

Modelado bioinformático tridimensional de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 y respuesta IgA específica en pacientes sensibilizados a *Anisakis simplex*

Julia María Coronas Serna

Plaza Ramón y Cajal s/n. Facultad de Farmacia. Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
jmcoronasserna@gmail.com

Tutores

María del Carmen Cuéllar del Hoyo. Juan González Fernández.

Plaza Ramón y Cajal s/n. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
cuellarh@ucm.es

Resumen: *Anisakis simplex* es el responsable de distintas afecciones alérgicas, sin embargo determinar una parasitación previa no siempre es fácil. Se ha relacionado la Urticaria Crónica (UC) con la presencia IgE específica de *A. simplex*. Por otra parte, se postula que la IgA pueda estar implicada en los mecanismos protectores de las reacciones urticariales. En este trabajo se estudian los niveles de IgA específica frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 de *A. simplex* en sueros de pacientes diagnosticados de Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA), UC asociada (UC+) o no (UC-) a *A. simplex* y la evolución de estos niveles a los 3 meses y al año. Se tapizaron placas de ELISA con los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 de *A. simplex*, incubándose posteriormente con sueros humanos, revelándose con anti-IgA humana marcada con peroxidasa. Los resultados se expresaron como densidades ópticas a 490 nm. Los valores más elevados se obtuvieron en el grupo de pacientes con AGA, no observándose diferencias entre los dos grupos de UC. Al mismo tiempo se realizó el modelado tridimensional de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 a partir de sus estructuras primarias y se evaluó su calidad para la determinación de epitopos B.

Palabras clave: *Anisakis*. Ani s 1. Ani s 7. IgA. Bioinformática.

INTRODUCCIÓN

Anisakis simplex es un nematodo parásito capaz de producir diferentes formas de anisakiosis. La Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA) ha sido descrita como una reacción alérgica aguda con urticaria/angioedema y/o anafilaxia con o sin dolor abdominal, en el contexto de un parasitismo agudo por *A. simplex*⁽¹⁾. La Urticaria Crónica (UC)

asociada a la sensibilidad a *A. simplex* (UC+) se ha asociado con el parasitismo previo con este nematodo en un subgrupo importante de pacientes con UC⁽²⁾.

En un trabajo anterior se evaluó la asociación entre la IgE específica frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 y diferentes afecciones alérgicas asociadas a *A. simplex*. Se concluyó que la determinación de IgE frente a ambos alérgenos es útil para el diagnóstico de la parasitosis por *A. simplex* y sirve para diferenciar las afecciones alérgicas asociadas a *A. simplex*. Por otro lado, aunque Ani s 1 se puede considerar un alérgeno principal en pacientes de AGA, no es así en el caso de UC+⁽³⁾.

La IgA específica frente a Ani s 1 y Ani s 7 se postula que pueda estar implicada en mecanismos protectores ante episodios alérgicos como las reacciones urticariales en pacientes sensibilizados a *A. simplex*⁽²⁾. En el presente trabajo se ha investigado la producción de IgA específica frente a estos dos alérgenos principales, Ani s 1 y Ani s 7, en sueros de pacientes con AGA y UC+, estudiando también su producción a lo largo del tiempo y sus valores relativos con respecto a la IgE.

El conocimiento de las estructuras secundarias y terciarias es de gran interés en la búsqueda de epitopos B. Las herramientas bioinformáticas permiten elaborar modelos tridimensionales a partir de la secuencia primaria y predecir las regiones epitópicas. Aunque las estructuras primarias de Ani s 1 y Ani s 7 han sido secuenciadas, no se ha logrado elucidar su estructura tridimensional. En este trabajo se han elaborado modelos estructurales de ambos alérgenos para su posterior análisis de regiones epitópicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron cuatro grupos de sujetos, seleccionados por el Dr Daschner del Servicio de Alergia del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid: 21 pacientes diagnosticados de AGA, 25 de UC+, 26 pacientes con urticaria cónica no asociada a sensibilización con *A. simplex* (UC-) y 21 sujetos controles sanos sin historia de urticaria. En los casos en los que fue posible se tomaron muestras a tiempo 0, a los 3 meses y al año del diagnóstico.

Los alérgenos recombinantes tAni s 7 y rAni s 1 se aislaron tal como se ha descrito⁽⁴⁾. Los anticuerpos IgA específicos frente a *Anisakis* se detectaron mediante ELISA indirecto frente a ambos alérgenos recombinantes. Los pocillos de las columnas 1, 4, 7, y 10 de las placas de microtitulación de 96 pocillos (GreinerBio- One, Frickenhausen, Alemania) se tapizaron con 100 μ L de PBS con rAni s 1 a una concentración de 5 μ g/mL y los pocillos de las columnas 2, 5, 8, 11 se tapizaron con 100 μ L de tampón Tris 0.1 M, pH 10.5 con 0.6 μ g/mL de tAni s 7. En los pocillos de las restantes columnas (controles) se añadió sólo PBS. Después de incubar las placas toda la noche a 4°C y bloquear los sitios no reactivos con leche descremada al 1%, se

añadieron los sueros por duplicado a la dilución 1/100 en PBS Tween con BSA 0.1%. Después de incubar 2h a 37°C se añadió un anticuerpo de cabra anti IgA humana marcada con peroxidasa (BioSource, Camarillo, CA, USA) a la dilución 1/3000. Tras incubar 1h a 37 °C y lavar con PBS Tween se añadió el sustrato (O-fenilendiamina; sigma) al 0.04% en tampón citrato-fosfato (pH=5) con peróxido de Hidrógeno al 0.04%. La reacción se paró con ácido sulfúrico 3N a los 15 minutos y las placas se leyeron a 490nm en un lector de placas ELx808 (Biotek). Las densidades ópticas (DO) se calcularon restando el valor de DO producido por el mismo suero en ausencia de antígeno. Se consideraron positivos los valores superiores a la media obtenida con 23 sueros utilizados como controles negativos de las placas más dos desviaciones estándar. Los valores fueron, para Ani s 1 y para Ani s 7 respectivamente, 0.314 y 0.350. La estadística se realizó con IBM SPSS Statistics versión 20 para Windows.

El análisis bioinformático se llevó a cabo mediante el modelado de las secuencias de Ani s 1 y Ani s 7 registradas en NCBI-Protein (número de acceso Q7Z1K3.1 y ABL77410.1, respectivamente). Se enviaron las secuencias aminoacídicas de Ani s 1 y Ani s 7 y la forma truncada de este último, tAni s 7 ⁽⁴⁾ a distintos servidores. El cálculo de los modelos tridimensionales se realizó a través de los servidores HHPred y iTasser, que modelan por homología basándose en la estructura tridimensional conocida de otras proteínas similares y con QUARK ⁽⁵⁾ como sistema de modelado ab initio. Debido a que el servidor QUARK solo admite secuencias de hasta 200 aminoácidos no se pudieron modelar de forma completa ni Ani s 7 (1096aa) ni tAni s 7 (278aa). Así pues se enviaron tres fragmentos distintos, de los aminoácidos comprendidos del 1 al 200, del 79 al 278 y del 40 al 239 de tAni s 7. Una vez obtenidos los modelos en formato pdb se evaluó su calidad empleando el servidor QMean ⁽⁶⁾ con el fin de, en próximos trabajos, estudiar la presencia de epitopos B.

RESULTADOS

Los valores séricos de IgA específica frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 se muestran a continuación (Tabla 1) Los valores más altos se detectaron en los pacientes con AGA tanto frente Ani s 1 como frente Ani s 7.

	AGA	UC+	UC-
Ani s 1 (X±SD)	0.45±0.46	0.22±0.16	0.17±0.19
Ani s 7 (X±SD)	0.35±0.40	0.21±0.21	0.23±0.37

Tabla 1. Valores medios de IgA específica expresada como DO determinada por ELISA.

Respecto a Ani s 1, los valores de IgA en los pacientes con AGA fueron significativamente superiores a los obtenidos con el resto de los grupos incluyendo UC+. También se observaron diferencias significativas entre los valores de UC+ y los obtenidos en los controles, que fueron inferiores; en cambio no se observaron

diferencias entre los dos grupos de urticaria crónica (Fig. 1, A). En el caso de Anis 7 los valores más bajos se observaron en el grupo control, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y todos los demás. Por el contrario no hubo diferencias significativas entre AGA y UC+ en contraste con lo que ocurría con Anis 1. Al igual que lo observado al estudiar IgA frente Anis 1, tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores de DO obtenidos al estudiar ambos grupos de urticaria crónica (Fig. 1, B).

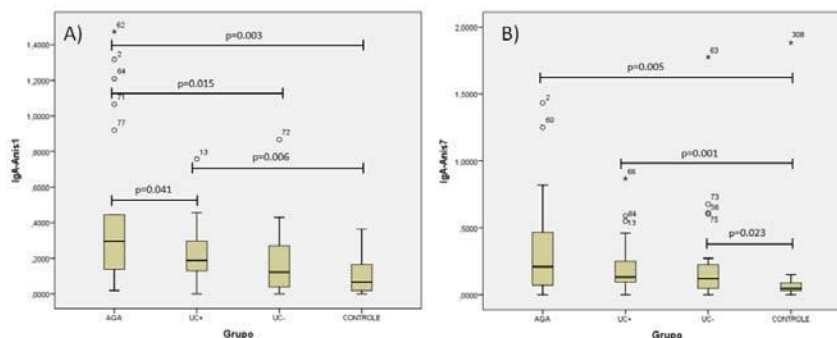


Figura 1. Valores de IgA en los distintos grupos. A) Anis 1. B) Anis 7.

Dentro de los pacientes con AGA, el 47.6% fue IgA positivo para Anis 1 pero solo el 16% de los UC+ reconoció este alérgeno. Por el contrario el 33% y 20 % de los sueros de los pacientes de AGA y UC+ reconocieron el Anis 7 . Al estudiar la positividad combinada se alcanzó un 71.4% de positivos frente al menos a uno de los dos alérgenos en los pacientes de AGA y solo un 28% para UC+.

En 13 sueros de pacientes con AGA se disponía de los valores de IgE específica de los alérgenos Anis 1 y Anis 7 . El 50% resultó positivo para ambos anticuerpos en el caso de Anis 1 y el 38.4% para el Anis 7. Dentro de UC+ se habían determinado ambas inmunoglobulinas específicas en 17 sueros, siendo positivos el 17.6% en el caso de Anis 7. Al estudiar la positividad combinada de ambos anticuerpos se alcanzó el 100% de positivos en AGA y el 95% en UC+⁽³⁾.

Al estudiar la evolución en el tiempo de la respuesta de la IgA específica frente a los antígenos recombinantes Anis 1 y Anis 7, se observó un descenso de los valores de DO obtenidos mediante ELISA. A pesar de ello solo se observaron diferencias significativas entre los valores de IgA frente Anis 7 obtenidos a tiempo 0 y al año (p=0.027). Cuando se procedió al estudio de la dinámica de los valores dentro de los distintos grupos de estudio, se observó que el mencionado descenso no se obtuvo dentro de todos los grupos. Así, dentro de los pacientes con AGA se observó un descenso significativo entre los valores de IgA obtenidos frente al Anis 1 a tiempo 0 y a los 3 meses (p=0.039) y a los 12 meses del estudio (p=0.034). Por el contrario dentro del grupo de UC+ el descenso se observó frente al alérgeno Anis 7 con valores significativamente más bajos a los 3 meses que los obtenidos a tiempo 0 (p=0.042).

En el análisis bioinformático, ninguno de los modelos obtenidos por homología cumplió con los criterios de calidad especificados por QMean⁽⁶⁾. Los mejores resultados se observaron en los modelos (Fig. 2) calculados ab initio⁽⁵⁾ para Ani s 1 (Z-score:-3.69) y para el fragmento de tAni s 7 de los aminoácidos 40 al 239. (Z-score:-2.22). No se pudo proceder al cálculo de epitopos B ya que el modelo no ofrecía una calidad suficiente.

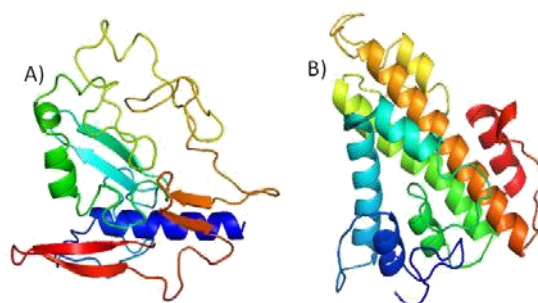


Figura 2. Modelos tridimensionales de Ani s 1 (A) y el fragmento de tAni s 7 (B) calculados ab initio por QUARK.

DISCUSIÓN

Los valores más elevados de IgA frente a los dos alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 correspondieron a los pacientes de AGA. Sin embargo Ani s 1 demostró un mayor poder de discriminación entre esta entidad clínica y UC+, a diferencia de lo que ocurre al detectar IgE e IgG4 específicas donde Ani s 7 resulta ser un marcador de AGA. Asimismo en estudios previos se ha demostrado un déficit de la producción de IgG4 específica de *A. simplex* en pacientes diagnosticados de UC+(7). A pesar de que los mecanismos etiopatogénicos de la UC+ no han sido todavía elucidados, la falta de producción de IgG4 o IgA por parte de estos pacientes, junto con posibles alteraciones en la mucosa intestinal, podrían permitir que pequeñas cantidades de alérgenos entraran en contacto con los mastocitos de la submucosa causando reacciones urticariales prolongadas o crónicas(2).

En el modelado de las secuencias de los alérgenos Ani s 1, Ani s 7 y tAni s 7 se observó una mejor calidad en aquellas predicciones calculadas ab initio que en aquellas calculadas por comparación con estructuras conocidas. Esto podría deberse a la escasa homología estructural que presentan estos dos alérgenos con aquellas proteínas de las que se conoce con certeza su estructura tridimensional. Desafortunadamente, ninguno de los modelos obtuvo calidad suficiente para el cálculo de epitopos B.

CONCLUSIONES

Los mayores niveles de IgA frente a los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 se observaron en el grupo de AGA. La detección de IgA específica anti-Ani s 1 demostró un mayor poder de discriminación entre AGA y UC+.

El modelado ab initio de Ani s 1 y tAni s 7 ofreció una aproximación más cercana a la forma nativa de las proteínas, comparado con los sistemas de realización de la predicción de las estructuras por homología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daschner A, Pascual C. Anisakis simplex: sensitization and clinical allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 5(3):281–285.
2. Daschner A, Cuéllar C, Rodero M. The Anisakis allergy debate: does an evolutionary approach help?. *Trends in Parasitology*. 2012; 28(1):9-15.
3. Cuéllar C, Daschner A, Valls A, Frutos C, Fernández-Fígares V, Anadón AM, Rodríguez E, Gárate T, Rodero M, Ubeira FM. Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct Anisakis simplex-associated allergic clinical disorders. *Archives of Dermatological Research*. 2012; 304(4):283-288.
4. Anadón A, Rodríguez E, Gárate M, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, Rodero M, González-Díaz H, Ubeira FM. Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010; 17(4):496-502.
5. Xu D, Zhang Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins*. 2012; 80(7):1715–1735.
6. Benkert P, Kuenzli M, Schwede T. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Research*. 2009; 1(Web Server Issue):37.
7. Daschner A, Fernández-Fígares V, Rodero M, Valls A, De Frutos C, Ubeira FM, Cuéllar C. Specific IgG4: possible role in the pathogenesis and a new marker in the diagnosis of Anisakis-associated allergic disease. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2014; 79(2):120-126.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.