



_Potencial alérgico do superalimento bagas goji

Allergic potential of Goji berry superfood

Sandrina Teixeira^{1,3}, Inês M. Luís^{2,4}, M. Margarida Oliveira^{2,4}, Isabel A. Abreu^{2,4}, Rita Batista^{1,4}

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA de Lisboa, Oeiras, Portugal

(3) Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

(4) GREEN-IT Bioresources for Sustainability Research Unit

_Resumo

A classificação das bagas goji como superalimento, devido essencialmente à sua composição em compostos bioativos, levou a um enorme aumento do seu consumo nos países ocidentais. Apesar de todos os seus benefícios, as bagas goji comportam alguns riscos, nomeadamente o de alergia. Neste estudo pretendemos caracterizar as proteínas (proteoma) das bagas goji (*Lycium barbarum*) e identificar aquelas envolvidas na reação alérgica (aquelas que se ligam às imunoglobulinas de tipo E- IgE). Assim, primeiramente procedemos à separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, seguida da sua identificação por espectrometria de massa. Subsequentemente, testámos a reatividade de indivíduos alérgicos ao tomate e batata (alimentos da mesma família das bagas goji, *Solanaceae*) contra as proteínas das bagas goji realizando para tal um ensaio de *Western blot*. Realizámos também um ensaio de inibição onde a reatividade cruzada entre as bagas goji e o tomate e a batata foi avaliada. Finalmente, caracterizámos as proteínas de ligação às IgE realizando para tal um ensaio de *Western blot* com plasmas de indivíduos alérgicos à batata e tomate, após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Foram identificados por espectrometria de massa 93, dos 180, spots retirados do gel, correspondendo a 29 funções proteicas. Destas, 11 corresponderam a proteínas de ligação às IgE. Demonstrámos igualmente, neste estudo, existir reatividade cruzada entre as bagas goji, o tomate e a batata.

_Abstract

Goji berries' bioactive compounds, which allowed classifying them as superfruits, led to an enormous increase of its consumption in western countries. However, the potential risk of allergy is a concern. In this study, we aimed to characterize the proteome of goji berries (*Lycium barbarum*) and identify proteins with putative role in the allergic reaction (IgE-binding proteins). We firstly used two dimensional (2D) gel electrophoresis followed by mass spectrometry (MS) to characterize goji berries' proteome, and then Immunoblot reactivity with plasma from tomato and potato (same botanical family, *Solanaceae*) allergic individuals was assessed to characterize goji berries IgE-binding proteins. An inhibition assay was further performed to evaluate cross-reactivity among potato, tomato and goji berries. We significantly identified 93 out of the 180 MS analyzed spots, corresponding to 29 protein functions. From these, 11 could be identified as goji berries IgE-binding proteins. We further demonstrated cross-reactivity between goji berries, tomato and potato.

_Introdução

Os frutos da planta *Lycium barbarum*, também conhecidos como bagas goji, são consumidos em toda a Ásia e utilizados na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos. As alterações nos hábitos alimentares das populações dos países ocidentais com um cada vez maior número de pessoas a procurarem alimentos tradicionais exóticos, levou à sua introdução, e aumento do seu consumo, nestes países.

Existem vários estudos que comprovam as propriedades benéficas das bagas goji, nomeadamente hipoglicemiantes, antilipídicas, protetoras das células da retina, imunostimuladoras, anticarcinogénicas e antioxidantes (1-5). Estas propriedades têm sido atribuídas a uma elevada concentração de nutrientes com uma alta atividade biológica tais como polissacáridos complexos, carotenoides e fenilpropenoides (6). As bagas goji contêm também outros nutrientes importantes, tais como vitaminas C, B1 e B2 e pelo menos 16 aminoácidos diferentes (7). São também muito ricas em minerais como o potássio, sódio, fósforo, magnésio (8) e, embora em quantidades mais pequenas, também contêm cobre e ferro (9). As suas propriedades promotoras de saúde levaram a que muitos as classificassem de superalimento. No entanto, o consumo destas bagas também acarreta alguns riscos, nomeadamente a potencial interação com anticoagulantes (10), a hepatotoxicidade (11), a promoção de fotossensibilidade sistémica (12) e a potencial alergenicidade (13). Embora não existam muitos estudos acerca da potencial alergenicidade das bagas goji, alguns autores relatam reações positivas após testes cutâneos com extratos proteicos de bagas goji, reatividade cruzada entre as proteínas das bagas goji e anticorpos de indivíduos alérgi-



cos a pêsego, tomate, tabaco e ao pólen de *Artemisia* sp., e uma proteína de transporte de lípidos (lipid transfer protein - LTP) como o alergénio principal envolvido na sensibilização e reatividade cruzada (14,15).

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo não só caracterizar o proteoma das bagas goji (*Lycium barbarum*), mas também contribuir para o conhecimento das proteínas que estão envolvidas na reação alérgica a este superalimento.

_Materiais e métodos

Este trabalho comportou diferentes fases:

1ª fase – Otimização da extração proteica

Nesta fase testámos 6 métodos diferentes para a extração das proteínas das bagas goji.

2ª fase – Caracterização do proteoma das bagas goji

Utilizámos o método de extração proteica escolhido na primeira fase (precipitação direta em ácido tricloroacético/acetona, seguida de uma extração fenólica e limpeza do extrato obtido com o “2D clean-up kit” da GE Healthcare), separámos, as proteínas extraídas, por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e caracterizámos o proteoma das bagas goji por espectrometria de massa (180 spots analisados).

3ª fase – Prova da reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji

Como não existem, em comercialização, plasmas de indivíduos com alergia comprovada às bagas goji, nesta fase, pretendemos saber se indivíduos alérgicos a alimentos da mesma família (tomate e batata- família das *Solanaceae*) reagiriam também contra as bagas goji. Só assim poderíamos avançar para a fase seguinte. Realizámos assim um ensaio de *Western blot*, após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, com plasmas de 4 indivíduos com alergia comprovada ao tomate e batata. Nesta fase fizemos também um ensaio de inibição para comprovar a reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji.

4ª fase – Caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica às bagas goji

Realizámos um ensaio de *western blot* após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com os mesmos plasmas utilizados na fase anterior. As proteínas que se ligaram às Imunoglobulinas de tipo E (IgE) dos indivíduos em teste foram identificadas por espectrometria de massa.

_Resultados e discussão

Caracterização do proteoma das bagas goji

Tanto no caso da separação proteica por electroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, como no caso da electroforese bidimensional verifica-se uma distribuição das proteínas ao longo dos vários pesos moleculares. No entanto, as bandas (gel unidimensional)/ spots (gel bidimensional) mais intensos estão concentrados maioritariamente nas regiões de 20, 34, 42-48 e 54-70 kDa.

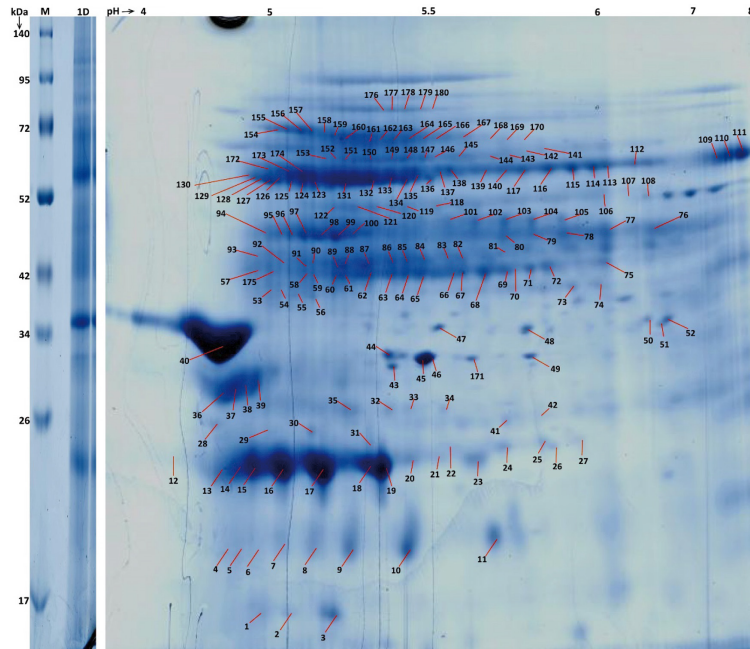
Dos 180 spots analisados por espectrometria de massa (figura 1), 93 apresentaram identificação significativa, correspondendo a 29 funções proteicas diferentes.

Reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji

Todos os plasmas em teste, correspondentes a indivíduos com alergia comprovada ao tomate e batata apresentaram IgE contra proteínas das bagas goji. A inibição da ligação entre as IgE existentes no plasma do indivíduo 1 e as proteínas das bagas goji transferidas para uma membrana de nitrocelulose, após pré incubação com extratos proteicos de tomate ou batata contendo 1mg de proteínas, provou a existência de reatividade cruzada entre as bagas goji e estes alimentos. Isto significa que existem proteínas nas bagas goji com estrutura e/ou conformação semelhantes àquelas existentes no tomate e batata que são responsáveis pela reação alérgica dos indivíduos em teste (contra as quais os indivíduos em teste produziram IgE específicas) (figura 2).

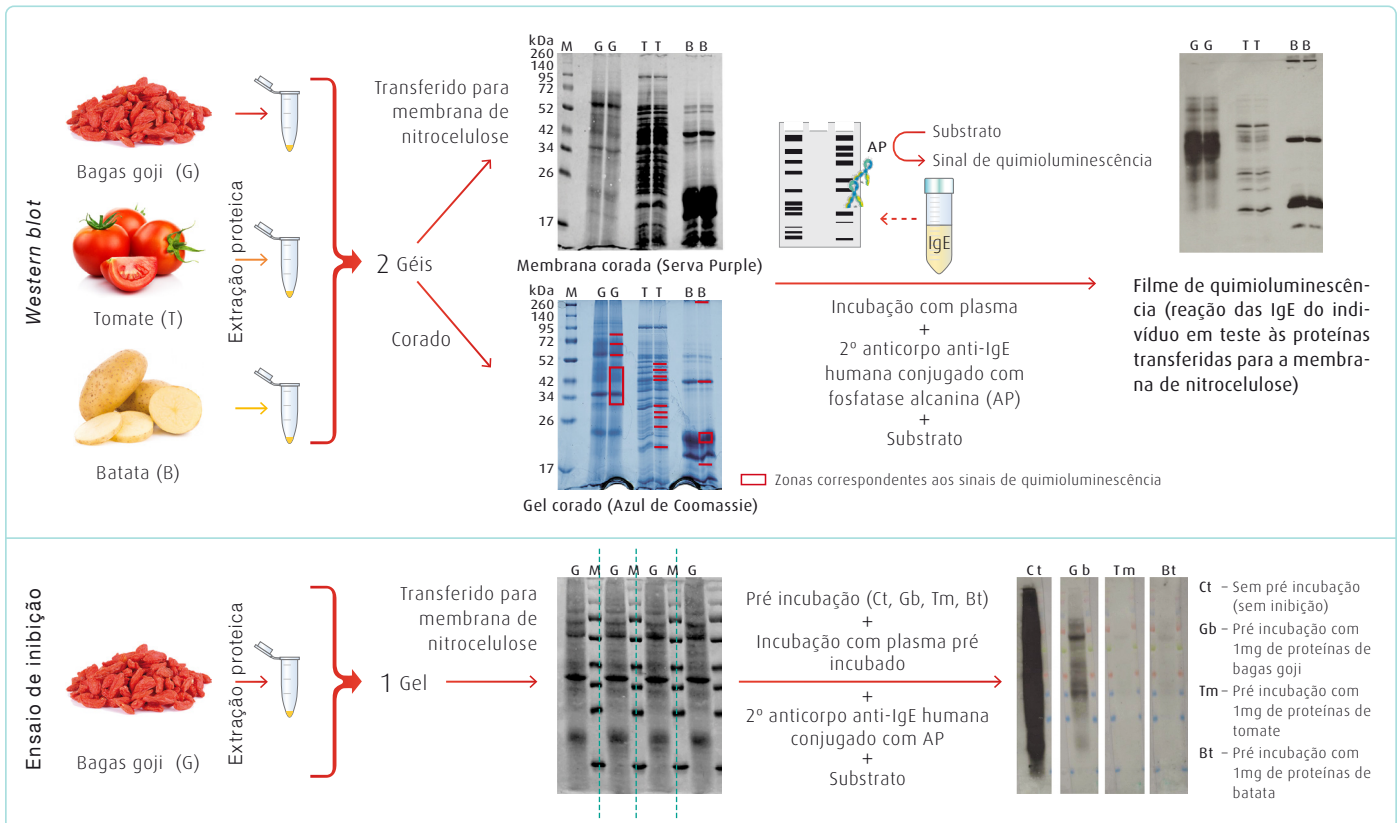


Figura 1: ⬇ Eletroforese unidimensional (1D) e bidimensional das proteínas das bagas goji.



No gel bidimensional estão identificados os spots enviados para identificação por espectrometria de massa (180 spots).
kDa – Quilodaltons; M – Marcador de pesos moleculares. Géis com 11% de poliacrilamida.

Figura 2: ⬇ Western blot e Ensaio de inibição que provam existir reatividade cruzada entre as bagas goji e o tomate e batata (exemplo para o indivíduo 1, com alergia comprovada ao tomate (33,2 kU IgE/L) e batata (30,8 kU IgE/L)).



M – Marcador de pesos moleculares; G – Extrato proteico de bagas goji; T – Extrato proteico de tomate; B – Extrato proteico de batata; kDa – Quilodaltons.



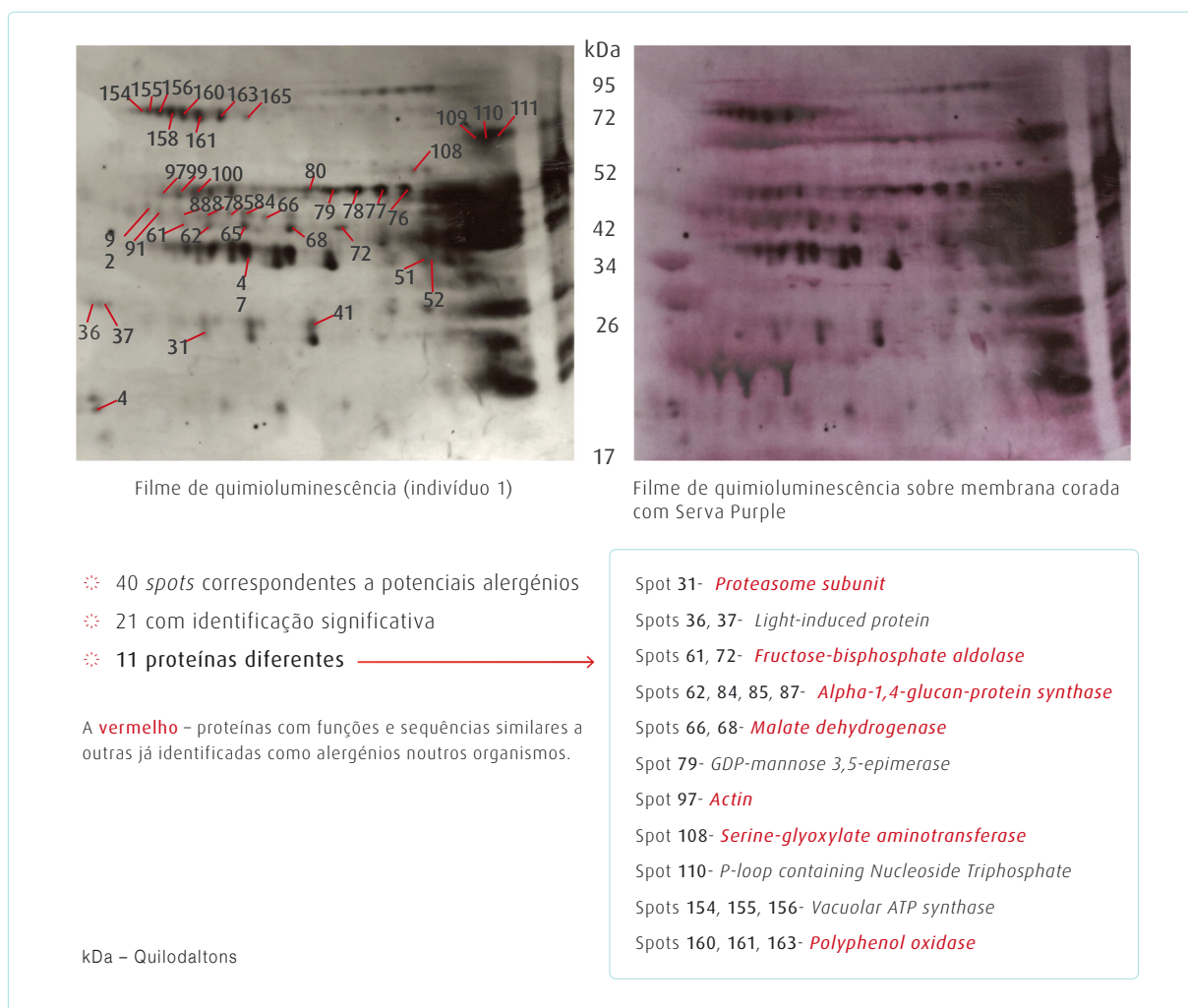
Caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica às bagas goji

No ensaio de *Western Blot* realizado para a caracterização das proteínas das bagas goji foi possível relacionar os sinais de quimioluminescência obtidos, com 40 spots do gel, 21 dos quais com identificação significativa por espectrometria de massa. As identificações significativas obtidas correspondem a proteínas com 11 funções diferentes, sete das quais já identificadas como potenciais alergénios noutros organismos (base de dados *Allergome*) e quatro pela primeira vez reportadas como potenciais alergénios (figura 3). Relativamente aos alergénios com seqüências proteicas semelhantes àquelas já reportadas na base de dados *Allergome*, verificámos

que alguns foram identificados no pólen e no látex, o que poderá indicar uma possível reatividade cruzada entre as proteínas das bagas goji e anticorpos presentes no plasma de indivíduos com alergia ao látex (síndrome látex-alimento) (16) e/ou com alergia ao pólen (Síndrome de alergia oral) (17). A possível reatividade cruzada entre os alergénios das bagas goji e anticorpos presentes no plasma de indivíduos alérgicos ao látex já foi reportada por outros (18).

De realçar que nenhuma das 11 proteínas que se ligaram às IgE dos indivíduos em teste, foi, até à data, reportada como potencial alergénio na família das *Solanaceae* e, consequentemente, nenhuma foi alguma vez reportada como potencial alergénio de *Lycium barbarum*. Na base de dados *Allergome*

Figura 3: ⬇ Ensaio de *Western blot* para caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica (exemplo para o indivíduo 1).





estão, no entanto, reportados 37 potenciais alergénios para a família das *Solanaceae*, 3 dos quais de *Lycium barbarum*: uma proteína de transporte de lípidos (Lyc ba 3); uma enolase (Lyc ba Enolase) e uma glucosidase (Lyc ba Glucosidase). Como já referido o alergénio Lyc ba 3, que corresponde a uma proteína de transporte de lípidos (LTP- lipid transfer protein) com 7-9 kDa de peso molecular foi descrita como o alergénio principal de *Lycium barbarum*, (13-15) no entanto nenhum dos indivíduos testados neste estudo reagiu contra esta proteína. Como utilizámos neste estudo géis com 11% de acrilamida, por verificarmos serem os mais indicados para a visualização dos spots na área de pesos moleculares onde os alergénios estão mais concentrados (30-52 kDa), pensámos que provavelmente teríamos perdido esta proteína durante a separação por eletroforese. No entanto repetimos o ensaio de *Western* apresentado na figura 2, utilizando géis com 15% de acrilamida e continuámos a não detetar qualquer tipo de sinal na zona dos 7-9 kDa, o que mostrou que, ou os indivíduos em teste não reagiram contra esta proteína ou o método de extração utilizado não foi eficiente para a sua extração.

Conclusão

Este estudo contribuiu para a caracterização do proteoma das bagas goji, com a identificação de 93 dos 180 spots separados por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, correspondendo a 29 funções proteicas. Para além disso, foram identificados, na família das *Solanaceae*, pela primeira vez, 11 novos potenciais alergénios, quatro dos quais nunca reportados na base de dados *Allergome*. Provámos também, com este estudo, existir reatividade cruzada entre os alergénios das bagas goji e anticorpos existentes no plasma de indivíduos com alergia ao tomate e/ou batata.

Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados num artigo publicado em 2019 (19).

Referências bibliográficas:

- (1) Luo Q, Cai Y, Yan J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci*. 2004 Nov 26;76(2):137-49. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.056>
- (2) Hu CK, Lee YJ, Colitz CM, et al. The protective effects of *Lycium barbarum* and *Chrysanthemum morifolium* on diabetic retinopathies in rats. *Vet Ophthalmol*. 2012 Sep;15 Suppl 2:65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01018.x>
- (3) Deng X, Li Q, Fu Y, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides with different molecular weights on function of RAW264.7 macrophages. *Food Agric Immunol*. 2018;29(1):808-20. <https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1457628>
- (4) Tang WM, Chan E, Kwok CY, et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology*. 2012 Dec;20(6):307-14. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0107-3>
- (5) Xiao J, Liong EC, Ching YP, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jan 31;139(2):462-70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.033>
- (6) Qian D, Zhao Y, Yang G et al. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules*. 2017 Jun 8;22(6):911. <https://doi.org/10.3390/molecules22060911>
- (7) Guo M, Shi T, Duan Y, et al. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. *J Food Compos Anal*. 2015;42:84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.03.004>
- (8) Llorent-Martínez EJ, de Córdova MLF, Ortega-Barrales P, et al. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. *Microchem J*. 2013;110:444-51. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.05.016>
- (9) Nascimento NA, Silvestre DM, Leme FO, et al. Elemental analysis of goji berries using axially and radially viewed inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Spectroscopy*. 2015;30(1):36-41. <https://www.spectroscopyonline.com/view/elemental-analysis-goji-berries-using-axially-and-radially-viewed-inductively-coupled-plasma-optical>
- (10) Leung H, Hung A, Hui AC et al. Warfarin overdose due to the possible effects of *Lycium barbarum* L. *Food Chem Toxicol*. 2008 May;46(5):1860-2. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.008>
- (11) Arroyo-Martínez Q, Sáenz MJ, Arquélles Arias F, et al. *Lycium barbarum*: A new hepatotoxic "natural" agent? *Dig Liver Dis*. 2011 Sep;43(9):749. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2011.04.010>
- (12) Gómez-Bernal S, Rodríguez-Pazos L, Martínez FJ, et al. Systemic photosensitivity due to goji berries. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2011 Oct;27(5):245-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2011.00603.x>
- (13) Ballarín SM, López-Matas MA, Sáenz Abad D, et al. Anaphylaxis Associated with the Ingestion of goji berries (*Lycium barbarum*). *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2011;21(7):567-70. <http://www.jiaci.org/issues/vol21issue7/12.pdf>
- (14) Carnés J, Larramendi CH, Ferrer A, et al. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to goji berries (*Lycium barbarum*). *Food Chem*. 2013 Apr 15;137(1-4):130-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.00>
- (15) Larramendi CH, García-Abujeta JL, Vicario S, et al. Goji berries (*Lycium barbarum*): Risk of allergic reactions in individuals with food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):345-50. <http://www.jiaci.org/issues/vol22issue5/4.pdf>
- (16) Blanco C. Latex – fruit syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003 Jan;3(1):47-53. <https://doi.org/10.1007/s11882-003-0012-y>
- (17) Price A, Ramachandran S, Smith GP, et al. Oral allergy syndrome (pollen-food allergy syndrome). *Dermatitis*. 2015;26(2):78-88. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000087>
- (18) Gámez C, Marchán E, Miguel L, et al. Goji berry: A potential new player in latex-food syndrome *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Mar;110(3):206-7. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.12.012>
- (19) Teixeira S, Luís IM, Oliveira MM, et al. Goji berries superfood – contributions for the characterization of proteome and IgE binding proteins. *Food Agric Immunol*. 2019;30(1):262-80. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1577364>