificaciones en la estructura de la proteína para mejorar alguna de sus propiedades, ya sean estructurales o funcionales.

Las técnicas de la biología molecular —o del DNA recombinante— están basadas en procesos naturales, como son la hibridación de ácidos nucleicos —DNA/DNA, DNA/RNA y RNA/RNA—, las actividades enzimáticas de polimerasas, ligasas, endonucleasas de restricción, transcriptasas, etc., que son utilizadas en las condiciones que nosotros elegimos para obtener su máximo aprovechamiento. La disponibilidad de la “reacción de la polimerasa en cadena” (PCR) ofrece en el laboratorio una extraordinaria herramienta para obtener ilimitada cantidad de un DNA específico. Además de herramientas moleculares, también se hace uso de organismos diversos en los que se alcanza la producción de la proteína

alérgica gracias a su capacidad para incorporar genes ajenos en su propio genoma, y posteriormente para utilizar su propia maquinaria celular para traducir ese gen a proteína funcional. Bacterias, levaduras, células de insecto, células de mamíferos y plantas son los huéspedes más empleados en la obtención de recombinantes, pero una correcta elección, en cada caso, es de vital importancia. Cada uno de ellos ofrecerá ventajas frente a los demás para la producción de una proteína particular³.

Estrategia del proceso de producción y purificación del alérgeno recombinante

El diseño del método de producción dependerá de varios factores: 1) la naturaleza del producto de expresión; 2) la forma de expresión de la molécula: como proteína libre o como proteína de fusión, y 3) el huésped en el que se va a producir la proteína. El primero de estos factores obliga a considerar la existencia de procesos de maduración postraducciona del alérgeno, tales como glicosilaciones o formación de puentes disulfuro. La producción de proteínas de fusión facilitará la purificación del recombinante. Y finalmente, la utilización de sistemas bacterianos acorta y simplifica el protocolo respecto al empleo de levaduras *Pichia pastoris*, pero puede proporcionar una proteína inviable, insoluble o no funcional.

Una vez considerados estos aspectos, se procede a emplear el gen preparado en una cadena de producción relativamente convencional: a) inserción del cDNA en el vehículo de transferencia; b) incorporación de este vehículo al genoma del huésped; c) crecimiento del cultivo o del organismo huésped, lo que implica la producción de la proteína recombinante, y d) purificación de la proteína recombinante. Si bien el desarrollo de las 2 primeras etapas puede ser muy diferente dependiendo del huésped específico utilizado^{4,6}, por el contrario la purificación de la proteína recombinante suele emplear técnicas generales —precipitaciones, cromatografías de diversa índole (intercambio iónico, penetrabilidad), electroforesis, etc.— con pequeñas modificaciones de unas a otras como puede ser el empleo de columnas de afinidad específica.

Finalmente, el alérgeno preparado debe ser validado, esto es, es preciso analizarlo para comprobar su equivalencia con la proteína natural.

Validación del alérgeno recombinante

Consiste en el análisis de la proteína recombinante y comparación de sus propiedades con las de la proteína natural presente en la fuente biológica original^{7,8}. Las propiedades a determinar entran en 3 categorías: a) propiedades moleculares; b) propiedades inmunológicas, y c) propiedades funcionales. Habitualmente, se analizan sistemáticamente las 2 primeras, pues no siempre se conoce la actividad bioquímica de un alérgeno.

Las características moleculares examinadas suelen ser:

- 1) El peso molecular de la proteína, analizada por electroforesis en PAGE-SDS o mediante espectrometría de masas —cada sistema con sus ventajas e inconvenientes—.

- 2) La composición de aminoácidos, valorada por hidrólisis ácida y análisis de aminoácidos libres; algunas veces no se ajustan los valores de proteína natural y recombinante, pues la natural puede ser un conjunto de isoformas de la proteína, y la forma recombinante es un producto de la expresión de un solo gen.
- 3) Estructura tridimensional, analizada mediante espectroscopia de dicroísmo circular. En realidad, determina valores de estructura secundaria ordenada repetitiva, pero es una magnífica aproximación para conocer la integridad de la estructura tridimensional, del correcto plegamiento. Otra alternativa es la obtención del espectro de fluorescencia

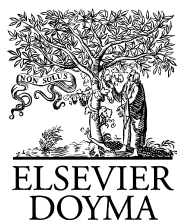
La actividad inmunológica se analiza mediante ensayos de titulación en ELISA y/o inmunotransferencia a membranas desde geles de poliacrilamida. Los anticuerpos utilizados pueden ser procedentes de antisueros específicos (IgGs, policlonales y/o monoclonales) —obtenidos frente a la proteína natural—, o presentes en los sueros de pacientes alérgicos a la fuente biológica sensibilizante (IgEs) y con respuesta positiva al propio alérgeno. Si es posible, se deben emplear los 2 sistemas. Un ensayo definitivo para mostrar la equivalencia inmunológica entre las 2 formas de la proteína consiste en realizar inhibiciones cruzadas, en alguno de los 2 sistemas —ELISA e inmunotransferencia— con la proteína natural y la recombinante como inhibidores alternativos de la unión a la otra. Todos estos ensayos *in vitro* darían una idea fiel de la calidad de la proteína recombinante pero, a menudo, la utilización de la proteína con fines farmacológicos exige una validación *in vivo*; para ello, se emplean análisis de liberación de histamina, o activación de basófilos, para lo que es imprescindible la sangre fresca de pacientes alérgicos. Desgraciadamente, la normativa actual no permite ensayar los alérgenos recombinantes mediante pruebas cutáneas.

En el caso de que se conozca la actividad bioquímica —en general, actividad catalítica— del alérgeno, se debe analizar esta función, y comparar actividades específicas de proteína natural y recombinante, lo que dará la respuesta definitiva a la equivalencia entre las 2 moléculas.

Bibliografía

1. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy*. 1999;29:896-904.
2. Barber D, De la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colás C, Dávila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein panallergens. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1764-73.
3. Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca G, et al. Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2007;17 (S1):4-10.
4. Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies cross-reactivity. *J Immunol*. 2004;172:3644-51.

5. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1192-8.
6. Palomares O, Vereda A, Cuesta-Herranz J, Villalba M, Rodríguez R. Cloning, sequencing, and recombinant production of Sin a 2, an allergenic 11S globulin from yellow mustard seeds. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1189-96.
7. Valenta R, Steinberg P, Duchêne M, Kraft D. Immunological and structural similarities among allergens: prerequisite for a specific and component-based therapy of allergy. *Immunol Cell Biol*. 1996;74:187-94.
8. Barderas R, Purohit A, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen. Equivalence between the natural and the recombinant forms. *Ann Allergy Asth Immunol*. 2006;96:557-63.



Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



MESA REDONDA: ALÉRGENOS RECOMBINANTES. PUESTA AL DÍA
(MODERADORA: M. FERNÁNDEZ-BENÍTEZ)

Diagnóstico alergológico con alérgenos recombinantes

M.J. Goikoetxea

Departamento de Alergología e Inmunología Clínica, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

Introducción

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los alérgenos surgiendo el término de componente alergénico. Así se denomina a las proteínas o glicoproteínas desencadenantes de la reacción alérgica, contenidas en la fuente alérgica reconocida hasta el momento como la causante de la enfermedad. Este cambio de concepto, junto con el desarrollo de la biología molecular y de la nanotecnología, ha permitido un avance significativo en el diagnóstico alergológico apoyado en el desarrollo de alérgenos recombinantes, purificación de proteínas y en la aparición de nuevas técnicas diagnósticas. Es importante conocer las características y utilidad de estas pruebas, algunas disponibles ya en la mayoría de las consultas de alergología, teniendo en cuenta que su aplicación requiere un acertado análisis de los resultados.

Técnicas de diagnóstico alergológico molecular

Determinación de IgE específica frente a alérgenos recombinantes y purificados en sistemas convencionales

Hasta el momento, el diagnóstico in vitro de las sensibilizaciones se ha realizado mediante la determinación de la IgE específica frente a las fuentes alérgicas. Los sistemas más populares disponibles actualmente para la determinación de IgE específica (ImmunoCAP e Immulonite) consisten en la exposición del suero del paciente a un soporte en el que se encuentran fijados los alérgenos completos tales como ex-

tractos de epitelio de perro, de ácaros o la leche de vaca. En los últimos años, estos mismos soportes, en lugar de contener la fuente alérgica completa, han fijado el alérgeno purificado de la fuente natural o recombinante, es decir, generado en el laboratorio a partir de una secuencia de ADN mediante técnicas de biología molecular, ofreciendo la posibilidad de medir IgEs específicas frente a alérgenos moleculares. En este caso enfrentamos el suero del paciente a la proteína o glicoproteína alérgica aislada. Esta técnica, por tanto, es realizable en todo laboratorio que disponga de los sistemas convencionales para la determinación de la IgE específica frente a la fuente completa. Para aplicarla al diagnóstico molecular, simplemente hay que adquirir el soporte para la detección con el alérgeno recombinante o natural purificado. Sin embargo, desgraciadamente, el catálogo disponible no es todo lo extenso que se precisa.

La determinación de la IgE específica frente a alérgenos moleculares realizada de esta forma permite una única medición en cada test frente a sistemas desarrollados posteriormente que permiten determinaciones múltiples en una única prueba. Esta característica conlleva que las determinaciones de IgE específica a nivel molecular darán una respuesta parcial con respecto a la sensibilización a la fuente alérgica, es decir, el hecho de que un paciente no esté sensibilizado al Ara h 9 significa exclusivamente que el paciente no está sensibilizado a la LTP del cacahuete sin descartar una sensibilización frente a este fruto seco a través de la sensibilización a otros alérgenos moleculares. En algunos casos será una desventaja ya que debemos solicitar varias determinaciones para disponer del perfil de las sensibilizaciones de un paciente. Sin embargo, en otros casos, buscaremos la sensibilización frente a contadas molé-

culas, como puede ante el inicio de una inmunoterapia dado que los extractos empleados en la inmunoterapia son muy heterogéneos en su composición¹ y que la sensibilización a determinados alérgenos se ha asociado con un mayor riesgo de reacciones adversas². Por tanto, el empleo de esta técnica implica solicitar determinaciones concretas al laboratorio de alergología basadas en una sospecha diagnóstica que precisa cierto conocimiento de las sensibilizaciones a nivel molecular.

Determinación de IgE específica mediante microarrays de proteínas

Desde hace unos pocos años disponemos de sistemas capaces de detectar la IgE específica frente a múltiples alérgenos en un solo test empleando poca cantidad de suero y en un soporte reducido que denominamos microarrays o biochips. Inicialmente se realizaron con los extractos de las fuentes alérgicas completas³⁻⁵. No obstante, pocos años después, gracias a los avances en la generación de alérgenos recombinantes y naturales purificados, se presentó el primer microarray de proteínas empleando componentes alérgicos a nivel experimental⁶. Recientemente se ha empezado a introducir en las consultas de alergología el primer microarray de componentes alérgicos comercial. Su versión actual consiste en 103 componentes alérgicos fijados en un soporte de vidrio por triplicado en un área de 1 cm² (ISAC, CRD103). La técnica, básicamente, es parecida a la determinación de la IgE específica convencional comentada anteriormente ya que sobre un soporte en la que se encuentran los alérgenos se añade el suero del paciente. En caso de que exista IgE específica frente a algún alérgeno del microarray en el suero del paciente, ésta quedará adherida y podremos detectarla con un anticuerpo marcador. Sin embargo, estas 2 técnicas de determinación de IgE específicas no son equiparables en términos cuantitativos. A diferencia de la detección de IgE específica de forma convencional, en la que se dispone de gran cantidad de alérgeno en comparación con el suero del paciente, los microarrays de proteínas, aunque precisan de una cantidad de suero menor, se realizan con un exceso de suero con respecto al alérgeno. Además, tanto los anticuerpos detectores como los sistemas de detección y análisis son distintos en las 2 técnicas. De hecho, estas 2 técnicas ni siquiera emplean la misma unidad de medida.

Aunque los estudios para la validación de la técnica de microarrays son escasos, a nivel cualitativo, la capacidad de la técnica de microarrays para discriminar sanos de alérgicos parece variar según los alérgenos. En términos generales, para algunos aeroalérgenos y alimentos, como el huevo y la leche, la determinación de IgE específica mediante microarrays, en comparación con la técnica convencional ImmunoCAP, no es superior en sensibilidad aunque la especificidad sí que es mejor para algunos alérgenos empleando el microarray^{7,8}. No obstante, de estos estudios también podemos concluir que el punto de corte a partir del cual consideramos una IgE específica como positiva en la técnica de microarrays no está consensuado. Como nueva tecnología, es necesario realizar estudios de validación para los distintos alérgenos.

Sin embargo, a pesar de que el microarray de componentes alérgicos es una técnica joven que precisa un mejor

conocimiento, ya desde su fase experimental, ha destacado por ofrecer una información extensa y global de las sensibilizaciones a nivel molecular empleando una cantidad de suero reducida y en una sola determinación. El microarray de proteínas disponible en la actualidad es un panel de 103 componentes alérgicos de pólenes, látex, alimentos tanto vegetales como animales y venenos de himenópteros entre los que se encuentran alérgenos mayoritarios, minoritarios y panalérgenos. Mientras que la determinación de la IgE específica mediante técnicas convencionales responde a preguntas concretas (si existe sensibilización frente a los alérgenos mayoritarios de un polen, o frente a un panalérgeno concreto), los microarrays de proteínas permiten contestar a muchas y variadas preguntas simultáneamente. Es por tanto una prueba de gran utilidad en pacientes polisensibilizados. Además, permite la detección de sensibilizaciones a distintos panalérgenos (profilina, LTP, homólogos de Bet v 1 o proteínas PR-10, parvalbuminas o tropomiosinas) procedentes de varias fuentes alérgicas, convirtiéndose en una prueba muy útil cuando sospechamos síndromes de reactividad cruzada⁹.

Por el momento se está comercializando un panel de alérgenos único. Este hecho hace que en algunos casos carezca de algunos alérgenos útiles para el diagnóstico de un paciente mientras que en otros casos puede ofrecer información acerca de sensibilizaciones que no estábamos interesados en conocer. En estos casos es importante valorar la clínica del paciente de forma prioritaria sin descartar que estas sensibilizaciones, subclínicas en un momento dado, pudieran manifestarse con el tiempo.

Ciertamente, la interpretación de los resultados en esta técnica requiere un gran conocimiento de las sensibilizaciones a nivel molecular pero el informe que se obtiene como resultado del test ayuda considerablemente al diagnóstico dado que expone los resultados de forma clara y con comentarios útiles. No obstante, esta información debe ser evaluada bajo el criterio médico y, en algunos casos, deberá ser estudiada de forma más exhaustiva para solucionar los problemas concretos de nuestros pacientes.

Pruebas cutáneas frente a componentes alérgicos

Los alérgenos recombinantes se han empleado en pruebas cutáneas a nivel experimental con resultados similares a los extractos naturales en cuanto a eficacia diagnóstica¹⁰ pero mejorando la precisión diagnóstica¹¹. Sin embargo, a nivel clínico, sólo disponemos de extractos de alérgenos más o menos purificados. Desde hace años se emplean en el diagnóstico in vivo algunas fracciones purificadas de la leche (alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina) y del huevo (ovo-mucoide, ovoalbúmina, lisozima) y recientemente se han comercializado extractos con los panalérgenos profilina purificada de palmera y LTP de melocotón. Estos extractos permiten realizar el diagnóstico molecular mediante las sencillas pruebas cutáneas sin tener que recurrir obligatoriamente a sofisticadas técnicas. De hecho, la concordancia entre las pruebas cutáneas con estos 2 extractos purificados y la IgE específica frente a la profilina de manzana (Mal d 4) y la LTP de melocotón (Pru p 3) es bastante buena¹².

La desventaja principal del diagnóstico molecular basado en pruebas cutáneas es que la oferta de estos extractos es

limitada. No obstante, dado su bajo gasto y la información que nos puede aportar, los extractos de profilina y LTP deberían incluirse en el panel de pruebas cutáneas estándar que se realiza en nuestras consultas a los pacientes polínicos previo a un análisis *in vitro* más extenso.

Otras técnicas aplicadas al diagnóstico alergológico molecular

Existen otras técnicas de diagnóstico realizables con alérgenos recombinantes en lugar de emplear la fuente alergénica completa, aunque no están tan extendidas en los laboratorios de alergología. Algunas de ellas son técnicas celulares como el test de activación de basófilos, la medición de sulfidoleucotrienos o el test de liberación de histamina¹³. Asimismo, la técnica de inmunoblot siempre realiza detección de las sensibilizaciones a nivel molecular ya que evalúa la presencia de IgE frente a cada uno de los componentes alérgicos de un extracto separados mediante electroforesis en un gel de acrilamida. Estas técnicas hoy en día se emplean generalmente sólo a nivel experimental.

Interpretación del diagnóstico alergológico molecular

Para hacer un buen diagnóstico alergológico con alérgenos recombinantes y purificados, lo más importante es una buena interpretación. A pesar de que los componentes alérgicos se han caracterizado, purificado y generado gracias a la biología molecular, no son necesarias nociones en esta materia para hacer un buen diagnóstico molecular. La interpretación del diagnóstico basado en componentes implica conocer la epidemiología de las sensibilizaciones (si es frente a un alérgeno mayoritario o minoritario), conocer las manifestaciones clínicas asociadas a esta sensibilización, plantearnos si está presente en los extractos de inmunoterapia si vamos a iniciar una vacuna o en qué alimentos está presente o con cuales presenta reactividad cruzada en el caso de una sensibilización alimentaria. En este último caso es importante tener en cuenta que los fenómenos de reactividad cruzada deben estar siempre comprobados en cada paciente ya que el hecho de que 2 fuentes alergénicas contengan un mismo panalérgeno no significa que tengan obligatoriamente similar inmunorreactividad. Es decir, podemos estar sensibilizados a la LTP del melocotón y tolerar el cacahuete a pesar de que éste tenga también LTP e incluso se haya observado una asociación entre estas 2 sensibilizaciones¹⁴.

Toda esta información podemos extraerla de la extensa literatura publicada sobre alérgenos recombinantes y purificados, pero también nos pueden ayudar las páginas web que contienen los conocimientos básicos necesarios para un alergólogo, como la página de la OMS que publica la nomenclatura internacional de alérgenos (www.allergen.org), o www.allergome.org, una página sencilla de utilizar con completa información sobre alérgenos moleculares con enlaces a artículos interesantes. No obstante, toda esta información hay que analizarla desde la perspectiva clínica para valorar la relevancia clínica de las distintas sensibilizaciones.

En conclusión, la transición en el concepto de alérgeno que se ha vivido en los últimos años es ya una realidad aplicable al diagnóstico a través de la técnica más apropiada en cada caso. Una correcta interpretación de sus resultados y aplicación de esta información mejorará la práctica clínica diaria en las consultas de alergología.

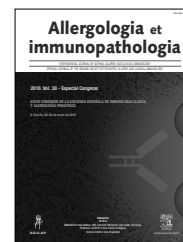
Bibliografía

1. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of commercial Timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1400-8.
2. Duffort O, Palomares O, Lombardero M, Villalba M, Barber D, Rodríguez R, et al. Variability of Ole e 9 allergen in olive pollen extracts: relevance of minor allergens in immunotherapy treatments. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140:131-8.
3. Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, et al. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med*. 2002;31;34:152-8.
4. Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, Kukanskis K, Edgar D, Kingsmore SF, et al. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem*. 2000;46:1990-3.
5. Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ingham C, Ardizzone A, Rossi R, Bistoni F, et al. Detection of allergen-specific IgE on microarrays by use of signal amplification techniques. *Clin Chem*. 2002;48:1367-70.
6. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1443-9.
7. Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy*. 2006;61:633-9.
8. Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk HF, et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy*. 2008;63:1521-8.
9. Goikoetxea MJ, Cabrera-Freitag P, Sanz ML, Fernández-Benítez M. The importance of *in vitro* component-resolved diagnosis in paediatric patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2010;38:37-40.
10. Metz-Favre C, Linhart B, Focke-Tejkl M, Purohit A, De Blay F, Valenta R, et al. Skin test diagnosis of grass pollen allergy with a recombinant hybrid molecule. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:315-21.
11. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* spp. Allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy*. 2003;58:53-6.
12. Barber D, De la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colas C, Dávila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1764-73.
13. Gamboa PM, Sanz ML, Lombardero M, Barber D, Sánchez-Monje R, Goikoetxea MJ, et al. Component-resolved *in vitro* diagnosis in peach-allergic patients. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2009;19:13-20.
14. Romano A, Fernández-Rivas M, Caringi M, Amato S, Mistrello G, Asero R. Allergy to peanut lipid transfer protein (LTP): frequency and cross-reactivity between peanut and peach LTP. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2009;41:106-11.



Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



MESA REDONDA: ALÉRGENOS RECOMBINANTES. PUESTA AL DÍA
(MODERADORA: M. FERNÁNDEZ-BENÍTEZ)

Implicación de los alérgenos recombinantes en la práctica clínica

M. Fernández-Benítez

Departamento de Alergología e Inmunología Clínica, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

El descubrimiento de la IgE en 1967 por Ishizaka¹ y simultáneamente por Johansson², marcan un antes y un después en la alergología tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

A nivel de laboratorio la clonación del primer alérgeno³ para producir alérgenos recombinantes purificados abre otra nueva etapa tanto en el diagnóstico como en el tratamiento⁴. Hasta entonces, década de los ochenta, conocíamos a qué fuente alérgica estaba sensibilizado un paciente, es decir, olivo, ácaro, alternaria, etc. Con la aparición del diagnóstico molecular, se han ido caracterizando y produciendo los diferentes alérgenos, como proteínas recombinantes, pudiendo actualmente diagnosticar el perfil individual de sensibilización o, lo que es lo mismo, a qué componentes del alérgeno está sensibilizado cada paciente.

La utilización de alérgenos purificados y recombinantes discrimina los pacientes cosensibilizados a diferentes alérgenos mayoritarios y los pacientes sensibilizados por panalérgenos. Esto ayuda no solamente al diagnóstico del perfil individual de sensibilización, sino también a la elección de una inmunoterapia específica mucho más selectiva.

Los alérgenos purificados y recombinantes en el diagnóstico del paciente

Los alérgenos naturales sabemos que son mezclas de productos heterogéneos y que pueden contener macromoléculas, proteínas no alérgicas, estar contaminados por otros alérgenos o contener enzimas proteolíticas, etc., todo ello con implicación diagnóstica. No hemos terminado de estandarizar

los alérgenos, cuando ya contamos con alérgenos purificados y recombinantes. Los alérgenos recombinantes muestran una excelente reactividad in vivo e in vitro.

Se ha demostrado en diferentes estudios la fuerte actividad biológica de estas proteínas que inducen una respuesta IgE y los altos niveles de expresión de los recombinantes que pueden ser cuantificados en mg de alérgeno obtenidos en la bacteria, levaduras, etc. Otra de las ventajas de los recombinantes es que son proteínas que pueden ser producidas sin límite, bajo unas condiciones definidas y purificadas. Esto supone una gran ventaja en la estandarización y calidad de los alérgenos, que nos va a permitir explicar el porqué; con los alérgenos naturales, en ocasiones, teníamos diferentes respuestas en el mismo enfermo. La alta purificación de los alérgenos recombinantes en unidades de masa y la posibilidad de su producción constante, permite una estandarización que con los alérgenos naturales no teníamos.

Hay estudios que muestran la excelente reactividad cutánea de los recombinantes comparando con alérgenos naturales. Estos estudios piloto sugieren que concentraciones de 5-20 µg/mL para prick test son eficaces para un diagnóstico in vivo⁵.

Por otra parte, para el diagnóstico in vitro, técnicas de microchips permiten la determinación de múltiples alérgenos purificados y recombinantes de una forma sencilla. Estas técnicas están principalmente indicadas en aquellos pacientes polisensibilizados, donde podremos determinar si se trata de reacciones cruzadas por la presencia de panalérgenos o sensibilizaciones a alérgenos mayoritarios⁶.

Cada vez en la literatura van apareciendo más estudios encontrando las aplicaciones de las técnicas moleculares^{7,8} para el diagnóstico y su interpretación, ya que en la técnica

de microchips, al ser semicuantitativa, los valores de IgE específica en relación con los panalérgenos son menores que los valores de IgE específica frente a los alérgenos mayoritarios, guardando una relación con la sensibilización primaria. En otras situaciones nos obliga a modificar el diagnóstico, al conocer los diferentes componentes alérgenos, como ocurre en el caso de la sensibilización al látex, que hace unos años diagnosticábamos con el alérgeno natural y en la actualidad podemos detectar si la sensibilización es a la proteína o al alérgeno mayor rHeb b5.

Todo este avance lleva a poder hacer diagnósticos de perfiles de sensibilización, pero también plantea dudas que precisan de futuros estudios sobre el papel de los panalérgenos y su repercusión clínica, si desensibilizamos o no a los panalérgenos utilizando la inmunoterapia que tenemos en la actualidad con alérgenos naturales, etc.

Los alérgenos purificados y recombinantes en el tratamiento

Si hacemos un poco de historia de la inmunoterapia, ya que llegamos al centenario de su aparición, recordamos que Noon y Freeman, en 1911⁹, son los primeros en utilizar la inmunoterapia en pacientes alérgicos, con la idea de inducir la producción de antitoxinas, al igual que ocurría con otro tipo de vacunas y con la idea de prevenir la enfermedad. Había que encontrar la dosis capaz de inducir una tolerancia al alérgeno; para ello se administraban dosis crecientes del mismo hasta crear una inmunotolerancia. El concepto persiste en la actualidad: la inmunoterapia antígeno específica se administra en dosis crecientes hasta inducir una inmunotolerancia.

Con el fin de reducir los efectos adversos de la inmunoterapia, como son las reacciones locales o reacciones sistémicas, como la urticaria, asma o incluso la anafilaxia, se desarrollaron extractos de alérgenos absorbidos en hidróxido de aluminio con el fin de que la absorción fuese más lenta (extractos depot), año 1937¹⁰. Posteriormente se trata de disminuir la actividad alérgica de los extractos, creando pequeñas cadenas de péptidos de bajo peso molecular, modificando los alérgenos químicamente tratándolos con aldehído, disminuyendo la alergenidad^{11,12}. En la década de los ochenta^{13,14}, con la aparición de los recombinantes y la caracterización molecular de los alérgenos, se sintetizan péptidos que contienen los epítopos de las células T, compitiendo así con los receptores de la IgE.

Hoy sabemos^{15,16} que la inmunoterapia modifica la respuesta humoral y celular frente al alérgeno. Por una parte, sabemos que hay una activación de la población Th1 y sus citoquinas en tejidos, con disminución de la población Th2 y sus citoquinas. Hay una activación de la IL-10 por monocitos y macrófagos. Esta IL-10, junto con TGFβ, contribuye a la activación de los Treg regulando y modulando la respuesta Th1/Th2.

En relación con los anticuerpos, sabemos que se induce una producción por las células B, de anticuerpos de la clase IgA, IgG1, IgG4. Estos anticuerpos (bloqueantes) compiten con los epítopos de la IgE inhibiendo la presentación del alérgeno por el complejo de alta afinidad.

Es curioso que, con 4 años de diferencia, Harold¹⁷ en 2004 y Carol Saltoun¹⁸ en 2008, publiquen el mismo título “Advan-

ces in upper diseases and allergen immunotherapy” y la preocupación siga siendo la misma: la eficacia y la seguridad de la inmunoterapia. Uno de los avances que supone la purificación de los alérgenos recombinantes, mediante ingeniería genética, es la posibilidad de producir fórmulas hipoalérgicas que reducen la unión a los Ac IgE, pero conservando los epítopos de las células T. De esta forma se reduce la alergenidad, lo que disminuye las reacciones a la inmunoterapia aumentando su seguridad, e incrementan la actividad inmunogénica favoreciendo la eficacia. Altas dosis de estas fórmulas hipoalérgicas pueden ser utilizadas reduciendo el riesgo de reacciones adversas, disminuyendo la respuesta Th2 y estimulando la activación Th1 y respuesta IgG4¹⁹. Por todas estas características, se sigue investigando en la posibilidad de vacunas preventivas, en niños de riesgo atópico, con el fin de activar una respuesta Th1.

Bibliografía

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook M. Physicochemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol.* 1966;97:75-85.
2. Johansson S, Bennich H. Immunoglobulin studies of atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology.* 1967;13:381-94.
3. Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen derp1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1988;85(1):127-9.
4. González Buitrago JM, Ferreira L, Isidoro-García M, Sanz C, Lorente F, Davila I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta.* 2007;385:21-7.
5. Jorge PPO, Tobias KRC, Ferriani VPL, Smith AM, Chapman MD, Arruda LK. Recombinant allergens for diagnosis of mite allergy in children with asthma and/or rhinitis: comparison with commercial extracts. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:S169.
6. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergy disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:409-18.
7. Casquete-Román E, Rosado Gil T, Postigo I, Pérez-Vicente R, Fernández M, Torres HE, et al. Contribution of Molecular Diagnosis of Allergy to the Management of Pediatric Patients With Allergy to Pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19:439-45.
8. Goikoetxea MJ, Cabrera-Freitag P, Sanz ML, M Fernández-Benítez. The importance of in vitro component-resolved diagnosis in paediatric patients. *Allergol Immunopathol.* 2010;38:37-40.
9. Freeman J, Noon L. Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *Lancet.* 1911;814-7.
10. Zoos A, Koch C, Hirose R. Alumrag weed precipitate: preparation and clinical investigation; preliminary report. *J Allergy.* 1937;8:329-35.
11. Attallah N, Sehon A. Isolation of haptenic material from ragweed pollen. *Immunochemistry.* 1969;6:609-19.
12. Marsh D, Lichtenstein L, Campbell D. Studies on “allergoids” prepared from naturally occurring allergens. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology.* 1970;18:705-22.
13. Larché M, Wrait DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nature Med.* 2005;11:S69-S76.
14. Jutel M. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin.* 2005;116:608-13.

15. Larché M, Cezmi A, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews*. 2006;761-71.
16. Rollan JM, Gardner LM, O'Hehir RE. Allergen related approaches to immunotherapy. *Pharmacology and Therapeutics*. 2009;121.
17. Harold S, Nelson MD. Advances in upper airway diseases and allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;(S1):S793-8.
18. Saultoun C, Ávila PC. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy in 2007. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):481-7.
19. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Pomés A. Recombinant allergens for immunotherapy. *Allergy Asthma Proc*. 2002;23(1):5-8.
20. Chapman MD. Use of non-stimulatory peptides: a new strategy for immunotherapy? *J. Allergy Clin Immunol*. 1991;88:300-3.
21. Holt PG, Macaubas C, Sly PD. Strategic targets for primary prevention of allergic disease in childhood. *Allergy*. 1998;53(45):72-6.
22. Platts-Mills TAE, Woodfolk JA. Cord blood proliferative responses to inhaled allergens: is there a phenomenon? *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:441-3.