



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Alergia a lipocalinas caninas

Autor: Noemí Gago Martín

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: Junio 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
3. OBJETIVOS	5
4. METODOLOGÍA.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1. Generalidades	6
5.2. Alergenicidad.....	7
5.2.1 Alérgenos lipocalina y sustancias coadyuvantes	7
5.2.2 Actividad directa contra las células inmunes	8
5.2.3 Respuesta inmune celular a los alérgenos lipocalina de mamíferos.....	9
5.3. Alérgenos del perro	13
5.3.1 Can f 1 y Can f 2.....	13
5.3.2 Can f 4	14
5.3.3 Can f 6	15
5.4. Reactividad cruzada.....	15
5.5. Alergia y asma.....	19
6. CONCLUSIONES.....	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21

1. RESUMEN

Las alergias constituyen un problema de salud muy importante hoy en día ya que están en continuo crecimiento. Dentro de los procesos alérgicos destacan los producidos por animales domésticos y en especial por el perro. Los principales alérgenos que causan estas reacciones alérgicas pertenecen a la familia de las lipocalinas. Las lipocalinas son moléculas extracelulares compuestas de 150-250 residuos de aminoácidos y se caracterizan por tener una estructura secundaria y terciaria común. Se encuentran en fluidos y secreciones de los animales. En cuanto a su alergenicidad se ha visto que inducen la producción de IgE específica. Su capacidad para promover la respuesta inmune (inmunidad Th2) podría ser producida por una sustancia asociada. Cuatro de los seis alérgenos caninos identificados pertenecen a la familia de las lipocalinas, estos son Can f 1, Can f 2, Can f 4 y Can f 6; siendo los principales Can f 1 y Can f 2.

Los anticuerpos IgE pueden unirse a epítomos similares de diferentes lipocalinas produciendo lo que denominamos reactividad cruzada. Esto podría ser producido por el parecido en la estructura tridimensional que presentan las distintas moléculas de esta familia; lo que provoca que un sujeto pueda presentar alergias múltiples, es decir, a varios animales de compañía.

Otro de los puntos de estudio de este trabajo es el riesgo de sufrir asma que presentan las personas que tienen mascotas en sus casas. Los niños con animales de compañía en casa desde su nacimiento tienen menor riesgo de sufrir asma pero también es verdad que los niños con problemas severos de asma tienen niveles muy altos de IgE a perros, gatos o caballos. En adultos el papel principal lo juega la genética.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La alergia es un desorden inmunológico en el cual la función errónea del sistema inmune está dirigida a sustancias ambientales inofensivas llamadas alérgenos. La respuesta inmune induce una reacción inflamatoria localizada que elimina el propio alérgeno sin dañar de forma extensa los tejidos del hospedador. Sin embargo, en ciertas ocasiones puede haber efectos nocivos y producirse una lesión tisular grave e incluso la muerte. A este desorden inmunológico se le llama hipersensibilidad y se distinguen cuatro clases diferentes en función del tipo de inmunorreacción que se desarrolla. Tres de ellos se producen dentro de la rama humoral y son mediados por anticuerpos o por inmunocomplejos; un cuarto tipo se incluye dentro de la rama mediada por células. En primer lugar se encuentra la hipersensibilidad mediada por IgE (tipo I), el antígeno induce el enlace cruzado de la IgE fija en mastocitos y basófilos con liberación de mediadores vasoactivos. La manifestación clínica más grave de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I es la anafilaxis sistémica. En segundo lugar, está la hipersensibilidad citotóxica mediada por IgG o IgM, en la que los anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie celular median la destrucción celular por activación del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El tercer tipo es la hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos, en la que los complejos Antígeno-Anticuerpo se depositan en diversos tejidos e inducen activación del complemento y células inmunes. En último lugar se encuentra la hipersensibilidad mediada por células, las células T colaboradoras tipo 1 (T_H1) sensibilizadas liberan citocinas que activan macrófagos o células T citotóxicas (T_C) que median la lesión celular directa.

Entre los síntomas de la hipersensibilidad tipo I cabe destacar la rinorrea, obstrucción de las vías aéreas, estornudos, picores y enrojecimiento cutáneo entre otros. Aunque en muchos casos los síntomas no posean especial gravedad, su importancia radica en el gran aumento de las enfermedades alérgicas que se está produciendo en los últimos años tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Este aumento es especialmente importante en los niños, en quienes se observa la mayor tendencia de aumento en las dos últimas décadas. Su alta prevalencia hace que la alergia sea considerada como un principal problema de salud. Según las estadísticas de la organización mundial de la salud (OMS) entre un 30-40% de la población mundial se ve afectada por esta

enfermedad y ve disminuida su calidad de vida, generando, además, un impacto negativo en el bienestar socio-económico de la sociedad. (1)

A todo esto se suma la creciente tendencia a tener en casa mascotas como ratones, perros o gatos. Los alérgenos de los animales se expanden fácilmente por el ambiente, llegando incluso a casas donde no habitan. Ha sido estimado que un 5-10% de la población mundial es alérgica al perro (2). El desarrollo de este tipo de alergia es emocionalmente complicado para los dueños de perros, ya que estos son considerados como un miembro más de la familia. Esto genera un problema a nivel mundial.

Este trabajo se centrará en la alergia a los alérgenos caninos por ser una de las más comunes hoy en día.

3. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este trabajo son:

- Realizar un estudio exhaustivo de las proteínas que pertenecen a la familia de las lipocalinas de mamíferos.
- Profundizar en el conocimiento de las lipocalinas caninas debido al aumento de personas alérgicas al perro en la sociedad actual.
- Analizar la reactividad cruzada de IgE que presentan las diferentes lipocalinas de animales domésticos con el fin de conocer mejor las alergias múltiples que presentan algunos sujetos.
- Investigar la relación que presenta el tener mascotas en casa con padecer asma tanto a nivel infantil como en adultos.

4. METODOLOGÍA

Se ha realizado un estudio bibliográfico, en el cual se han utilizado libros especializados en inmunología para establecer las bases del trabajo. A continuación se han estudiado artículos científicos relacionados con las lipocalinas de mamíferos y en particular del perro, así como artículos científicos sobre reactividad cruzada entre lipocalinas y su relación con el asma. Estas publicaciones se han obtenido de la base de datos Pubmed.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Generalidades

La mayoría de los alérgenos respiratorios importantes derivados de mamíferos, así como un alérgeno de la leche y unos pocos alérgenos de insectos, pertenecen a la familia de proteínas lipocalina. Son pequeñas moléculas extracelulares compuestas de 150-250 residuos. Las lipocalinas se caracterizan por tener una estructura secundaria y terciaria común compuesta por un barril beta formado por 8 láminas beta anti-paralelas (A-H en la figura 1) que forman una cavidad de unión a ligandos. A esta cavidad o bolsillo se unen moléculas pequeñas e hidrofóbicas. La mayoría de las lipocalinas contienen uno o más puentes disulfuro intramoleculares que ayudan a estabilizar el barril beta y a las propiedades adecuadas de unión para los ligandos. En cuanto a la estructura primaria, las diferentes lipocalinas muestran distintas características (3). Se pueden clasificar en dos subfamilias llamadas lipocalinas *kernel* o lipocalinas *outlier* en función de la presencia o ausencia de tres regiones estructuralmente conservadas (SCR1-SCR3). Los tres SCR están presentes en las lipocalinas *kernel* mientras que en las lipocalinas *outlier* tienen un máximo de dos SCR. El motivo SCR 1, incluye los residuos conservados GxW y está situado en el extremo N-terminal. El motivo SCR 2 está formado por T-D/N-Y-x-x-Yy conectando las láminas F y G y el SCR 3 está formado por residuos cargados (R/K) en la lámina H (Figura 1). SCR1 y SCR3 está presente en aproximadamente el 90% de todas las lipocalinas conocidas, mientras que SCR2 está presente en el 60% de ellas. Basándose en la similitud y análisis filogenéticos de nucleótidos / aminoácidos, las lipocalinas se han agrupado en 13 clases (4). Curiosamente, la disposición de genes de los intrones y exones está bastante conservada y apunta a un ancestro común en el reino animal.

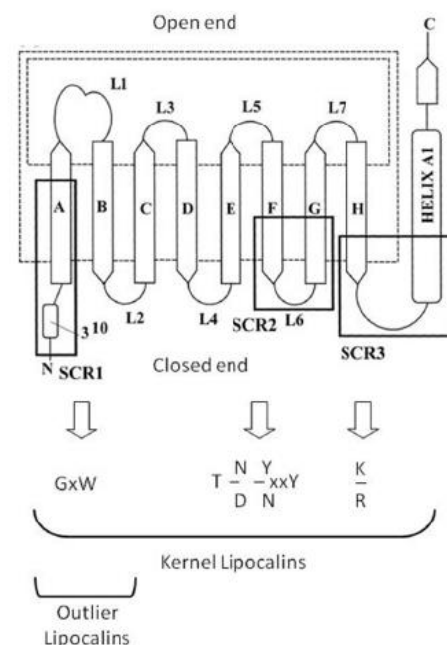


Figura 1: Estructura esquemática de una lipocalina. Las 8 láminas beta han sido llamadas A-H. (18)

Los alérgenos lipocalina de mamíferos están presentes en los fluidos corporales y secreciones como la caspa, la saliva y la orina. Una propiedad necesaria para que una proteína sea un alérgeno es que se disperse de manera eficiente en el medio ambiente para que pueda entrar en contacto con el sistema inmunológico humano. Como las lipocalinas están presentes en la caspa de animales y excreciones, este requisito se cumple. Inicialmente, se caracterizaron como proteínas transportadoras de pequeñas moléculas, principalmente hidrofóbicas, pero ahora se sabe que están involucradas en muchas otras funciones biológicas

Las lipocalinas también existen como proteínas endógenas en los humanos y la mayoría de ellas tienen cierto grado de identidad (40-60%) con las exógenas. La presencia de lipocalinas endógenas podría ser un factor favorable para el desarrollo de la respuesta inmune Th2 contra lipocalinas exógenas. (5)

Los alérgenos lipocalina no tienen ninguna función fisicoquímica, funcional o estructural conocida que explique su alergenicidad, es decir, la capacidad de inducir respuestas T-helper de tipo 2 contra ellas. Una característica distintiva de los alérgenos lipocalina de mamíferos es su pobre capacidad de estimular la respuesta inmune celular del sistema inmunológico humano o murino. Sin embargo, inducen la producción de IgE en una gran proporción de individuos atópicos expuestos a la fuente de alérgeno. La escasa capacidad para estimular el sistema inmune celular no parece ser el resultado de la función de las células T reguladoras. En lugar de ello, los epítomos de los alérgenos lipocalina de mamíferos reconocidos por células T son pocos y aquellos examinados han demostrado ser subóptimos.

Además, la frecuencia de células T CD4+ específicas de los alérgenos lipocalina de mamíferos es muy baja en la sangre periférica. Es importante destacar que, recientes investigaciones sugieren que las células T específicas de alérgenos lipocalina difieren considerablemente entre los sujetos alérgicos y sanos. (3)

5.2. Alergenicidad

5.2.1 Alérgenos lipocalina y sustancias coadyuvantes

Varios estudios realizados en los últimos años indican que la capacidad de una proteína para promover la respuesta inmune (inmunidad Th2) puede ser más bien una propiedad de una sustancia asociada con la proteína que una propiedad de la propia proteína. Entre

estas sustancias adyuvantes se incluyen partículas diésel, la enzima NADPH oxidasa del polen y la adenosina derivada del polen. Incluso se ha sugerido que la unión de lípidos puede ser una característica clave para muchos alérgenos ya que los lípidos pueden activar directamente la inmunidad innata.

Otra sustancia, la endotoxina [o lipopolisacárido (LPS)], un producto de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, está probablemente más relacionada con alérgenos lipocalina de mamíferos. En un estudio, se cultivaron células dendríticas procedentes de individuos sanos, con alérgenos lipocalina recombinantes libres de endotoxina tales como Mus m 1 (ratón), Can f 1 y 2 (perro), Bos d 2 (vaca) o Equ c 1 (caballo) o con alérgenos lipocalina naturales Bos d 2 en presencia o ausencia de LPS o solo LPS (sin alérgenos lipocalina), durante 24 horas. Se descubrió que los marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86 y “HLA-DR” de células dendríticas no fueron sobreexpresados en los cultivos sin extra de LPS. Sin embargo, cuando el LPS estaba incluido en los cultivos, las células dendríticas exhibían una fuerte sobreexpresión en los marcadores de superficie. De manera importante, el nivel de expresión no difería de aquellos inducidos solo por LPS. (6) Por lo tanto, es concebible que el LPS puede promover la alergenicidad de lipocalina y otros alérgenos. Aún no existen datos concluyentes de que los alérgenos lipocalina lleven sustancias inmunomoduladoras que favorezcan la alergia, pero esta hipótesis cada vez está cobrando más fuerza.

5.2.2 Actividad directa contra las células inmunes

Actividad enzimática: la alergenicidad de algunos alérgenos está implicada con su actividad enzimática, a través de múltiples mecanismos. La b-lactoglobulina (Bos d 5), un alérgeno de la leche, y lipocalina lagrimal, un homólogo humano de Can f 1 de perro, tienen actividad endonucleasa no específica. El ácido glutámico en la posición 128 en la lipocalina lagrimal, es importante para la actividad de la enzima. Este aminoácido se conserva en varios alérgenos de lipocalina, tales como Bos d 2, Mus m 1, Rat n 1, Equ c 1 y Can f 1. Curiosamente, como el aminoácido conservado también se encuentra en algunas lipocalinas humanas y en o junto a los epítomos reconocidos por células T inmunodominantes en Bos d 2 y Can f 1, pudiera estar implicado en la modificación de las células T humanas y, por tanto en la respuesta de las células T a los epítomos inmunodominantes de los alérgenos. Por el momento, la actividad enzimática de los alérgenos lipocalina distintos de Bos d 5 es desconocido. Tampoco está claro cuál podría ser el papel de esta actividad para la alergenicidad de Bos d 5. Uno de los

alérgenos de lipocalina de mamíferos mencionados anteriormente, Can f 1, tiene un alto nivel de homología secuencial con la proteína de la glándula Von Ebner lo que podría explicar que ambos presenten actividad como inhibidores de cistein proteasa. Aunque Can f 1 fuera un inhibidor de cisteín proteasas, la importancia de la propiedad para la alergenidad de Can f 1 no se conoce.

Unión a receptores: una serie de alérgenos han demostrado ser reconocidos activamente por los receptores de la inmunidad innata. Algunos otros alérgenos, incluyendo el alérgeno lipocalina del perro Can f 1, el cual está glicosilado, se une al **receptor de manosa** (presente en células presentadoras de antígenos). Los resultados sugieren, además, que el receptor de manosa está involucrado en la polarización Th2 a través de la baja regulación de indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO). Otros receptores para lipocalinas son **megalina** (en membrana plasmática de células epiteliales), **LIMR** del inglés *the lipocalin-interacting membrane receptor* (receptor endocítico que se encuentra en un gran número de células inmunes), **24p3R** (expresado en membranas plasmáticas de nefronas distales) y **Stra6** (receptor celular de la proteína de unión a retinol (vitamina A)). Su papel como receptores de los alérgenos de lipocalina no se sabe exactamente. Sin embargo, se ha demostrado que el alérgeno de la leche b-lactoglobulina (Bos d 5) se une a LIMR y se ha observado que media en la captación de otro alérgeno lipocalina, Equ c 1. En cuanto a otros receptores se ha visto que Bos d 2, Can f 1, Can f 2, Equ c 1 y Mus m 1 no se unen a megalina. Independientemente del efecto potencial inmunomodulador, la captación activa de un alérgeno puede facilitar su acceso al sistema inmune, como se especula para Bos d 5. Además, los alérgenos lipocalina de mamíferos no son capaces de inducir o inhibir la maduración de CD4 humanas, o de promover la proliferación o la polarización Th2 de las células T CD4 + *naive*. Por lo tanto, una característica de los alérgenos de lipocalina de mamíferos puede ser más bien su falta de respuesta con el sistema inmune.

5.2.3 Respuesta inmune celular a los alérgenos lipocalina de mamíferos

La respuesta inmune celular a los alérgenos lipocalina de mamíferos es débil: Aunque los alérgenos lipocalina de mamíferos inducen de manera eficiente la producción de IgE específica, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sujetos alérgicos clínicamente sensibilizados a los alérgenos de vaca Bos d 2, perro Can f 1, caballo Equ c 1 o rata Rat n 1 proliferaron muy débilmente a la estimulación con los alérgenos. Por otra parte, un análisis de la proliferación de células T CD4 + de sangre periférica de 15

sujetos alérgicos a Can f 1 por citometría de flujo sugirió que la frecuencia de precursores de las células T CD4 + de memoria reactivas contra alérgenos lipocalina es significativamente menor que para el antígeno microbiano estreptoquinasa.

Control de la Regulación de la capacidad de respuesta a los alérgenos lipocalina de mamíferos: Aunque las células T reguladoras, como CD4 + CD25 + FoxP3 + y células reguladoras inducibles tipo1 (Tr1), están evidentemente involucradas en el establecimiento de la tolerancia a los antígenos propios, su papel en el mantenimiento de la tolerancia a los alérgenos respiratorios comunes en sujetos sanos sin alergia está menos claro. En la exploración de la falta de respuesta a Bos d 2 en un modelo murino, se encontró que la débil respuesta inmune celular a Bos d 2 no estaba mediada por citocinas, tales como IL-4, IL-10, o factor de crecimiento transformante TGF- β .

Estudios realizados recientemente apoyaron la idea de que la débil reactividad celular a los alérgenos lipocalina de mamíferos no se rige por las células T reguladoras. Esto se vio cuando tras bloquear dichas células reguladoras, las respuestas proliferativas específicas de los sujetos alérgicos a Can f 1 o sanos no aumentaron cuando se estimularon con el alérgeno.(7)

Pocos epítomos de células T en los alérgenos lipocalina de mamíferos: mientras que los alérgenos de plantas a menudo contienen múltiples epítomos, muchos de los cuales son reconocidos por cada individuo, la situación es diferente con alérgenos lipocalina de mamíferos. En promedio, un individuo reconoce tres epítomos en Bos d 2, Can f 1 o Equ c 1. El número total de epítomos detectados en Bos d 2, por ejemplo, es de siete y el número máximo que las células T de un individuo puede reconocer es de cinco. Los epítomos reconocidos por células T en los alérgenos lipocalina examinados (Bos d 2, Can f 1, Equ c 1 y Rata n 1) no están distribuidos al azar a lo largo de las moléculas, si no que se concentran en unas pocas regiones. En Bos d 2 y Equ c 1, una de las regiones de epítomo en el extremo carboxi-terminal de las moléculas ha demostrado ser inmunodominante, mientras que en Can f 1, la reactividad de las células T es menos importante. Es importante destacar que la primera región de epítomo localizada está contenida en el motivo GXW, que también está presente en lipocalinas endógenas humanas.

Características de los epítomos de células T de los alérgenos lipocalina de mamíferos: Se han caracterizado en detalle dos epítomos de células T de dos alérgenos lipocalina

distintos, Bos d 2 y Can f 1. El epítipo de Bos d 2, situado en el péptido (p) 127-142, es inmunodominante, mientras que el epítipo de Can f 1, situado en (p) 105-120, es uno de los pocos de importancia comparable. El hallazgo fundamental con los dos epítipos era que son subóptimos. Se realizaron análogos de péptidos (ligandos peptídicos alterados, APLs) de los epítipos naturales, a los cuales se les llamó **heteróclitos**, que fueron capaces de estimular las células T en concentraciones menores que los ligandos naturales. La actividad heteróclita de estos péptidos se atribuyó a su reconocimiento más eficiente por el receptor de células T (TCR). Un estudio realizado mediante la tinción de p127-142 del Bos d 2 confirmó que la avidéz del TCR hacia los ligandos heteróclitos (superagonistas) fue mayor que la natural. Además de su mayor capacidad para inducir la proliferación de clones de células T, se encontró que los análogos de péptidos heteróclitos tenían un impacto cualitativo en la respuesta de células T *in vitro*. Por ejemplo, a la estimulación con los análogos heteróclitos de p127-142 de Bos d 2, los clones específicos de células T mostraron mayores relaciones de citocinas Th1 / Th2 que con la estimulación con p127-142 natural en concentraciones equimolares. Además, cuando las células T CD4+ se indujeron con p127-142 y su análogo heteroclíptico pN135D, las líneas inducidas con el ligando natural eran predominantemente del fenotipo Th2 / Th0, mientras que las líneas inducidas con el análogo heteroclíptico eran del fenotipo Th1 / Th0. Sin embargo, no se observó un cambio cualitativo similar en el fenotipo de citocinas en las células T CD4+ inducidos con los análogos heteróclitos de p105-120 de Can f 1, a pesar de que la mayoría tendían a ser más estimulantes que el péptido natural.

En resumen, estos experimentos sugieren que el reconocimiento de células T puede estar implicado en la modificación de la calidad de la respuesta inmune.

Repertorios de células T específicas para alérgenos lipocalina de mamíferos: Estudios recientes sugieren que los repertorios de células T CD4+ específicas de alérgenos pueden diferir notablemente entre sujetos alérgicos y no alérgicos. Esto también parece ser el caso de células T específicas de alérgenos lipocalina, en que la frecuencia de **células Th de memoria** específicas de Can f 1 y Bos d 2 en sujetos alérgicos es mayor que en los no alérgicos.

La frecuencia media (\pm SEM) de las células en los cultivos fue de $0,38\% \pm 0,19\%$ para sujetos alérgicos y aproximadamente la mitad para los sujetos no alérgicos. Se calculó

que la frecuencia de células T específicas de memoria de Bos d 2 p127-142 en la sangre periférica de sujetos con alergia está en el rango de 10^{-5} y 10^{-6} en células T CD4 + circulantes.

Teniendo en cuenta los resultados de las células T CD4 + de memoria, es destacable que la diferencia de frecuencia entre los sujetos alérgicos y no alérgicos a Bos d 2 parece ser mínima en las **células T naive**, puesto que este tipo de células fueron detectadas en los cultivos de todos los sujetos, tanto con o sin alergia con frecuencias medias semejantes en ambos grupos, $0,81\% \pm 0,38\%$ y $0,61\% \pm 0,35\%$, respectivamente. (7)

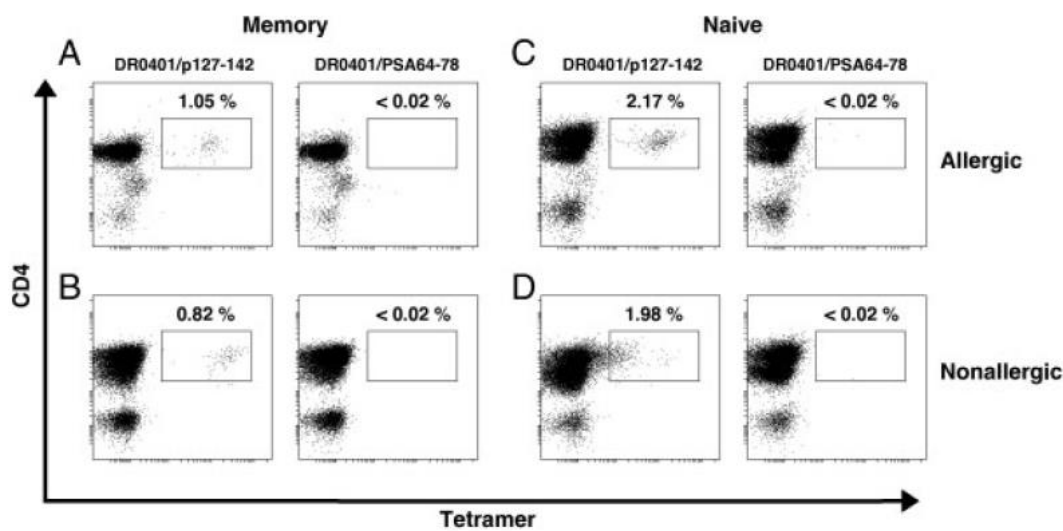


Figura 2: Diferencias en la detección de células T de memoria y T naive entre sujetos alérgicos (A y C) y no alérgicos (B y D). (8)

Además en un método alternativo se vio que las células T naive podían ser activadas a partir de sujetos alérgicos (8,5%) aproximadamente dos veces más a menudo que a partir de sujetos sanos.

En resumen se podría decir que las lipocalinas de mamíferos producen **respuesta inmune humoral** (típica Th2) y producción de IgE. Los mecanismos que explican esto no están del todo claros, por un lado puede ser que los alérgenos lipocalina necesiten de sustancias coadyuvantes o que sea mediante sus actividades enzimáticas o unión a diferentes receptores. Por otro lado, inducen de manera poco eficiente la **respuesta inmune celular**, no se conoce exactamente el motivo pero si se sabe que no es debido a la actividad de células reguladoras y que sus epítomos son reconocidos de manera poco

eficiente por los receptores de células T. Si se han observado células Th de memoria en pacientes alérgicos.

5.3. Alérgenos del perro

Cuatro de los seis alérgenos caninos identificados pertenecen a la familia de las lipocalinas, estos son Can f 1, Can f 2, Can f 4 y Can f 6. (9)

5.3.1 Can f 1 y Can f 2

Los principales alérgenos del perro son Can f 1 y Can f 2, ambos pertenecen a la familia de proteínas lipocalinas. La caracterización de estos dos alérgenos aún no está completada.

Can f 1 está compuesta de 148 aminoácidos y Can f 2 de 161. En relación con la homología, la secuencia de aminoácidos de Can f 1 muestra un 24,5% de identidad con Can f 2. En las dos proteínas hay tres residuos de cisteína, esto sugiere la posibilidad de que exista un puente disulfuro intra o intermolecular. Un puente disulfuro en las proteínas del grupo lipocalina, como por ejemplo en la lipocalina humana lagrimal, afecta a su estructura molecular, influyendo así en su funcionamiento (figura 3).

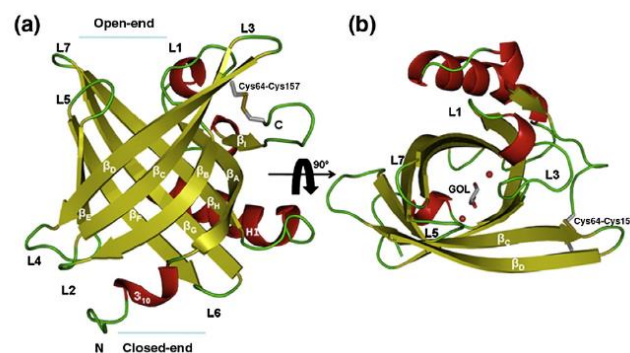


Figura 3: Estructura tridimensional de rCan f 2. (a) Las ocho láminas antiparalelas que componen el barril beta están etiquetadas como β_A - β_H . Una lámina beta adicional (β) está localizada en el extremo C-terminal. Los giros (L) y las hélices alfa están mostradas en verde y rojo respectivamente. (b) Visión de la molécula desde otra perspectiva (con un giro de 90°).

Can f 1 es más alergénico que Can f 2, el 70% de los pacientes muestran señales de alergenicidad a Can f 1 pero solo un 20% reaccionan a Can f 2. En un estudio realizado por PCR-RT, se comparó la expresión de mRNA de Can f 2 con la de Can f 1 en glándulas salivares y piel de perro. Can f 1 fue detectado en saliva en una concentración de 5,3 ng/ μ g de proteína y Can f 2 en una concentración de 19,4 ng/ μ g de proteína.

Todavía no hay una explicación de por qué Can f 2 es menos alergénico que Can f 1 incluso estando el primero en concentraciones mayores. (10)

Distribución tisular de Can f 1 y Can f 2: en varios estudios realizados se ha visto que el mRNA de Can f 1 se encuentra en el tejido epitelial de la lengua (glándula de Von Ebner) pero no en la glándula parótida ni en la piel; mientras que el mRNA de Can f 2 fue encontrado predominantemente en la glándula parótida y en menor extensión en el tejido lingual pero no en piel. (11)

Homología entre los alérgenos del perro y proteínas relacionadas:

La comparación de la secuencia de aminoácidos revela que Can f 1 muestra una homología mayor a las proteínas de la glándula Von Ebner (VEG) humana y de rata mientras que Can f 2 es más similar a la proteína urinaria de ratón (MUP) y a su homóloga de rata.

5.3.2 Can f 4

Can f 4 es una proteína lipocalina compuesta por 158 aminoácidos expresada en el tejido epitelial de la lengua de los perros. Este alérgeno se encuentra principalmente en su saliva y piel. En un análisis llevado a cabo usando el suero de 37 personas alérgicas al perro, mostró que el 35% de estos individuos tenían IgE contra Can f 4. Además, uno de los pacientes alérgicos tuvo una reacción de IgE sin tener respuesta a otros alérgenos del perro, esto sugirió que Can f 4 es un alérgeno importante y puede también actuar de manera independiente para conducir a una alergia.

Al analizar la estructura de esta lipocalina se vio que dos cisteínas (Cys62 y Cys154) formaban un puente disulfuro, a parte de la estructura principal, este análisis reveló la presencia de dos modificaciones en la proteína. La glutamina N-terminal se había ciclado en un ácido carboxílico pirrolidínico; además, la proteína había sido parcialmente oxidada (probablemente solo un residuo de metionina) difiriendo de la forma principal. La determinación de la estructura cristalina mostró que uno de los tres residuos de metionina de Can f 4 (Met92) está localizado en la cara de la proteína siendo más vulnerable a la oxidación.

Las lipocalinas son conocidas por su capacidad de unirse y transportar moléculas pequeñas e hidrofóbicas como ácido grasos y feromonas. El ligando específico y por tanto el papel biológico de Can f 4 aún es desconocido. La estructura cristalina de esta

lipocalina muestra que el sitio de unión a ligando está localizado en el centro del barril beta típico de las lipocalinas. Un gran número de cadenas hidrofóbicas forman parte de la cavidad, en total 18 residuos definen su forma. La cavidad contiene solo dos residuos polares (figura 4). (2)

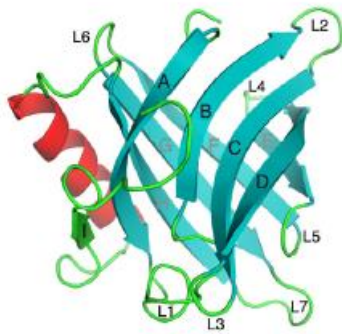


Figura 4: Las ocho láminas beta antiparalelas formando un barril central están representadas en color cian etiquetadas de la A a la H. (2)

5.3.3 Can f 6

Este alérgeno ha sido el descubrimiento más reciente dentro de la familia de las lipocalinas caninas. Se descubrió cuando se investigaba sobre la reactividad cruzada que presentan los diferentes alérgenos del perro.

El alérgeno lipocalina Can f 6 está formado por 190 aminoácidos, donde los 15 primeros forman lo que se denomina un péptido señal. Esta lipocalina tiene un peso molecular de 20,193 kDa y se presenta en forma de monómero. Se ha podido encontrar en piel y orina mientras que no se ha observado en lengua y glándulas submandibulares.

En un estudio llevado a cabo se vio que el 38% de los sujetos alérgicos a los alérgenos caninos lo eran a Can f 6. Esto sugirió que Can f 6 era más frecuente que Can f 2 y Can f 4. Además, algunos de los sujetos que presentan reactividad contra esta lipocalina no la presentan hacia Can f 1 o Can f 2, lo que significa, que puede causar alergia por sí misma. (12)

5.4. Reactividad cruzada

Los anticuerpos IgE pueden unirse a epítomos parecidos de diferentes alérgenos homólogos, esto es lo que se define como reactividad cruzada.

Conocer la reactividad cruzada que presenta IgE entre los diferentes alérgenos lipocalina es importante por varias razones. Por un lado, se puede predecir el riesgo de

desarrollar reacciones alérgicas a otras fuentes de alérgenos parecidas, además, mejorar la identificación de sensibilización a alérgenos específicos y por último, desarrollar nuevas terapias para tratar las alergias. Así mismo, la reactividad cruzada de IgE puede estar implicada también en la regulación de la respuesta inmune a alergias.

Las proteínas que tienen entre sí gran parecido en su secuencia de aminoácidos suelen tener una estructura tridimensional similar. Sin embargo, en estudios recientes con alérgenos de plantas se ha visto que la reactividad de IgE puede ser debida más a la semejanza en su estructura tridimensional que a su gran similitud en la secuencia de aminoácidos. Los alérgenos lipocalina tienen una identidad secuencial aproximadamente de un 20% o incluso más baja, pero comparten una estructura 3D parecida.

En un estudio se abarcaron dos vertientes; por un lado se quería comprobar la reactividad de IgE de pacientes alérgicos a sus correspondientes alérgenos recombinantes. Para ello mediante un ELISA se puso en contacto el suero de dichos pacientes alérgicos al perro, caballo, vaca y ratón con sus respectivos alérgenos recombinados rCan f 1 y rCan f 2, rEqu c 1, rBos d 2 y rMus m 1. La prevalencia de los pacientes alérgicos al perro sensibilizados con Can f 1 y 2 fue del 42% y del 16% respectivamente. El 83% de los pacientes alérgicos a la vaca fueron sensibilizados a Bos d 2, mientras que el 76% de los pacientes alérgicos al caballo lo fueron a Equ c 1. El 66% de los pacientes alérgicos al ratón tuvieron IgE específicos a Mus m 1. Los niveles de IgE entre los sujetos control y los alérgicos fueron diferentes y estadísticamente significativos, excepto en el caso de Can f 2. Se vio que todos los pacientes que daban IgE positivo a Can f 2, eran también positivos a Can f 1 (figura 5).

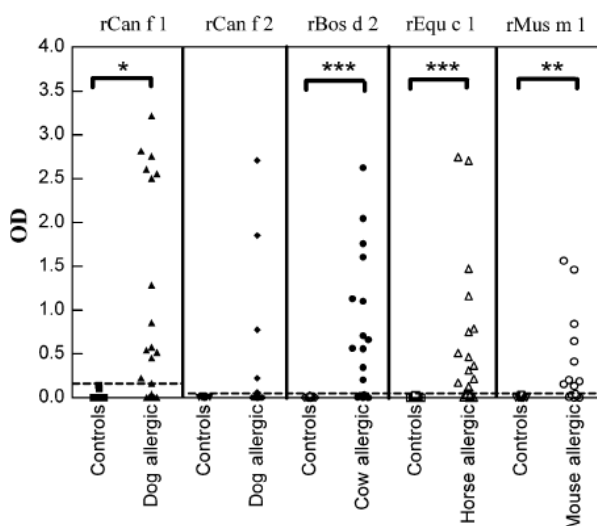


Figura 5: Reactividad de IgE a los alérgenos del perro (Can f 1 y Can f 2), vaca (Bos d 2), caballo (Equ c 1) y ratón (Mus m 1) de pacientes alérgicos y no alérgicos medido en un ELISA. Los valores $OD < 0,15$ han sido desechados. Los niveles de IgE entre pacientes control y alérgicos muestran diferencias significativas a excepción de Can f 2. (13)

La segunda vertiente que abarcaron fue examinar la reactividad cruzada de IgE entre las diferentes lipocalinas. Se incubaron diferentes sueros, uno rico en IgE específica contra rCan f 1, otro con IgE contra rTL, otro contra rCan f 2 y el último contra rMus m 1. A todos ellos se les añadió los diferentes alérgenos a estudio. Los resultados mostraron que rTL inhibía de manera dosis-dependiente la unión de IgE a rCan f 1, para conseguir una inhibición del 50% se necesitaba una dosis unas 400 veces mayor del primer alérgeno que del segundo. Esto también ocurría al revés, es decir, rCan f 1 podía inhibir la unión de IgE a rTL. Por otro lado, la incubación del suero de rCan f 2 junto con rCan f 1 se inhibía de una manera débil la unión de IgE a rCan f 2. Sin embargo, rCan f 2 no podía evitar la unión de IgE a rCan f 1. La situación era parecida con rEqu c 1 y rMus m 1, mientras que rEqu c 1 podía inhibir la unión de IgE a rMus m 1, este último no podía evitar la unión de IgE a rEqu c 1. No se vieron reactividades cruzadas entre Bos d 2 y las otras lipocalinas del estudio.

Hay que concluir que la lipocalina lagrimal humana y Can f 1 tienen la mayor similitud secuencial (61%) entre las proteínas examinadas y presentan la reactividad cruzada más fuerte. Sin embargo, esta reactividad cruzada también puede suceder con parecidos inferiores como se vio entre Mus m 1 y Equ c 1 (con identidad del 46%) y entre Can f 1 y Can f 2 (23%). La secuencia alineada y la estructura tridimensional sugieren que muchos sitios en la superficie de las proteínas pueden participar en la reactividad cruzada de IgE. Además, la comparación de las superficies entre Mus m 1 y Equ c 1 sugieren que una zona similar pudiera ser el epítipo de la reactividad cruzada.

La reactividad cruzada pudiera ser asimétrica, en ese caso los alérgenos tendrían sitios de unión para IgE comunes y únicos. Éste probablemente sea el caso para Mus m 1 y Equ c 1 y con Can f 1 y Can f 2, porque la reactividad cruzada no era recíproca entre las parejas. Hay otra posible explicación para este fenómeno, por ejemplo una proteína dimérica podría tener un potencial alergénico mayor que un monómero porque la dimerización podría crear epítopos para IgE adicionales (figura 6). (13)

En una investigación paralela, se vio que Can f 6 tiene homología con Equ c 1 y Fel d 4. Comparado con Can f 6, Can f 1 y 4 comparten una baja identidad secuencial con Fel d 4 y Equ c 1, lo cual podría explicar la falta de reactividad cruzada entre estos alérgenos. (12)

5.5. Alergia y asma

La prevalencia de alergia a los animales domésticos ha aumentado considerablemente y la alergia a perros o gatos o a ambos ha sido considerado un factor de riesgo en el desarrollo de asma y rinitis. Los individuos pueden sensibilizarse a alérgenos específicos y después experimentar síntomas de asma cuando se exponen a ellos. (9)

El asma es una enfermedad muy frecuente, aunque su prevalencia varía mucho en los diferentes países. Con respecto a Europa, por ejemplo Reino Unido e Irlanda tienen los ratios más altos, con un 20,7% y 15,2% respectivamente; mientras que en el este de Europa tienen los niveles más bajos de todos. De acuerdo a esto, es importante mencionar que la exposición a mascotas también es muy distinta en los diferentes países, siendo más frecuente en los países del oeste de Europa.

Relacionar la exposición a los alérgenos de las mascotas como factor de riesgo para el asma ha sido complicado ya que los sujetos con asma tienden a no tener animales en casa pudiendo dar lugar esto a conclusiones erróneas como que poseer mascota aporta un efecto protector. (15)

En un meta-análisis llevado a cabo por un grupo de investigación se vio que la exposición a las mascotas incrementaba el riesgo de asma y dificultades respiratorias en niños mayores de 6 años, mientras que en niños menores de esa edad se observó un menor riesgo en expuestos que en no expuestos. Esto significaba que la relación entre tener animales de compañía en casa y tener asma dependía de la edad del sujeto.

Uno de los mecanismos que se propuso para justificar esta protección en los primeros años de vida era la promoción de respuesta Th1 frente a Th2.

Dos estudios de cohortes apoyaron la hipótesis anterior. En una cohorte de 402 niños entre los 5 y los 8 años la incidencia acumulada de asma fue menor entre los niños que tenían mascota en casa durante su primer año de vida. En otro estudio de cohorte de 2531 niños estudiados durante 4 años desde el nacimiento, el riesgo de asma fue menor en niños con animales de compañía desde el nacimiento. (16)

En un estudio paralelo se investigó a niños con alergia a mascotas comparando los patrones de sensibilización a los alérgenos en niños con problemas severos y problemas controlados de asma. Los principales hallazgos fueron que los niños con problemas severos de asma tenían niveles muy altos de IgE hacia gatos, perros o caballos comparados con niños con asma controlada y eran más propensos a ser múltiplemente sensibilizados a animales domésticos, es decir, la multisensibilización hacia lipocalinas se relacionó con problemas asmáticos severos. (17)

Es posible que la aparición de asma en la infancia sea diferente de aquella que aparece en la edad adulta como causa genética o del medio ambiente. Estudios llevados a cabo en Italia evaluaron la aparición del asma en la edad adulta en relación a la exposición de las mascotas. La población de estudio estaba comprendida entre los 0 y los 69 años, solo se consideró a aquellos que tenían mascota en el momento del estudio. La aparición de asma no fue relacionada con tener mascotas. En otro estudio en Canadá de edades comprendidas entre los 20 y los 44 años de edad, el riesgo de asma sí fue relacionado con tener mascotas con un OR de 1.6 para gatos y perros y de un 1.7 para otras mascotas con un IC del 95%. La presencia de mascotas en la infancia no tenía influencia en el desarrollo de asma en adultos.

Los resultados parecen algo confusos puesto que cada estudio obtuvo unas conclusiones distintas, pero sí que es verdad que, estudios previos han mostrado que enfermedades de atopia en los padres así como otras alergias es un determinante importante para la aparición del asma en adultos, siendo este el determinante más fuerte. Con esto se puede concluir que la genética tiene un gran papel en la aparición del asma en adultos y el papel de las mascotas no es tan determinante como se había supuesto en un principio. (16)

6. CONCLUSIONES

Las proteínas lipocalinas constituyen una de las familias de alérgenos más importantes. Son moléculas tanto exógenas como endógenas y la principal fuente de donde proceden son los animales de compañía. Su importancia como alérgenos radica en la eficiente producción de IgE que causan ya que apenas hay respuesta por parte de las células mononucleares. Existen cuatro lipocalinas caninas causantes de un gran número de alergias Can f 1, 2, 4 y 6 que se encuentran en fluidos y secreciones del perro. La

semejanza que presentan todas las proteínas lipocalinas en su estructura tridimensional hace que tenga lugar el fenómeno de reactividad cruzada, es decir, que un mismo sujeto presente alergia a diferentes lipocalinas de distintos animales, el saber esto hace que sea posible la anticipación en el conocimiento de otras posibles alergias presentes en un individuo. Del mismo modo, se ha estudiado la relación de estar en contacto con mascotas y el desarrollo de asma, llegando a la conclusión de que depende de la edad del sujeto. En recién nacidos parece ser un factor de protección frente al asma, mientras que en niños más mayores sí se relaciona como factor de riesgo. En adulto sin embargo, hay que concluir que el papel principal lo juega la genética.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Holgate ST, Lockey RF. Libro Blanco sobre Alergia de la WAO 2011- Resumen Ejecutivo Ruby Pawankar Giorgio Walter Canonica. 2012;
2. Niemi MH, Rytönen-Nissinen M, Jänis J, Virtanen T, Rouvinen J. Structural aspects of dog allergies: The crystal structure of a dog dander allergen Can f 4. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;61(1):7-15. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589014000832>
3. Virtanen T. Lipocalin allergens. *Allergy*. 2001;56 Suppl 6(14):48-51.
4. Hilger C, Kuehn A, Hentges F. Animal lipocalin allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(5):438-47.
5. Juntunen R, Liukko A, Taivainen A, Närvänen A, Durand G, Kauppinen A, et al. Suboptimal recognition of a T cell epitope of the major dog allergen Can f 1 by human T cells. *Mol Immunol*. 2009;46(16):3320-7.
6. Parviainen S, Kinnunen T, Rytönen-Nissinen M, Nieminen a., Liukko a., Virtanen T. Mammal-derived respiratory lipocalin allergens do not exhibit dendritic cell-activating capacity. *Scand J Immunol*. 2013;77(3):171-6.
7. Virtanen T, Kinnunen T, Rytönen-Nissinen M. Mammalian lipocalin allergens - insights into their enigmatic allergenicity. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 9 de abril de 2012 [citado 17 de marzo de 2015];42(4):494-504. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2011.03903.x>
8. Kinnunen T, Nieminen A, Kwok WW, Närvänen A, Rytönen-Nissinen M, Saarelainen S, et al. Allergen-specific naïve and memory CD4+ T cells exhibit functional and phenotypic differences between individuals with or without allergy. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2460-9.

9. Konradsen JR, Fujisawa T, van Hage M, Hedlin G, Hilger C, Kleine-Tebbe J, et al. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015;135(3):616-25. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674914011993>
10. Kamata Y, Miyanomae A, Nakayama E, Miyanomae T, Tajima T, Nishimura K, et al. Characterization of dog allergens Can f 1 and Can f 2. 2. A comparison of Can f 1 with Can f 2 regarding their biochemical and immunological properties. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(4):301-8.
11. Konieczny a, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer a W, Bond JF, et al. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology*. 1997;92(4):577-86.
12. Nilsson OB, Binnmyr J, Zoltowska a., Saarne T, Van Hage M, Grönlund H. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: The role in cross-reactivity with cat and horse. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2012;67(6):751-7.
13. Saarelainen S, Rytönen-Nissinen M, Rouvinen J, Taivainen a., Auriola S, Kauppinen a., et al. Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(2):374-81.
14. Madhurantakam C, Nilsson OB, Uchtenhagen H, Konradsen J, Saarne T, Högbom E, et al. Crystal Structure of the Dog Lipocalin Allergen Can f 2: Implications for Cross-reactivity to the Cat Allergen Fel d 4. *J Mol Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;401(1):68-83. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.043>
15. Takkouche B, González-Barcala FJ, Etmnan M, Fitzgerald M. Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: A meta-analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2008;63(7):857-64.
16. Jaakkola JJK, Jaakkola N, Piipari R, Jaakkola MS. Pets, parental atopy, and asthma in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(5):784-8.
17. Konradsen JR, Nordlund B, Onell A, Borres MP, Grönlund H, Hedlin G. Severe childhood asthma and allergy to furry animals: Refined assessment using molecular-based allergy diagnostics. *Pediatr Allergy Immunol* [Internet]. 2014;25(2):187-92. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1111/pai.12198>
18. Garcia MR, Dirigida V, Ganfornina D. TESIS DOCTORAL : Lazarillo and related Lipocalins : ligands and functions.