Revisión

Reacciones cruzadas entre alergenos: implicación de los carbohidratos

R. Rodríguez, M. Villalba

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid.

REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ALERGENOS

De todos es sabido que la reacción alérgica, en un individuo hipersensible a una sustancia dada, surge ante un segundo encuentro con la fuente alergénica, después de un contacto inicial con ella. El primero de tales contactos sensibiliza al individuo frente a tal alergeno, induciendo la síntesis de IgE específicas de dicho alergeno y preparando así su organismo para responder con mayor eficacia a posteriores encuentros con él. En estos contactos, la población de anticuerpos sintetizados desencadena una respuesta inflamatoria diversa que da lugar a los síntomas clínicos característicos de la alergia tipo-I.

Sin embargo, un individuo puede sufrir procesos de alergia frente a sustancias o materiales con los cuales nunca ha tenido contacto previo. Ello puede ser explicado por el hecho de que la fuente de alergia comparta una sustancia alergénica con otro material con el que el paciente sí haya tenido relación directa y que aportó el agente sensibilizante en aquel primer encuentro. Ante este tipo de acciones, se dice que existe reactividad cruzada entre ambos materiales: el individuo posee IgE responsables de esa actividad y será hipersensible indistintamente a una u otra fuente de alergia.

Pero, la identidad estructural de los agentes alergénicos que conducen a la reactividad cruzada no ha de ser necesariamente absoluta. Basta con que exista una cierta similitud molecular, en algunos casos incluso mínima. Basta con que compartan un epítopo alergénico.

Naturaleza de los agentes implicados en la reactividad cruzada

La mayor parte de los alergenos de origen natural son de naturaleza polipeptídica. Pero muchas proteínas alergénicas poseen además grupos químicos de diferente naturaleza, siendo los más frecuentes los carbohidratos. Así, tanto las proteínas como los glicanos constituyen los mejores candidatos para ejercer un papel en la reactividad cruzada entre diversas fuentes alergénicas naturales.

La mayor parte de las células de un organismo comparten numerosas funciones, y cada una de estas funciones están ejecutadas por la misma proteína. Este concepto podemos extenderlo a células de diferentes organismos. En general, idénticas funciones son desempeñadas en organismos distintos por la misma proteína. Sin embargo, la estructura de esa proteína puede diferir de unas especies biológicas a otras en un grado muy diverso, constituyendo una familia de proteínas homólogas. La similitud entre ellas viene frecuentemente regida por la proximidad filogenética de las especies comparadas. Tanto más parecidas serán las secuencias de aminoácidos (también llamadas estructuras primarias) de las proteínas con idéntica función cuanto más cercanas se encuentren las especies en el árbol evolutivo. Así, si la reactividad cruzada depende de la similitud de estructuras, tanto mayor probabilidad de ofrecer tales reacciones presentarán las proteínas alergénicas procentes de fuentes biológicas distintas cuanto más relacionadas filogenéticamente se encuentren éstas.

Además de las proteínas, los azúcares pueden también encontrarse implicados en reacciones

cruzadas. Como discutiremos más adelante con mayor profundidad, ello se debe a la confluencia de estructuras, esto es, a la restringida diversidad de sus estructuras alergénicas.

Factores que condicionan la existencia de reactividad cruzada

Del análisis de la naturaleza y función de las moléculas principalmente implicadas en la reactividad cruzada se puede desprender que hay tres factores que favorecen su existencia:

a) Una estructura molecular altamente conservada

Del propio concepto de reactividad cruzada se deduce que ésta será posible cuando el alergeno, casi siempre una proteína, posea una secuencia de aminoácidos muy parecida en las diversas fuentes alergénicas en las que se encuentre. Esa similitud estructural puede y suele ocurrir, como ya hemos comentado, entre proteínas con idéntica función biológica en las distintas especies. A menudo, la función de la proteína ejerce una presión conservativa tan fuerte que no es posible alterar apenas su secuencia en un gran número de posiciones de la cadena polipeptídica sin que se perturbe su actividad biológica; incluso, ciertos cambios pueden desembocar en una proteína totalmente inactiva. La coincidencia de estructuras entre proteínas homólogas será tanto mayor cuanto más sometida se encuentre a restricciones conformacionales. Ello se traduce en el hecho de que la molécula debe poseer una estructura sumamente conservada a lo largo de las diversas especies, por lo que, si la proteína es alergénica, la reactividad cruzada debida a ella será altamente probable. Así, por ejemplo, una proteína que posea múltiples ligandos con los que debe establecer numerosos contactos, en los que son insustituibles determinados aminoácidos de la cadena polipeptídica -frecuentemente residuos expuestos al medio acuoso circundante-, son las candidatas más idóneas para encontrarse involucradas en las reacciones cruzadas. Cuando, por el contrario, la permisividad a los cambios secuenciales es grande, esto es, la proteína presenta actividad biológica aún disponiendo de estructuras primarias poco similares, la reactividad cruzada es más improbable: las diferencias estructurales entre el alergeno original y su homólogo pueden ser detectadas por los anticuerpos específicos del primero, y no ser capaces de reconocer en el homólogo los epítopos correspondientes, lo que se traduce en una ausencia de alergenicidad por parte de este último en los pacientes sensibles al alergeno original.

En el primero de los casos se encuentran dos alergenos a los que se ha atribuido un importante papel en la reactividad cruzada[1]: Bet v 1 -alergeno principal del polen de abedul- y sus homólogas en otros pólenes, y las profilinas. Ambas familias de proteínas poseen secuencias suficientemente conservadas en numerosas especies para ser reconocidas en mayor o menor grado por los anticuerpos IgE producidos por la estimulación con cualquiera de sus homólogos. Mucha menor similitud secuencial presentan, sin embargo, Ole e 1, Lol p 11 y sus equivalentes de otros pólenes no relacionados filogenéticamente como el de maíz o el de abedul, evitándose así la alergenicidad cruzada entre especies evolutivamente alejadas. Así, difícilmente dichos alergenos serán responsables de tal reactividad entre los pólenes de oleáceas y gramíneas, o betuláceas.

b) Coincidencia de tejido

Lógicamente, la presencia de proteínas con idéntica función biológica -y por tanto con estructuras semejantes- se acentúa en tejidos homólogos. Las células de los tejidos poseen muchas proteínas especializadas en desempeñar funciones propias de dicho tejido, y que son diferentes de las de otros órganos. Por ello, la reactividad cruzada será tanto más probable e intensa cuanto más relacionados se encuentren los tejidos alergénicos. Por ejemplo, la frecuencia de esta reactividad será superior entre los propios pólenes de diversas especies de plantas que con los frutos, las semillas, las hojas; o bien los epitelios de animales domésticos entre sí, o entre las esporas de hongos, o entre los excrementos de ácaros, etc.

Se salen de este patrón proteínas ubicuas, que poseen una actividad universal, indispensable para muchos tipos de células, por lo que se pueden encontrar en cantidades detectables desempeñando un papel relevante en la reactividad cruzada. Este es el caso de las profilinas, y quizás la tropomiosina y proteínas ligantes de calcio, de más reciente implicación en estos procesos de reactividad cruzada.

c) Proximidad filogenética de las especies alergénicas

La similitud estructural entre proteínas homólo-

gas es mayor para las procedentes de fuentes alergénicas filogenéticamente cercanas. La presión evolutiva no ha dispuesto del tiempo suficiente para crear y aceptar los mismos cambios en la estructura de una proteína de dos especies próximas que los que pueden mostrarse entre dos más alejadas. Esta consideración permite agrupar, por un lado, las especies biológicas animales, por otro lado, las vegetales y finalmente los microorganismos, teniendo presente que dentro de cada grupo especies muy próximas poseerán más probabilidad de compartir alergenos que aquéllas menos relacionadas. Por ejemplo, los pólenes de betuláceas presentarán más frecuentemente reacciones cruzadas entre ellos, que con los de oleáceas o con los de gramíneas.

En algunas ocasiones, no es necesario que la similitud estructural entre las proteínas alergénicas se extienda a la molécula completa para que tenga lugar la reactividad cruzada entre ellas. Basta con que el parecido exista en una pequeña parcela del polipéptido para que los anticuerpos IgE puedan unirse al antígeno. Esta situación puede ser ilustrada mediante los «motivos funcionales». Se trata de regiones muy definidas de la estructura de las proteínas, frecuentemente de carácter conformacional (es decir, tridimensional), que poseen funciones específicas en proteínas muy diferentes, funciones tales como catalítica, receptora de un ligando concreto -que puede ser un simple ion-, sustrato de una actividad ajena, etc. La conservatividad de la estructura de estos «motivos» suele ser muy alta, precisamente para preservar esa función característica, y cambios mínimos en ella dan lugar a proteínas inoperantes. Un ejemplo de este tipo de estructura polipeptídica serían los bucles característicos de unión del ion calcio, motivos funcionales muy difundidos a lo largo de un gran número de proteínas, proteínas muy diversas y con funciones particulares diferentes. Su presencia en la estructura polipeptídica tridimensional en lugares de alta exposición al medio acuoso, su gran conservatividad, su notable polaridad (ricos en aminoácidos de carácter ácido), su ubicuidad, y su estabilidad en presencia del ion, hacen de ellos firmes candidatos a constituir determinantes alergénicos responsables de numerosas reacciones cruzadas entre una amplia diversidad de especies.

Además de los factores mencionados, existen otros secundarios que condicionan la expresión de las reacciones cruzadas, como son la solubilidad del alergeno o su abundancia en la fuente biológica. Pequeños cambios en la secuencia de una proteína pueden afectar profundamente a su solubilidad, por ejemplo la sustitución de un residuo polar de la superficie de la proteína -como un residuo de aspártico- por uno de carácter hidrofóbico como sería una valina. Esta alteración, además de rebajar la solubilidad del polipéptido, puede inducir la autoasociación de las moléculas formando agregados difícilmente extraíbles en sistemas acuosos, y por ello menos capaces de inducir procesos alérgicos. Por otro lado, proteínas homólogas en especies distintas pueden presentarse en niveles de concentración muy diferentes, y constituirse o no en alergenos dependiendo de esos niveles, ya que darían lugar a títulos altos o bajos de anticuerpos IgE; no en vano se ha observado que la mayor parte de los alergenos principales son proteínas abundantes en los extractos alergénicos.

Fuentes biológicas entre las que se da frecuentemente la reactividad cruzada

En la práctica, la reactividad cruzada -al margen de algunos escarceos con insectos, peces y ácaros- posee fundamentalmente dos frentes de estudio: la que tiene lugar entre los pólenes, y la que se da entre pólenes y algunos alimentos de origen vegetal como son las frutas y hortalizas. La escasez de datos moleculares sobre alergenos y la ausencia de unas bases coherentes para el análisis de esas reacciones cruzadas pueden ser la causa de que, hasta la fecha, apenas se hayan analizado aquellas responsables de las polinosis que, como la alergia al polen de abedul, se había observado en la década de los 80 que predisponían al paciente al síndrome de alergia oral o a síntomas relacionados con el consumo de vegetales crudos[1], sobre todo frutas de la familia de las rosáceas, entre las que se encuentran la manzana y el melocotón. Otros casos de alergias relacionadas entre sí son a ambrosía y melón o plátano, o a algunos insectos y ácaros, a castaña y látex, a caracoles y ácaros, etc. Pero estas últimas están poco documentadas aún.

Con todo ello, raramente se han estudiado otras acciones que no sean las de Bet v 1 y las profili-

nas, ambos alergenos importantes en vegetales. Cuando el estudio se generalice a otros materiales alergénicos, o implicando a nuevas proteínas, es muy probable que la incidencia de la reactividad cruzada se observe para un gran colectivo de alergenos. Cada uno de ellos puede tener por cuenta propia una baja incidencia clínica, pero la diagnosis de su implicación en reacciones cruzadas puede ser esencial para el tratamiento y prevención de las alergias del paciente.

Como hemos dicho, dos proteínas han sido principalmente involucradas en reacciones cruzadas[1]: las profilinas y el alergeno principal del polen de abedul, Bet v 1. La profilina, una proteína capaz de interaccionar con el citoesqueleto celular y con fosfoinosítidos, está presente en casi todas las células eucarióticas. Posee una estructura muy conservada en especies relacionadas filogenéticamente: las profilinas procedentes de especies vegetales presentan una identidad de secuencia de alrededor del 80%, mientras que la profilina humana tiene alrededor de un 30% de identidad con la de Acanthamoeba. Dada su ubicuidad y su carácter alergénico, se la ha definido como «panalergeno»[2]. Alrededor del 20% de los pacientes alérgicos al polen de abedul son sensibles a la profilina, incrementándose este valor notablemente si consideramos las alergias a algunos alimentos como manzana y melocotón. Aunque la intensidad de la unión de la profilina a las IgE de pacientes alérgicos es moderada, la reactividad cruzada debida a ella tiene lugar entre numerosos organismos, incluso muy poco relacionados evolutivamente, por lo que se la considera como uno de los principales alergenos responsables de esta actividad. Por otro lado, se sabe que la alergia a manzana es muy frecuente entre los pacientes sensibles al polen de abedul. De ello se ha responsabilizado a las proteínas homólogas de la familia de Bet v 1[3], que poseen secuencias muy semejantes, encontrándose también implicadas en las reacciones cruzadas a nivel de IgE entre pólenes de abedul, avellano, aliso y carpe.

Recientemente se ha observado en pólenes de diversas especies, incluso no relacionadas filogenéticamente, la existencia de una proteína ligante de calcio que podría constituir un nuevo panalergeno, al menos a nivel de especies vegetales[4]. Se ha detectado en todos los pólenes testados (oleáceas, gramíneas, betuláceas, compuestas, pináceas, cupresáceas), lo que hace suponer que posee una secuencia de aminoácidos altamente conservada. Se ha podido demostrar que, en la interacción de las IgE de sueros de pacientes alérgicos a polen de Cynodon dactilon con la proteína aislada de este polen, está implicado uno de los sitios de unión de calcio. Esto podría estar relacionado con la incipiente inhibición que ejerce el extracto de polen de abedul sobre la interacción entre la parvalbúmina de bacalao (con tres sitios de unión de calcio) y los sueros de pacientes alérgicos a ella, dato que sorprendió notablemente a Apold y Elsayed hace cerca de dos décadas y que nunca habían podido explicar. Los estudios sobre esta nueva familia de proteínas son aún preliminares, pero podrían relacionar epítopos alergénicos presentes en proteínas de células animales con otros de células vegetales, con el interés que ello tendría para explicar las alergias cruzadas, por ejemplo, entre pólenes y pescados, o de forma más general entre especies biológicas muy alejadas filogenéticamente.

Finalmente, la tropomiosina constituye otro objetivo más en los estudios de reactividad alergénica cruzada. Aunque aún existen pocos datos al respecto, esta proteína animal, implicada en la maquinaria contráctil de las células, ha atraído la atención como posible responsable de procesos de reactividad cruzada entre fuentes alergénicas muy diversas, tales como las gambas, los ácaros y los insectos[5].

LOS CARBOHIDRATOS COMO ESTRUCTURAS ANTIGENICAS

Papel de los carbohidratos en la naturaleza

Las funciones atribuidas a las estructuras glicosídicas son muy numerosas y diversas, y probablemente la lista no haya sido aún completada. Además de tareas meramente estructurales, como contribuir a la estabilidad, conformación y solubilidad de la proteína de la que forman parte, los carbohidratos pueden también proporcionarle protección frente a actividades proteolíticas extracelulares, o modular la función proteica. Papeles más dinámicos pueden resumirse en una implicación en procesos de reconocimiento que incluyen

el control de la vida celular, la provisión de ligandos para la unión específica entre proteínas, o de estructuras diana para microorganismos, el enmascaramiento de dichas estructuras, o bien la mediación en las interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular. Muchas de estas actividades las desempeñan pequeñas estructuras glicosídicas, oligosacáridos, con no más de diez o doce unidades monosacáridas, formando parte de proteínas, glicoproteínas, que pueden ser muy activas antigénicamente. La heterogeneidad de las cadenas glicosídicas, incluso de las que comparten la misma posición de enlace a la cadena polipeptídica, junto con la dificultad de disponer de ensayos bioquímicos adecuados, son los principales motivos de que aún no sea fácil realizar una asignación específica de roles biológicos a carbohidratos concretos.

Los glicanos de glicoproteínas pueden ser clasificados en dos grupos: aquellos que poseen una unión a la cadena polipeptídica de tipo O-glicosídico a través de la cadena lateral de una serina o de una treonina -generalmente contienen un residuo de N-acetilgalactosamina en su extremo reductor-; y los que se unen mediante un enlace N-glicosídico a una asparagina del polipéptido, empleando para ello un resto de N-acetilglucosamina del extremo reductor. Los primeros, en general, juegan un papel en las propiedades fisicoquímicas de las glicoproteínas portadoras. Los últimos cumplen funciones de ligandos en fenómenos de reconocimiento entre moléculas de la superficie celular.

Variedad estructural de los carbohidratos

Los carbohidratos no se han considerado durante mucho tiempo moléculas inmunogénicas idóneas. En general, de menor envergadura y variedad estructural que las proteínas, su capacidad antigénica sería dudosa. Sin embargo, en las últimas dos décadas ha sido tal el avance en su análisis molecular y funcional que aquellos criterios han quedado obsoletos. Así, se ha observado que la presencia de determinados monosacáridos en la estructura del carbohidrato les capacita para constituirse en potentes antígenos, sobre todo cuando se encuentran formando parte de glicoproteínas, esto es, conjugados con cadenas polipeptídicas[6]. Y, dado que los carbohidratos se encuentran localizados en la periferia de la estructura de las glicoproteínas, accesibles a la interacción con otras moléculas tales como los anticuerpos, se consideran ahora muy aptos para constituirse en determinantes antigénicos.

Los seres vivos poseen en su organización macromolecular tres tipos de biopolímeros mayoritarios: ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Todos ellos se encuentran constituidos por unidades monoméricas enlazadas covalentemente, pero la existencia de ramificaciones y el anomerismo distingue a las cadenas polisacáridas de las nucleotídicas y aminoacídicas. La variedad de monosacáridos (por ejemplo, hexosas) integrantes de los carbohidratos es aparentemente menor que la de los aminoácidos que forman las proteínas. Sin embargo, la posibilidad de unión entre ellos a través de cuatro posiciones distintas, la configuración α o ß del enlace, o la conformación alternativa piranósido/furanósido de cada monómero, conduce a una gran diversidad de isómeros. Con una glucosa y una manosa se pueden formar hasta 16 disacáridos diferentes.

Sin embargo, la variedad de carbohidratos naturales no puede compararse con la de las estructuras proteicas; éstas poseen 20 monómeros diferentes, organizados en todas las combinaciones posibles, y además plegados en una arquitectura tridimensional, lo que les confiere una diversidad casi imposible de imaginar. La razón que subyace al limitado número de estructuras oligosacáridas y polisacáridas naturales es que los organismos, las células, poseen sólo unos pocos sistemas distintos de síntesis de carbohidratos, que conducen a la formación de moléculas bastantes definidas, muchas de las cuales poseen en común una porción importante de su estructura. De ello da cuenta incluso el reducido número de tipos de unión del glicano a la cadena polipeptídica: N-glicosídico y O-glicosídico. Sin embargo, y a pesar de existir fórmulas mínimas comunes a muchos carbohidratos, el hecho de que en los vegetales, por ejemplo, estos sistemas posean rutas de síntesis (o enzimas distintas para completar el proceso) diferentes que en las especies animales, hace que los productos finales no sean idénticos, y, por tanto, los carbohidratos de aquéllos puedan resultar antigénicos en éstos. Así, la antigenicidad de los carbohidratos en mamíferos se refiere casi exclusivamente a los glicanos procedentes de plantas -especialmente los de glicoproteínas vegetales-, y

en menor grado a los de algunos microorganismos e invertebrados.

¿Qué característica del carbohidrato puede ser responsable de su alergenicidad?

Los tipos de oligosacáridos presentes en glicoproteínas de plantas, enlazados mediante uniones N-glicosídicas, se encuentran resumidos en la Fig. 1. Todos los carbohidratos N-glicosídicos poseen en común el «núcleo pentasacárido» Manα1-6(Manα1-3)Manß1-4NAcGlcß1-4NAcGlc. Dependiendo de los sustituyentes que posean sobre este núcleo, se obtendrán las tres subclases de cadenas: de tipo complejo, rico en manosas, e híbrido. El tipo complejo no posee más residuos de manosa que los contenidos en el núcleo pentasacárido, pero posee unidades de diversos monosacáridos tales como N-acetilglucosamina, fucosa, o xilosa, en diferentes posiciones del núcleo. Por el contrario, las cadenas del tipo rico en manosas presentan sólo residuos de este monosácarido enlazados al núcleo y frecuentemente al menos hasta un número de cinco. El tercer tipo posee características de ambos, se alternan residuos complementarios de manosas -casi siempre unidas sobre la manosaα1-6 del núcleo-, con otros componentes típicos de los complejos como es la xilosa.

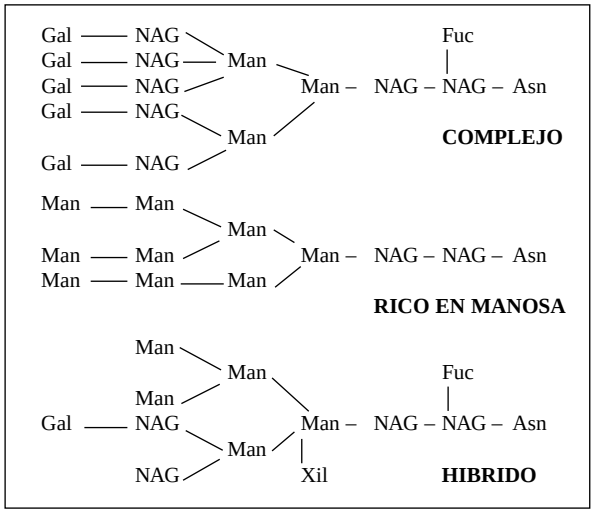

Fig. 1. Tipos de oligosacáridos N-glicosídicos. Se muestran tres ejemplos representativos, indicándose la unión a la asparagina. En sombreado se recogen los núcleos pentasacáridos. Fuc: fucosa; Gal: galactosa; Man: manosa: NAG: N-acetilglucosamina; Xil: xilosa.

Los glicanos complejos de las células de mamíferos, además de ser de mayor envergadura que los de vegetales, poseen frecuentemente ácido siálico y galactosa, raramente fucosa y nunca xilosa. Estas diferencias pueden marcar la antigenicidad de los carbohidratos de glicoproteínas de plantas en el hombre. De hecho, la presencia de una xilosaß1-2 sobre la N- acetilglucosamina interna del núcleo pentasacárido parece tener un valor decisivo en la antigenicidad, e incluso en la alergenicidad de algunas glicoproteínas vegetales. En este sentido, también se le ha atribuido actividad antigénica en mamíferos a la fucosaα1-3 enlazada a la N-acetilglucosamina terminal, incluso se han purificado anticuerpos específicos que la reconocen y que pueden ser empleados en la determinación de la presencia de residuos equivalentes en otros carbohidratos.

En efecto, mediante experimentos de inhibición se demostró en 1991 que el residuo de fucosaα1-3 enlazado a la N- acetilglucosamina terminal contribuye de manera importante a la antigenicidad de la peroxidasa de rábano en conejos[7], pues los anticuerpos IgG específicos inducidos al inyectar el conejo con esta proteína reconocían de manera especial esa fucosa. Estos datos han sido posteriormente corroborados por otros equipos que, además de atribuir un papel a ese residuo en la alergenicidad de la fosfolipasa A_2[8] (PLA_2), han implicado también a la xilosaß1-2 en tales acciones[9], e incluso han purificado aquellos anticuerpos IgG específicos de fucosa o xilosa[10].

Estos datos ponen de manifiesto la naturaleza de los grupos monosacáridos que pueden estar implicados en la antigenicidad de los oligosacáridos de las glicoproteínas de plantas; xilosa y fucosa son residuos ausentes o muy poco frecuentes en las células de mamíferos y pueden ser reconocidos como elementos extraños por el sistema inmunológico humano.

Sin embargo, la importancia de cada carbohidrato, o de cada monosacárido, en la reactividad frente a las IgE de sueros de pacientes hipersensibles es característica de cada alergeno. La presencia de xilosa o fucosa en un oligosacárido no es garantía de su alergenicidad.

Análisis de la alergenicidad y estructura de carbohidratos

Los procedimientos disponibles para el aisla-

miento y manipulación de los carbohidratos presentes en glicoproteínas están lejos de poderse considerar sencillos; incluso la cuantificación del glicano obliga a determinaciones laboriosas y muchas veces adolece de un alto grado de inexactitud. Además, la cantidad de proteína de partida es, muy a menudo, insuficiente para completar los datos deseados. Por ello, la mayor parte de los métodos utilizados implican comparar la potencia alergénica de la proteína glicosilada con la de formas parcial o totalmente desglicosiladas. Esto pone de relevancia los sistemas de desglicosilación, porque de su efectividad y control dependerá la fiabilidad de las conclusiones.

Existen dos tipos de sistemas de desglicosilación, los que utilizan reactivos químicos y los que emplean enzimas. De entre los primeros destacamos los tratamientos con ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) y con ácido peryódico. El TFMS hidroliza el enlace entre el carbohidrato y la cadena polipeptídica, lo que conduce a la separación completa del azúcar. Este tratamiento puede afectar a la fracción aminoacídica de la proteína, de manera que una pérdida de antigenicidad como consecuencia de su utilización podría ser debida a la alteración de uno o varios epítopos polipeptídicos. El ácido peryódico, por otro lado, elimina secuencialmente monosacárido a monosácarido de la cadena oligosácarida, por lo que, para asegurarse de la retirada completa del glicano, es importante determinar la cinética de desglicosilación, y elegir las condiciones más adecuadas. Este tratamiento también puede originar oxidaciones indeseables en la estructura polipeptídica y conducir a la alteración de su antigenicidad. Así, después de ambos tratamientos se aconseja analizar el estado de la proteína, no sólo a nivel conformacional sino sobre todo revisar la composición original de sus aminoácidos constituyentes.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, serían los métodos enzimáticos los más convenientes para una desglicosilación delicada, sin alteración de la estructura polipeptídica, pero eficaz en la eliminación del glicano. Hasta hace poco tiempo no existían enzimas comerciales adecuadas a tal objetivo. En la actualidad disponemos de glicosidasas que escinden específicamente el enlace N-glicosídico entre la cadena polipeptídica y el carbohidrato, dependiendo de la naturaleza del azúcar. Entre ellas se encuentra la endoglicosidasa H (Endo H) que actúa únicamente cuando el oligosacárido es de tipo rico en manosas. Quizás la enzima más útil es la péptido-N-(acetil-ß- glucosaminil)-asparagina amidasa F (PNGasa F) que utiliza un sustrato N-glicosídico, siempre que no posea fucosa unida en posición α1-3 a la N-acetilglucosamina terminal del núcleo pentasacárido. Finalmente, la PNGasa A escinde todo carbohidrato con enlace N-glicosídico; sin embargo, aunque pudiera parecer la más adecuada por la magnitud de su hidrólisis, su actividad no siempre es patente ya que muchas proteínas se resisten, en la práctica, a ser desglicosiladas por esta enzima; además, su gran inestabilidad es otro factor a considerar antes de decidir su utilización. Una vez retirado el carbohidrato de la cadena polipeptídica se puede analizar la actividad antigénica y alergénica de la proteína remanente y compararla con la de la glicoproteína nativa.

Como alternativa a la utilización de glicosidasas específicas en la preparación del carbohidrato para su análisis molecular o inmunológico, se dispone de proteasas inespecíficas - como proteinasa K o pronasa- que producen la degradación casi completa de la fracción polipeptídica respetando el azúcar anclado a una mínima secuencia de aminoácidos (glicopéptido) que puede llegar a ser tan reducida como la propia asparagina enlazante del carbohidrato.

El glicano, por su parte, puede ser fraccionado y aislado por diversas técnicas cromatográficas, entre las que se encuentran la cromatografía de afinidad con soportes de lectinas, o la de alta presión en fase reversa y con matrices especialmente diseñadas para esta finalidad. El manejo y la detección del oligosacárido se ven facilitados si se marca previamente, bien mediante radiactividad, bien con un producto que origina un derivado fluorescente o coloreado. Una vez separadas todas las especies de carbohidrato que coexisten en una proteína alergénica, la técnica por excelencia para el análisis de cada una de ellas es la resonancia magnética nuclear que, mediante las señales originadas por los protones de la muestra y en comparación con las de moléculas conocidas, proporciona la estructura completa del carbohidrato. Esta técnica puede también emplearse sobre la glicoproteína intacta, pero algunas señales inherentes al glicano podrían permanecer enmascaradas por las de los aminoácidos y quedar sin resolver.

Además de la metodología descrita anteriormente, existen diversos procedimientos que proporcionan datos más o menos completos sobre la estructura de los azúcares de glicoproteínas, o rinden formas defectivas en el glicano que pueden ser objeto de estudio. Tal es el uso de las lectinas, de los anticuerpos específicos de monosacáridos y de las exoglicosidasas. Las lectinas son proteínas que unen estructuras glicosídicas, mostrando frecuentemente una afinidad selectiva hacia ciertos tipos de residuos monosacáridos, con lo que su interacción con un carbohidrato dado indicaría la existencia de tales restos glicosídicos. Una de las lectinas más utilizada es la concanavalina A, capaz de unirse a las ramificaciones de manosas terminales que suelen aparecer en los oligosacáridos con unión a la proteína de tipo N-glicosídico. En otro lugar se encuentran los anticuerpos específicos de monosacáridos concretos: algunos grupos de investigación han obtenido anticuerpos frente a xilosa o frente a fucosa, anticuerpos que se unen selectivamente a carbohidratos que poseen uno de estos residuos en su estructura. El problema para su uso es que no son comerciales, y por lo tanto no disponibles para la comunidad científica. De igual forma que las lectinas, la reactividad de estos anticuerpos con un azúcar dado indicaría la existencia del monosacárido específico reconocido por la inmunoglobulina. Como alternativa a este método, se puede hacer uso de un anticuerpo comercial obtenido frente a peroxidasa de nabo, que reconoce específicamente la presencia de xilosa y/o fucosa en la glicoproteína analizada. El uso de este anticuerpo con el alergeno Ole e 1 del polen de olivo dio magníficos resultados[11]. Por último, exoglicosidasas tales como fucosidasa, manosidasa, xilosidasa, etc, proporcionan un producto defectivo en un monosacárido concreto cuya actividad antigénica puede ser analizada en comparación con la del glicano original.

Finalmente, de la existencia de reactividad cruzada de un alergeno glicoproteico con una glicoproteína de cuyo carbohidrato se conoce la estructura pueden extraerse importantes conclusiones sobre la estructura del glicano del primero. La coincidencia de reconocimientos indica, al menos sugiere, coincidencia en algún componente.

ALERGENOS GLICOPROTEICOS

Estructura

La verdadera investigación sobre proteínas alergénicas ha tenido lugar durante la última década. A principios de 1990 sólo se habían clonado y secuenciado los genes de cinco alergenos. A finales de 1994 ya eran 48 los alergenos clonados, y en la actualidad hay registrados más de 100 en la lista oficial del Comité de Nomenclatura de la IUIS. A mediados de la década de los ochenta, se comenzó a tener indicios de la existencia de carbohidratos en la estructura de algunos alergenos polipeptídicos. El primero en ser caracterizado como glicoproteína fue un alergeno principal de *Apis mellifera*, PLA_2, en la década de los 70. Desde entonces la lista se ha incrementado considerablemente. La Tabla I recoge los glicoalergenos que se conocen en la actualidad, así como las referencias más relacionadas con el carácter alergénico de su carbohidrato[12-25]. De ellos destacan, por su número, los procedentes de pólenes, aunque encontramos también un alergeno de epitelio de gato, Fel d 1, y uno de insecto, la PLA_2 de veneno de abeja. Mención aparte requiere el antígeno H del tunicado *Styela plicata* (parásito adherido a las ostras), alergeno ocupacional que extrañamente no ha sido recogido en las más recientes listas de alergenos caracterizados[26, 27].

Aunque se conocen la mayor parte de las estructuras polipeptídicas de estos alergenos, muy poco se sabe de su componente glicosídico, a excepción de los de la PLA_2 y de los alergenos Art v 2 y Cry j 1 de los pólenes de artemisa y cedro japonés. Del alergeno Ole e 1 del polen de olivo se tienen algunos datos muy preliminares aún, como son el sitio de glicosilación y el número y tipo de especies que posee. Todos los oligosacáridos de estos alergenos se encuentran enlazados a la cadena aminoacídica a través de una asparagina (enlace tipo N- glicosídico) y se presentan como estructuras polimórficas, esto es, existen varias especies moleculares distintas (aunque similares) formando parte del componente carbohidrato de la misma cadena polipeptídica. La unión N-glicosídica es prácticamente la única encontrada en los glicoalergenos analizados.

El polimorfismo, por otra parte, es muy frecuente en las glicoproteínas de plantas. No aparece una única especie de glicano unido a la frac-

ción polipeptídica. Por el contrario, suelen coexistir varias diferentes, incluso compartiendo la misma posición de la cadena de aminoácidos. Art v 2 posee una mezcla de carbohidratos ricos en manosas que no han sido encontrados, sin embargo, ni en PLA_2 ni en Cri j 1. En PLA_2 se han obtenido más de 6 estructuras de oligosacárido de tipo complejo muy similares, varias de ellas con fucosa y ninguna con xilosa, y todas unidas al mismo residuo de la proteína. En el caso del alergeno de cedro japonés, Cri j 1, se han determinado hasta cuatro estructuras distintas del oligosacárido, también de tipo complejo todas ellas, unidas a dos posiciones diferentes del polipéptido, las asparaginas 120 y 333. En ambos alergenos, sobre una estructura mínima común del carbohidrato, se alternan varios sustituyentes distintos: en Cry j 1 se encuentran xilosa, fucosas, galactosas y N-acetilglucosaminas, y en PLA_2 fucosas y manosas. Por otro lado, el alergeno Ole e 1 del polen de olivo, también glicoproteico, posee un sitio de glicosilación conocido, que debe ser compartido por los dos oligosacáridos mayoritarios que contiene, uno rico en manosa y otro híbrido con xilosa; ninguno de ellos presenta fucosa. Además, posee una especie minoritaria (menos del 10% del total glicosídico) probablemente de tipo complejo con este monosacárido.

Como puede observarse, las estructuras de las fracciones glicosídicas de las glicoproteínas alergénicas conocidas no guardan un patrón único, aunque sí poseen algunas características comunes, como son el núcleo pentasacárido y, en muchas ocasiones, la presencia de xilosa y/o fucosa.

Alergenicidad del carbohidrato

La presencia de carbohidrato en la estructura de un alergeno proteico no es, sin embargo, garantía

Tabla I. Alergenos glicoproteicos documentados

Glicoalergeno	Estr[a]	Origen	Ref[b]	IgE[c]
Api m 1 Fosfolipasa A_2 (PLA_2)	SI	*Apis mellifera* (abeja) insecto-veneno	12 9 8 13	SI fucosa SI poco
Art v 2	SI	*Artemisia vulgaris* vegetal-polen	14	NO
Cla h 2	NO	*Cladosporium herbarum* hongo-esporas	15	–
Par j 1	NO	*Parietaria judaica* vegetal-polen	16 17	dudoso NO
Fel d 1	NO	*Felis domesticus* (gato) animal-epitelio	18	–
CM16* y CM6* Hor v 1 (BMAI-1) Inhibidores α-amilasa	NO NO	*Triticum turgidum* (trigo) *Hordeum vulgare* (cebada) vegetal-semilla	19 20	SI SI
Cri j 1 peptato liasa	SI	*Criptomeria japonica* (cedro japonés) vegetal-polen	21 22	SI poco
Ole e 1	NO	*Olea europaea* (olivo) vegetal-polen	23 24 11	– SI SI
Antígeno H	SI	*Styela plicata* (tunicado) procordado	25	SI

a: Estructura conocida del carbohidrato.
b: Referencia en relación con el carácter glicoproteico del alergeno.
c: Existencia de IgE específicas del carbohidrato y/o actividad alergénica de éste.

de alergenicidad. En efecto, de entre los alergenos glicoproteicos vegetales estudiados (Tabla I) sólo los oligosacáridos de PLA_2[8, 9, 12], de los inhibidores de α-amilasa de los pólenes de cebada y trigo[19, 20], y de Ole e 1 del polen de olivo[11, 24], se ha demostrado que están implicados en la alergenicidad de la proteína completa. En todos los casos, la desglicosilación del alergeno proporciona un derivado con una capacidad de unirse a las inmunoglobulinas IgE de los sueros de los pacientes hipersensibles menor que la del alergeno glicosilado.

La contribución del glicano a la alergenicidad de otras proteínas tales como Par j 1 o Cry j 1 es dudosa o cuando menos muy reducida. En Cry j 1, el carbohidrato podría influir sólo conformacionalmente a la reactividad con las IgE específicas[22], y aunque Par j 1 pierde la capacidad de unir IgE de los sueros de pacientes alérgicos después del tratamiento desglicosilante, éste distorsionó tanto la estructura tridimensional de la proteína que aquella inhabilitación pudo ser el resultado de los cambios polipeptídicos[17]. Así, ni para Cri j 1 ni para Par j 1 se ha encontrado una correlación definitiva entre la presencia del oligosacárido y la actividad enlazante al anticuerpo. Finalmente, el carbohidrato de Art v 2 no posee actividad alergénica[14] - aunque unos primeros resultados parecían indicar lo contrario-, lo que estaría de acuerdo, según la hipótesis formulada sobre la participación de fucosa y xilosa en la actividad alergénica, con su natural composición de glicano rico en manosas en el que están ausentes estos monosacáridos.

Además de los alergenos glicosilados de la Tabla I, se han analizado numerosos extractos cuya capacidad de unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos es sensible al tratamiento con peryodato. Y, aunque proceden fundamentalmente de alimentos vegetales[1] como avellana, cacahuete, trigo, arroz, guisante, espinaca, plátano, patata, soja, fresa, y tomate[28], también se han detectado en moluscos como el mejillón[1].

Algunos de los datos obtenidos por distintos grupos acerca de la contribución particular de un carbohidrato a la alergenicidad de la glicoproteína de la que forman parte entran en controversia, pues según el tipo de ensayo así como el modelo utilizado en la comparación pueden derivar a conclusiones diferentes. Antes hemos mencionado los trabajos realizados con PLA_2, fundamentalmente estudios de modificación química y enzimática, y análisis antigénico mediante ensayos de ELISA e «immunoblotting» con el producto modificado, estudios que probaban la implicación del carbohidrato en la unión del alergeno a las inmunoglobulinas IgE de los sueros de pacientes alérgicos al veneno de los véspidos[8, 9, 12]. Sin embargo, experimentos recientes de liberación de histamina de basófilos sensibilizados y reacciones cutáneas, utilizando alternativamente la proteína natural, la forma recombinante producida en *E. coli* -que no puede estar glicosilada debido a la inexistencia de los sistemas correspondientes en la bacteria-, y el derivado natural desglicosilado, llevaron a la conclusión de que, si bien el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica es esencial en la reactividad cutánea de tipo I y para la actividad estimulante de secreción de histamina, la glicosilación parece resultar de menor relevancia, ya que la reactividad cutánea fue similar para las formas glicosilada y desglicosilada del alergeno, y tanto la proteína natural como la recombinante eran efectivas en la liberación del mediador desde los basófilos[13]. Así, no hay evidencia de que los grupos carbohidratos de la PLA_2 sean epítopos B dominantes ni esenciales para anticuerpos IgE[13]. Pero debemos recordar que este alergeno no posee xilosa en su estructura glicosídica.

Hasta el momento, y como se puede observar, los datos obtenidos se refieren a la comparación de actividades entre formas completas de los alergenos y derivados defectuosos en los carbohidratos; no se han presentado estudios con el propio glicano aislado, lo que llevaría a una conclusión definitiva. Recientemente se ha purificado el componente oligosacárido liberado por la PNGasa F del alergeno Ole e 1. Con él se han realizado ensayos de liberación de histamina a partir de basófilos obtenidos de pacientes alérgicos al polen de olivo (Rodríguez y cols., manuscrito en preparación). Los resultados son muy prometedores, pues se han obtenido respuestas positivas para muestras en las que no existen indicios de la presencia de fragmentos polipeptídicos del alergeno. En la actualidad se están llevando a cabo estudios de este tipo, así como ensayos cutáneos, con los dos componentes mayoritarios de ese carbohidrato separados por

cromatografía de afinidad. Una respuesta positiva en cualquiera de los dos frentes iluminaría definitivamente los conceptos sobre la capacidad real de determinadas especies de carbohidratos en la respuesta alérgica.

Importancia de los carbohidratos en las reacciones cruzadas alergénicas

La existencia de lectinas en los extractos vegetales planteó importantes dudas sobre el papel de los carbohidratos en las reacciones cruzadas, ya que son moléculas que unen anticuerpos a través de su fracción glicosídica y habrían podido ser los responsables de la respuesta positiva a los sueros de pacientes alérgicos. Sin embargo, al menos dos datos primarios apoyan la actividad de los epítopos glicosídicos: los extractos alergénicos tratados con peryodato perdían su capacidad de unión a IgE, y muchos sueros con títulos de IgE muy altos no poseían capacidad de unión a los extractos. Por otro lado, y como argumento definitivo, se ha demostrado la existencia de anticuerpos IgE específicos de carbohidratos[1, 8, 11, 12, 20, 25, 28].

Como acabamos de ver, los carbohidratos implicados en la actividad alergénica de glicoproteínas presentan estructuras con numerosos rasgos en común, aunque pertenezcan a fuentes biológicas poco o nada relacionadas entre sí. Por este motivo, los carbohidratos pueden jugar un papel importante en las reacciones cruzadas ya que en los extractos alergénicos, sobre todo en los procedentes de vegetales, las glicoproteínas pueden representar un componente muy abundante. La presencia de xilosa o de fucosa en una glicoproteína que acceda al paciente hipersensible podría ser fácilmente reconocida por las IgE de su suero, IgE específicas de esos monosacáridos y producidas previamente en el contacto con otro alergeno glicoproteico, que aunque no fuera idéntico, contuviera la xilosa o la fucosa en su carbohidrato. Además se ha observado que los sueros de algunos pacientes alérgicos son capaces de distinguir pequeñas diferencias estructurales en los glicanos reconocidos ya que la magnitud de su respuesta es distinta hacia los diversos extractos[1]. Esta propiedad podría contribuir al análisis molecular de los alergenos glicosídicos.

Ya que las fuentes alergénicas de origen vegetal son las que a priori más glicoproteínas contendrían, debemos discutir aquí el papel que podrían jugar los azúcares en la reactividad cruzada alergénica a alimentos procedentes de plantas. Pues bien, la responsabilidad de los glicanos en la alergia a alimentos vegetales de un paciente cuyo suero posee IgE anti-carbohidrato, por haber sido sensibilizado quizás por un polen con alergeno glicoproteico, podemos suponer que debe ser nula, o cuando menos dudosa. En todo caso le produciría síndrome alérgico oral. En efecto, las estructuras glicosídicas son sensibles a actividades degradantes que actúan en las primeras etapas de la digestión, α-amilasas que intervienen en la actividad digestiva bucal hidrolizando los carbohidratos rápidamente a monosacáridos, que son ya estructuras sin valor antigénico. Así, la existencia de carbohidratos en alergenos alimentarios no implica su actividad alergénica cruzada, pues ese glicano será destruido antes de que pueda llegar a tomar contacto con las IgE del suero; sin embargo, sí puede ser responsable de las reacciones derivadas de su presencia en la regiones altas del aparato digestivo, de ahí que puedan explicarse los síntomas del síndrome alérgico oral. Por todo ello, la validez de las reacciones cruzadas a nivel de los carbohidratos se debería restringir a aquellos alergenos que en su vía de asalto al individuo eviten las actividades glicolíticas. Alergenos inhalados, o inyectados, no están sometidos a estas actividades, al menos en la misma cuantía, por lo que sí podrían ser reconocidos por los anticuerpos del suero.

La implicación de los carbohidratos en reacciones antigénicas y alergénicas cruzadas ha sido claramente demostrada *in vitro*. Es su responsabilidad en la actividad alergénica *in vivo*, en las reacciones cutáneas o en la liberación de histamina, lo que aún plantea dudas -el reducido tamaño del glicano, 1-1,5 kDa de masa molecular, es uno de los principales escollos para aceptar su participación en la asociación de los receptores celulares-. Las expectativas para resolver este importante item se encuentran centradas en la posibilidad de realizar los análisis con preparaciones de carbohidratos puros, aislados del correspondiente glicoalergeno o de síntesis, una vez determinadas las estructuras moleculares a las que se atribuye el posible papel alergénico. Y del hallazgo de datos generalizables en esos experimentos depende la validez de las conclusiones que puedan extraerse. Pero las respuestas no están muy lejos.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Ree R, Aalberse RC. Pollen-vegetable food crossreactivity: serological and clinical relevance of crossreactive IgE. *J Clin Immunoassay* 1993; 16: 124-30.
2. Valenta R, Duchene M, Ebner C. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992; 175: 377-85.
3. Calkhoven PG, Aalbers M, Koshte VL, et al. Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross- reactive structures. *Allergy* 1987; 42: 382-
4. Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS, Rodríguez R. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 1996; 241: 772-8.
5. Witteman AM, Akkerdaas JH, Van Leeuwen J, Van der Zee JS, Aalberse RC. Identification of a cross-reactive allergen (presumible tropomiosin) in shrimp, mite and insects. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 56-61.
6. Feizi T, Childs RA. Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem J* 1985; 245: 1-11.
7. Kurosaka A, Yano A, Itho N, Kuroda Y, Nakagawa T, Kawasaji T. The structure of a neutral specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by antihorseradish peroxidase antiserum. *J Biol Chem* 1991; 166: 4168-72.
8. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, Marz L, Becker WM. Fucose α1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 259-66.
9. Prenner C, Mach L, Glossl J, Marz L. The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey- bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. *Biochem J* 1992; 284: 377-80.
10. Faye L, Gomord V, Fichette-Laine AC, Chrispeels MJ. Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α1-3 fucose or ß1-2 xylose. *Anal Biochem* 1993; 209: 104-8.
11. Batanero E, Villalba M, Monsalve RI, Rodríguez R. Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1264-71.
12. Weber A, Schöeder H, Thalberg K, März L. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. *Allergy* 1987; 42: 464- 70.
13. Müller UR, Dudler T,Schneider T, et al. Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 395-402.
14. Nilsen BM, Sletten K, Smestad-Paulsen B, O'Neill M, Van Halbeek H. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from the pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris L.*). *J Biol Chem* 1991; 266: 2660-8.
15. Swärd-Nordmo M, Paulsen BS, Wold JK. The glycoprotein Ag-54 (Cla h II) from *Cladosporium* herbarum. Further biochemical characterization. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 85: 295-301.
16. Polo F, Ayuso R, Carreira J. Studies on the relationship between structure and IgE-binding ability of *Parietaria judaica* allergen I. *Mol Immunol* 1990; 28: 169-75.
17. Mucci N, Liberatore P, Federico R, et al. Role of the carbohydrate moieties in cross-reactivity between different components of *Parietaria judaica* extract. *Allergy* 1992; 47: 424-30.
18. Duffort OA, Carreira J, Nitti G, Polo F, Lombardero M. Studies on the biochemical structure of the major allergen *Felis domesticus* I. *Mol Immunol* 1991; 28: 301-9.
19. Sánchez-Monge R, Gómez L, Barber D, López-Otin C, Armentia A, Salcedo G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. *Biochem J* 1992; 281: 401-5.
20. García-Casado G, Sánchez-Monge R, Chrispeels MJ, Armentia A, Salcedo G, Gómez L. Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* 1996; 6: 471-7.
21. Taniai M, Kayano T, Takakura R, et al. Epitopes on Cry j I and Cry j II for the human IgE antibodies cross-reactive between *Cupressus sempervirens* and C*ryptomeria japonica* pollen. *Mol Immunol* 1993; 30: 183-9.
22. Ogawa H, Hijikata A, Amano M, et al. Structures and contribution to the antigenicity of oligosaccharides of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen Cry j I: relationship between the structures and antigenic epitopes of plant N-linked complex-type glycans. *Glycoconjugate J* 1996; 13: 555-66.
23. Villalba M, Batanero E, López-Otin C, et al. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem* 1993; 216: 863-9.
24. Batanero E, Villalba M, Rodríguez R. Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol Immunol* 1994; 31: 31-7.
25. Shigeta S, Okamura M, Tsutsumi M, et al. Structu-

re of an allergenic pentasaccharitol, Gp-1ß-b6, isolated from a sea squirt antigen, Gi-rep, as a minimun structural unit responsibles for its allergenicity. *J Biochem* 1990; 108: 47-52.

26. Liebers V, Sander I, Vankampen V, Raulf-Heimsoth M. Overview on denominated allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 494-516.
27. IUIS Allergen Nomenclature Sub-Commitee. Official list of Allergens. Mayo 1997.
28. Petersen A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak M, Becker W-M. Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 505-15.

Rosalía Rodríguez
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Química
Universidad Complutense
28040 Madrid