



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Doctorado En Ciencias de la Salud

Purificación y caracterización de profilinas de trigo con potencial reactividad
cruzada con profilinas de polen de ciprés

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias de la Salud

Presenta:

Alejandra Medina Hernández

Dirigido por:

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias de la Salud

Purificación y caracterización de profilinas de trigo con potencial reactividad cruzada con profilinas de polen de ciprés

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias de la Salud

Presenta:

Alejandra Medina Hernández

Dirigido por:

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Presidente


Firma

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Secretario


Firma


Dr. Francisco Quintanilla Guerrero
Vocal


Firma

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Suplente

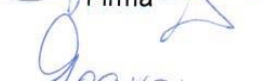

Firma

Dra. Susana Vargas Muñoz
Suplente


Firma

Dr. Javier Ávila Morales
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado


Firma

RESUMEN

Las enfermedades alérgicas afectan a cerca de mil millones de personas alrededor del mundo. Las alergias alimentarias tienen una prevalencia entre el 2 al 8% y se incrementa anualmente. El diagnóstico de alergia alimentaria se basa en la historia clínica sugerente y la demostración de sensibilización específica para alérgeno ya sea por métodos *in vivo* (pruebas cutáneas o reto alimentario) o *in vitro* (determinación de anticuerpos de tipo IgE específicos). Más del 90% de las reacciones alérgicas a alimentos son causadas por una docena de alimentos por lo que se hace necesario conocer las propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas de los alérgenos alimentarios que expliquen que las reacciones clínicas pueden ocurrir debido a la reactividad cruzada entre alérgenos estructuralmente homólogos a los que un paciente se ha sensibilizado con anterioridad por una fuente diferente (panalérgenos). El objetivo del presente trabajo fue realizar la purificación y caracterización de la profilina del trigo y compararla con la profilina del polen *Cupressus arizonica* en busca de homología estructural como mecanismo de reactividad cruzada entre el polen del ciprés y trigo. Se realizó una primera separación de proteínas mediante cromatografía por columnas, por intercambio iónico, empleando dietilaminoetilcelulosa en la fase inmóvil. Los productos obtenidos de las diferentes etapas de la purificación, así como el contenido protéico del extracto total de trigo se analizaron mediante SDS-PAGE, y finalmente se realizó un ensayo de dispersión de luz dinámica para identificar la presencia de las proteínas con un peso molecular entre 12 y 19. Resultados: Se identificó del concentrado purificado dos proteínas similares con masa molecular de entre 35 a 40 kDa que corresponden con la masa molecular del alérgeno principal de del polen *cupressus arizonica*. Mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, la distribución del tamaño de las partículas tuvo un promedio de 293.22 nm para la de trigo y 276.58 nm para la de polen de extracto alérgico de *cupressus arizonica*. A pesar de que podemos describir características comunes de los alérgenos, la biología estructural no puede aportar elementos de discriminación confiables que permitan su identificación ya que deberá probarse la capacidad de unión a moléculas de Inmunoglobulina E *in vivo*.

(Palabras clave: homología estructural, reactividad cruzada, alergia alimentaria)

SUMMARY

Allergic diseases affect about one billion people around the world. Food allergies have a prevalence of 2 to 8% and increase annually. The diagnosis of food allergy is based on the suggestive clinical history and demonstration of specific sensitization for allergen either by *in vivo* methods (skin tests or food challenge) or *in vitro* (determination of specific IgE type antibodies). More than 90% of allergic reactions to food are caused by a dozen foods, making it necessary to know the physicochemical and immunogenic properties of food allergens explaining that clinical reactions can occur due to cross-reactivity between structurally homologous allergens to which a patient has previously been sensitized by a different source (panallergens). The objective of the present work was to carry out the purification and characterization of the wheat proline and to compare it with the prophylaxis of the *Cupressus arizonica* pollen in search of structural homology as a mechanism of cross reactivity between cypress and wheat pollen. A first separation of proteins was carried out by column chromatography, by ion exchange, using diethylaminoethylcellulose in the immobile phase. The products obtained from the different purification steps as well as the protein content of the total wheat extract were analyzed by SDS-PAGE and finally a dynamic light scattering assay was performed to identify the presence of proteins with a molecular weight between 12 and 19. Results: Two similar proteins with a molecular mass of 35-40 kDa corresponding to the molecular mass of the major allergen of the pollen *cupressus arizonica* were identified from the purified concentrate. By means of the dynamic light scattering technique, the particle size distribution averaged 293.22 nm for wheat and 276.58 nm for the allergenic extract pollen of *cupressus arizonica*. Although we can describe common characteristics of the allergens, structural biology can not provide reliable discrimination elements that allow its identification since the ability to bind to immunoglobulin E molecules *in vivo* must be tested.

(Key words: structural homology, cross reactivity, food allergy)

A Dios, quien siempre guía mis pasos, y me sostiene en momento de
flaqueza.
A mi padre, por su ejemplo de vida.
A mi familia, por todo el tiempo cedido para la culminación de éste
proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración de la Doctora Susana Vargas Muñoz y del Mtro. Ulises Merino por el trabajo realizado en el laboratorio.

INDICE

1. INTRODUCCION	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Alergia.....	11
2.2 Alergia Alimentaria	12
2.3 Mecanismos de la alergia alimentaria	13
2.4 Alérgenos alimentarios más comunes.....	15
2.5 Polinosis.....	17
2.6 Comorbilidades de la Polinosis. Síndrome polen-alimento.....	18
2.7 Polen del ciprés y alergia al polen del ciprés	20
2.8 Cereales y alergia al trigo	24
2.9 Sensibilización y Respuesta alérgica	29
2.10 Alérgeno y Respuesta Alérgica	32
2.11 El papel de las proteínas como alergen.....	35
2.12 Funciones intrínsecas de los alergen.....	39
2.13 Panalergen.....	40
2.14 Proteínas relacionadas con la patogenicidad.....	41
2.15 Profilinas	44
2.16 Profilina como alergen	48
2.17 Reactividad cruzada	49
2.18 Diagnóstico de alergia alimentaria	53
2.19 Purificación de proteínas.....	55
2.20 Propiedades de las proteínas	56
2.21 Conceptos en purificación de proteínas	57
2.22 Técnicas de purificación	58
2.23 Objetivo General:.....	94
2.24 Objetivo Particular:	94

3. METODOLOGIA.....	94
3.1 Mediciones y análisis	94
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
Identificación de proteínas de trigo	97
Resultados del método de dispersion de luz dinámica.....	98
5. BIBLIOGRAFÍA	102

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Alergenos del grupo de polenes de gramíneas	24
<i>Figura 1. Clasificación de las proteínas del gluten de trigo. Adaptado de Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. Clin Exp Allergy 2008; 38(11): 1712-26.</i>	
	28
Tabla 2. Ejemplos de ligados utilizados en la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.....	62
Tabla 3. Ejemplos de requerimientos de pureza:.....	65
Tabla 4. Propiedades de las proteínas y sus efectos en el desarrollo de una estrategia de purificación	67
<i>Figura 2. selectividad durante la desorción de la muestra de la columna</i>	73
<i>Fig 3. Preparación y fases de las estrategias de purificación de proteínas.</i>	75
Tabla 5. Técnicas cromatográficas basados en las propiedad específicas de las proteínas	76
Tabla 6. Adecuación de las técnicas de purificación para la estrategia e purificación de tres etapas	77
<i>Fig. 4a Combinaciones lógicas de las etapas cromatográficas.</i>	80
<i>Fig. 4b Combinaciones lógicas de las etapas cromatográficas.</i>	81
Tabla 7. Uso de columnas preempacadas de sefarosa para acondicionamiento.....	83
Tabla 8. Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad	85
Tabla 9. Principales métodos para la cuantificación de proteínas. Principales ventajas e inconvenientes.	86
Tabla 8. Preparación del Gel de separación de electroforesis SDS-PAGE al 15%	96
Tabla 9. Preparación del Gel de empaquetamiento de electroforesis SDS-PAGE al 5%	96
Tabla 10. Preparación del buffer de corrida de proteínas (electrodo 2x)	96
<i>Figura 6: Distribución de tamaño de partículas de muestra de profilinas de extracto de trigo dispersa en agua a pH 7, media de diametro de la muestra de trigo 343.5 nm</i>	99
<i>Figura 7: Distribución de tamaño de partículas de muestra de profilinas de extracto alergénico de cupressus arizonica dispersa en agua a pH 7, media de diametro de la muestra de cipress 302.9 nm</i>	100

1. INTRODUCCION

La aparición de las alergias alimentarias no se distribuye de manera uniforme en todo el mundo y demuestra algunas fluctuaciones notables:

- 1) Aun a pesar de que se carece de datos epidemiológicos en varias partes del mundo, no parece haber grandes diferencias regionales en la variabilidad del patrón de alimentos a los que los pacientes reaccionan.
- 2) Los bebés, los niños mayores y los adultos reaccionan a diferentes alimentos.
- 3) Existe evidencia de que la prevalencia de alergia a los alimentos puede estar aumentando, es decir, hay un cambio temporal, en paralelo con el aumento de las alergias por inhalación visto en muchas partes del mundo.
- 4) De la gran variedad de proteínas de los alimentos ingeridos solo un número relativamente pequeño parece actuar como alérgenos alimentarios (Poulsen et al. 2014).

Múltiples alergias, tanto a pólenes como alimentos de origen vegetal parecen estar determinados por sensibilización a alérgenos menores que participan en funciones vitales generales y pueden encontrarse tanto en plantas como en seres humanos, conocidos como panalergenos. Aunque procedentes de organismos no relacionados, tales moléculas funcionalmente relacionadas, comparten regiones de secuencias y estructuras tridimensionales y pueden, por tanto, cumplir con los requisitos para el reconocimiento cruzado por la IgE. Los panalergenos de interés alergológico conocidos en la actualidad comprenden solo una pocas familias de proteínas: profilinas, polcalcinas, proteínas inespecíficas transportadoras de lípidos (LTP) y análogos del alérgeno principal del polen del abedul (Bet v1) (Hauser et al. 2010).

La segunda causa de alergia en México, después de los ácaros del polvo, corresponde a los pólenes de árboles, y de éstos, los pólenes de fresno, roble y ciprés son de importancia alergológica (Larenas-Linnemann et al. 2011; Medina-Hernández 2009).

En el clima semiseco de Querétaro, los alérgenos con mayor relevancia son aquellos con mayor capacidad de resistencia a la sequía: malezas, y árboles del tipo mezquite, álamo y ciprés. En un estudio previo, encontramos correlación positiva entre polen de ciprés y plantas alimenticias regionales, entre ellas, el trigo. En México no existen estudios sobre la prevalencia de la alergia alimentaria y, por lo tanto, de los alérgenos alimentarios más frecuentes. Dado que el ciprés

es un polen predominante en México, del cual existen pocos reportes, y que el trigo es uno de los alimentos de mayor consumo en nuestro país, es probable que existan proteínas con reactividad cruzada, capaces de inducir una respuesta inmunogénica.

2. OBJETIVOS

2.1 Alergia

El término de alergia fue propuesto por primera vez el 24 de julio de 1906 por Von Pirquet para referirse a la desviación del estado original de la conducta del sujeto normal. Hoy en día, alergia se define como una respuesta inmunológica de hipersensibilidad que puede dar paso a una variedad de enfermedades vía diferentes mecanismos fisiopatológicos; de modo que la alergia no es una enfermedad en sí misma sino un mecanismo que da origen a diferentes enfermedades. En la práctica clínica, la alergia se manifiesta en forma de entidades como la anafilaxia, urticaria, angioedema, rinoconjuntivitis alérgica, asma alérgica, enfermedad del suero, vasculitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones granulomatosas, reacciones de hipersensibilidad inducidas por alimentos o por medicamentos (Puc 2003; Ring et al. 2012).

Los costos directos e indirectos derivados de la atención médica por enfermedades alérgicas, la pérdida de la productividad y ausentismo laboral impactan en la macroeconomía y aún existen lagunas importantes en el conocimiento científico de los mecanismos fisiopatológicos, prevención, atención al paciente y los determinantes sociales que favorecen el aumento en la prevalencia de éstas (Demoly et al. 2014), por lo tanto, conocer las características de las moléculas que intervienen en la reacción alérgica se hace imperativo, además en la evaluación de la seguridad de las nuevas proteínas en la cadena alimentaria humana, incluyendo la evaluación de seguridad que precede a la introducción de alimentos genéticamente modificados. El enfoque predominante en relación con la alergia ha sido hasta ahora en la fase de estimulación de la respuesta alérgica y falta investigación relacionada con los mecanismos de inducción de la fase de sensibilización o su predicción (Poulsen et al. 2014).

2.2 Alergia Alimentaria

La alergia alimentaria es la principal patología motivo de consulta en el departamento de urgencias de los hospitales de Estados Unidos y Europa, tan solo en los Estados Unidos se le ha relacionado con 30 mil reacciones anafilácticas, 2000 hospitalizaciones y 200 muertes cada año (Cianferoni y Spergel, 2009).

Se estima que el 25% de la población en los Estados Unidos creen que tienen alguna alergia alimentaria mientras que, de acuerdo con la Encuesta de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea, el 19% de la población ha reportado sentirse enfermo o con malestar posterior a la ingesta de un alimento en particular. Referente a estudios latinoamericanos, Marrugo reporta una prevalencia de 14,9% mientras que en el Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León se encontró una prevalencia de alergia alimentaria del 2,67% en pacientes que acudieron por vez primera a consulta de alergia, es decir, alergia alimentaria como comorbilidad de enfermedades alérgicas y no como causa de consulta (Bartra et al. 2009; Cianferoni & Spergel 2009; Kummeling et al. 2009; Burney et al. 2014; Ibañez & Garde 2009; Asero et al. 2009; Marrugo et al. 2008; Rodríguez-Ortiz et al. 2009)

Se desconocen las razones del incremento de la prevalencia de la alergia alimentaria, sin embargo, debido al corto periodo de tiempo en el que se ha presentado, se sugiere que los factores externos al individuo (vegetación, densidad poblacional, características ecogeográficas y fisicoquímicas del ambiente) tiene un mayor impacto que los factores genéticos (Gouitaa et al. 2005) además, el diagnóstico de alergia alimentaria es complejo. Muchos de los estudios de prevalencia de alergia alimentaria, y específicamente alergia a plantas alimenticias, se basan en autoreportes de síntomas, y pocos estudios han utilizado retos alimentarios, determinación de niveles de IgE sérica específica o pruebas doble ciego controladas con placebo, estándar de oro para el diagnóstico de alergia alimentaria, lo que puede dar errores en el cálculo de la prevalencia (Hoffmann-Somergruber y cols., 2008; Bartra y cols., 2009; Kummeling y cols, 2009; Wang y Sampson, 2009).

2.3 Mecanismos de la alergia alimentaria

Normalmente, existe un equilibrio en el sistema inmune gastrointestinal que distingue entre microorganismos potencialmente patógenos, flora comensal y alérgenos alimentarios menores que no activan al sistema inmune, lo que se conoce como tolerancia inmunológica (Wang, 2009).

La tolerancia oral depende de una barrera gastrointestinal intacta e inmunológicamente activa. Esta barrera está formada por células epiteliales y sus uniones firmes, la barrera mucosa, las enzimas presentes en el borde luminal, sales biliares y el pH, todo lo cual contribuye para disminuir la inmunogenicidad de los antígenos, además de la vigilancia por los mecanismos de defensa innatos (Cianferoni y Spergel, 2009). La pérdida de la tolerancia puede ocurrir cuando el antígeno tiene una ruta alterna de ingreso: cutánea o respiratoria debido que el alimento induce síntomas en pacientes sensibilizados a alérgenos homólogos presentes en aeroalergenos (Bartra et al. 2009) también puede ocurrir como un defecto de las células T reguladoras, o debido a la edad de exposición a los alérgenos alimentarios. La ablactación temprana parece que tiene un papel importante, tal vez porque la madurez intestinal es un factor protector para el desarrollo de alergia (Cianferoni y Spergel, 2009).

El proceso de sensibilización a un alérgeno alimentario representa una interacción entre el sistema inmune del huésped, la comida, y las circunstancias en que la exposición tiene lugar. Se puede suponer que los bebés desarrollan alergia a la proteína de la leche de vaca después de ingerir grandes cantidades de leche y que la ruta de la sensibilización se da a través del tracto digestivo. Por otra parte, está bien documentado que una gran proporción de las alergias alimentarias que ocurre en adultos y adolescentes se deriva de la reactividad cruzada entre las proteínas de los alimentos y alérgenos derivados de polen donde se cree que la ruta de la sensibilización sea a través de la inhalación. Para los alimentos como los cacahuates y otras legumbres, pescados y mariscos, la ruta de la sensibilización es menos clara y se han sugerido mecanismos transdérmicos y por inhalación, además de la sensibilización por vía oral (Poulsen et al. 2014).

Las reacciones inmunológicas a los alimentos o alergias alimentarias pueden ser mediadas por IgE, (hipersensibilidad tipo I), mediadas por

mecanismos celulares (hipersensibilidad tipo IV) o por una combinación de ambas (Cianferoni & Spergel 2009; Wang & Sampson 2009).

Las reacciones medidas por IgE ocurren en las primeras dos horas posteriores a la exposición. La unión del alérgeno alimentario a moléculas de IgE específica sobre células efectoras como basófilos y células cebadas lleva a la liberación de mediadores (histamina, triptasa, cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas D2) lo que lleva a una gran variedad de síntomas que afectan a los sistemas cutáneo, respiratorio, gastrointestinal y cardiovascular (Wang, 2009). En relación con la presentación clínica, son bien reconocidas las formas de anafilaxia y urticaria (Cianferoni & Spergel 2009)

Los problemas mediados por mecanismos no dependientes de IgE son celulares, además de involucrar la formación de complejos inmunes y el depósito de complemento, involucra proteínas desnaturalizadas (Bonds, Midoro-Horiuti y cols, 2008). En este grupo de patologías, que involucra la esofagitis eosinofílica, la gastroenteritis eosinofílica y la enterocolitis inducida por proteínas, no se puede demostrar la presencia de anticuerpos IgE por los métodos tradicionales. El inicio de síntomas es más lento que en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, pasando desde varias horas hasta una semana después de haber ingerido el alimento, siendo necesario, en ocasiones, la exposición repetida al alérgeno para desencadenar síntomas que demuestren la relación causal (Jesenak et al. 2008; Cianferoni & Spergel 2009).

El desarrollo de una respuesta inmune mediada por IgE ante un alimento requiere una serie de interacciones moleculares y celulares, las cuales involucran células presentadoras de antígenos, linfocitos T y linfocitos B (Steckelbroeck, Ballmer-Weber y cols, 2008).

Existen factores que favorecen la ruptura de la barrera inmune gástrica tales como cambios en pH (como el uso de antiácidos, las enzimas gástricas que afectan la alergenicidad de las proteínas), el tipo de bacterias comensales que se unen a receptor de linfocitos T semejante a receptores tipo Toll 4 (TLR4 y 9), además son factores de mal pronóstico: la presencia de asma, alcohol, aspirina, beta bloqueadores, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, inhibidores de monoaminoxidasa, antidepresivos tricíclicos e infecciones concurrentes (Wang, 2009), sin embargo, a pesar de los ácidos gástricos, el 2%

de los alimentos se absorbe en el intestino de un modo inmunológicamente intacto que puede causar alergia (Kurowski, 2008).

Se han reportado pacientes con síndrome de intestino irritable que comenzaron con síntomas de alergia alimentaria después de una infección intestinal aguda, tal vez por la participación de sensibilización periférica o hipermotilidad activada por la inducción de citocinas pro inflamatorias de la mucosa intestinal o por participación del plexo nervioso intestinal (Drossman & Dumitrascu 2006).

La posibilidad de que proteínas de nuevos alimentos, medicamentos u organismos genéticamente modificados pudieran tener reactividad cruzada con alérgenos conocidos, debiera ser motivo de preocupación tanto para las agencias reguladoras como de los científicos y los médicos (Ivanciuc, Schein y cols, 2009).

2.4 Alérgenos alimentarios más comunes

Los factores ambientales a los que se expone una población específica son determinantes para el tipo de alimento involucrado en producir alergia alimentaria. Los hábitos dietéticos, y pólenes de cada área geográfica influyen en ciertos patrones alérgicos a pólenes y plantas alimenticias. En Europa del norte y central, las reacciones alérgicas a plantas alimenticias se asocian a alérgenos del polen del abedul; en Europa del sur (España e Italia), los pólenes con mas altas concentraciones son el olivo, el chenopodium, y parietaria y los alimentos más frecuentemente implicados son frutas, nueces, mariscos, leche y huevo; en los Estados Unidos, donde el polen mas frecuente es la artemisia, se ha reportado asociación con plátano y melón; en Japón, la polinosis mas frecuente se debe al cedro japonés y presenta reactividad cruzada con el jitomate. Dentro de las frutas, las que con mayor frecuencia producen reacciones alérgicas son las rosáceas, que incluyen frutas de amplio consumo como durazno, manzana, pera, durazno, cereza, ciruela y fresa, entre otras. En el estudio italiano, epidemAAITO, más de la mitad de los casos de alergia alimentaria se debieron a reactividad cruzada entre polen-alimento mientras que en Colombia, Marrugo encontró que las frutas/vegetales, mariscos y carnes fueron los alérgenos identificados con mayor frecuencia sin embargo, no todos los pacientes reconocen a los mismos alérgenos ni con la misma intensidad. (Fernandez-Rivas 2009; Flores et al. 2012; Asero et al. 2009; Marrugo et al. 2008)

Dada la gran cantidad de frutas y vegetales que pueden involucrarse en reacciones alérgicas, un estudio multicéntrico realizado en Italia propuso la siguiente clasificación (Asero et al. 2009):

1. Alergia alimentaria tipo 1 (primaria). Esta categoría incluye los siguientes subgrupos de pacientes con sensibilización primaria a alimentos de origen vegetal

a) Proteínas transportadoras de lípidos (LTP). Pacientes con reacciones alérgicas a LTP sin importar la(s) fuente(s).

b) Frutos secos. Este grupo incluye a todos los pacientes alérgicos a nueces (avellanas, nuez, nuez de Brasil, piña de pino, almendras, pistaches, anacardos, castañas, cacahuete) pero no a LTP.

c) Semillas. Pacientes alérgicos a una o más semillas (ajonjolí, girasol, adormidera u otras) pero que no estaban sensibilizados a frutos secos.

d) Leguminosas. Este grupo incluye pacientes alérgicos a una o más leguminosas incluyendo cacahuete, frijol, judía verde, chícharo, garbanzo, altramuza y lentejas.

e) Kiwi. Esta categoría incluye pacientes alérgicos sólo al kiwi.

f) Individuos con alergia a una planta alimenticia. Esta categoría incluye todos los otros alimentos que causaban alergia en individuos.

2. Alergia alimentaria tipo 2 (secundaria). Esta categoría incluye pacientes con alergia a plantas alimenticias causadas por reactividad cruzada a un aeroalergeno primario e incluye los siguientes grupos:

a) Síndrome de alergia polen-alimento. Este subgrupo incluyó pacientes monosensibilizados al polen de abedul (Bet v 1) o que mostraron sensibilización a aeroalergenos estacionales (y, por lo tanto, posiblemente sensibilizado a profilinas). Porque ambos, las proteínas homólogas de Bet v-1 y profilinas son alérgenos sensibles al calor y digestión por pepsina.

b) Síndrome de alergia látex-fruta. Pacientes sensibilizados inicialmente al látex con historia de alergia a alimentos con reactividad cruzada como castaño, aguacate, kiwi, papaya y plátano.

c) Síndrome de Artemisia-apio-especias. Pacientes sensibilizados inicialmente a artemisia con historia de alergia a vegetales con reactividad cruzada potencial como apio, hinojo, anís, pimienta y otras especias.

Los pacientes con alergia clínica a cereales (trigo, cebada, maíz, arroz, centeno) no sensibilizados a LTP, fueron clasificados como un grupo aparte de alergia alimentaria tipo 1 (grupo: cereales).

En un meta-análisis realizado por el grupo EuroPrevall, proyecto fundado en junio de 2005 por la Comisión Europea para evaluar la prevalencia, base y costos de la alergia alimentaria, se agruparon las plantas alimenticias en frutas, verduras, legumbres, frutos secos, trigo, soya y otros vegetales comestibles con el objeto de simplificar su estudio (Zuidmeer et al. 2008; Burney et al. 2014).

2.5 Polinosis

Se define polinosis a la aparición de síntomas respiratorios (rinoconjuntivitis o asma) como resultado de la inhalación de polen, al cual el individuo ha sido sensibilizado (Bartra et al. 2009). La polinosis es la causa más frecuente de alergia respiratoria; se sabe que la rinitis alérgica y el asma son muy comunes en la población general, su prevalencia se calcula en 15 a 25%, y tiene variaciones geográficas. Sin embargo, la alergia al polen adquiere relevancia ya que puede ser responsable del desarrollo de alergia alimentaria a plantas, o puede ser causa directa de inflamación esofágica, gástrica o intestinal en el contexto conocido como alergia digestiva.(Bartra et al. 2009; Luque Piñana 2011).

El polen alergénico es una mezcla de moléculas que incluye alérgenos mayores y menores. Los alérgenos mayores representan los componentes a los cuales; por definición, mas del 50% de los pacientes reacciona, mientras que los alérgenos menores son reconocidos por una menor cantidad de pacientes. En muchos casos, los alérgenos mayores sirven como marcadores de sensibilización a ciertas clases de plantas, por ejemplo: Bet v1 para abedul, Cry j1 y Cry j2 para coniferales, Ole e1 para oleáceas, etc. (Alarcón, Avila, Castells y cols, 2008; Hauser y cols, 2010).

El grano de polen es el vehículo de aeroalergenos de exterior mas importante, y debe reunir una serie de requisitos para llevar a cabo un transporte eficaz: a) tener un diámetro entre 15 y 60 micras, b) proceder de plantas anemófilas que incluyen árboles, malezas y gramíneas y pueden agruparse en: a) árboles (Fagales, pinales, rosales, arecales, escrofuriales, junglandales, salicales y mirtales) b) pastos (*Bambusioideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Panicoideae*, y *Poideae*), y c) malezas (*Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, y

Urticaceae) y c) liberar fácilmente los alérgenos al llegar a la mucosa del individuo alérgico. La estación de polinización de las plantas alergénicas se extiende a lo largo del año, comienza con la primavera (árboles), pasa por el verano (pastos) hasta el otoño tardío (malezas) (Alarcón, Avila, Castells y cols, 2008; Hauser y cols, 2010). (Hauser et al. 2010; Luque Piñana 2011)

La relación existente entre las concentraciones de polen y la presencia de síntomas de asma es más que evidente. Los alérgenos inductores de alergia estacional, no sólo se encuentran en el interior del grano de pólen, sino también fuera de los mismos, en partículas inferiores a 10 micras que se encuentran libres en la atmósfera. Estas partículas proceden de restos de las plantas (anteras) o del interior de los granos de polen, cuando éstos se rompen por acción de la lluvia o bien porque sus antígenos son liberados a través de los poros y microporos de su cubierta externa (exina), se transportan en el aire absorbidos en micropartículas como las procedentes de la combustión de los motores diesel. Incluso fuera del período de polinización, pueden encontrarse en el ambiente alérgenos de un polen específico, que pueden ser cuantificados (concentración de alérgeno en aire ambiente por metro cúbico). Esto se ha comprobado en un trabajo realizado en Ciudad Real, España, donde se midió los pacientes. Los pólenes de gramíneas se detectaron exclusivamente entre el 28 de abril y 18 de Julio, encontrando una correlación positiva entre granos de polen y síntomas ($r=0.62$, $P<0.001$). Los alérgenos de gramíneas se detectaron no sólo en primavera sino también después de la estación polínica. La correlación entre aeroalérgenos y síntomas resultó muy significativa ($r=0,76$, $P<0.0001$). De esto concluyen que la actividad alergénica de las gramíneas se expresa durante todo el año, demostrándose la presencia de sus alérgenos fuera de la estación polínica (Luque Piñana 2011).

2.6 Comorbilidades de la Polinosis. Síndrome polen-alimento

A pesar de que la inflamación del tracto digestivo puede ser resultado de la alergia a un alimento dado, la polinosis juega un papel importante en la generación de respuestas Th2 clínicamente relevantes o no, como parte de una respuesta sistémica (Bartra et al. 2009).

Se estima que del 30 al 60% de los pacientes alérgicos a pólenes en Europa tienen alguna forma de alergia digestiva asociada (Bartra et al. 2009), ya en 1987 Amlot y cols, describieron un cuadro clínico de alergia alimentaria

conocido como síndrome de alergia oral (SAO), producido por la ingesta de alimentos vegetales, fundamentalmente frutas y frutos secos que se presentaba en pacientes alérgicos a pólenes. Los pacientes refieren de forma inmediata con la ingesta de estos alimentos prurito oral y faríngeo y en ocasiones edema en mucosa oral, faríngea y labial. Actualmente, su prevalencia se calcula en 8% en adultos y 5% en niños (Maeda et al. 2010; Luque Piñana 2011).

De forma global, el término síndrome polen-alimento define una serie de síntomas clínicos que aparecen después de la ingesta de alimentos de origen vegetal en sujetos alérgicos a pólenes. Después de la ingesta de éstos, los pacientes experimentan reacciones adversas del tipo urticaria, angioedema, rinocojuntivitis, asma, anafilaxia, síndrome de alergia oral con más frecuencia que la población general (Riccardo Asero 2011a; Flores et al. 2012).

En Europa Central y del Norte, se han reportado asociaciones entre los pacientes alérgicos al polen del abedul, gramíneas, ambrosía y/o artemisia que presentan sintomatología tras la ingesta de frutas de la familia de las rosáceas como cereza, durazno, chabacano, pera y manzana, mientras que en los Estados Unidos, donde el polen más frecuente es la artemisia, se ha reportado asociación con el plátano y melón; y en Japón, la polinosis más frecuente es por polen de cedro japonés y presenta reactividad cruzada con jitomate (Maeda et al. 2010; Hauser et al. 2010).

Este cuadro clínico se debe a la reactividad cruzada entre alimentos y pólenes, debido a la homología de algunas proteínas presentes en ambos. La sensibilización primaria ocurriría por inhalación de un alérgeno, que provoca posteriormente los síntomas al contacto con el alérgeno (panalérgeno) con reactividad cruzada y entrada por vía digestiva; así, al contacto con la mucosa oral provocaría prurito en caso de cuadros localizados de alergia oral (SAO), y en caso de otros alérgenos resistentes a la acción enzimática digestiva, podrían provocar síntomas sistémico (Riccardo Asero 2011b; Luque Piñana 2011; Flores et al. 2012).

Los pólenes y alimentos involucrados en alergia alimentaria no tienen relación botánica pero los alérgenos con potencial reactividad cruzada tienen secuencias protéicas homólogas conservadas a las que se conoce como “panalérgenos” por su amplia distribución en el reino vegetal y están extensamente involucrados en la reactividad cruzada mediada por IgE entre antígenos de

especies vegetales no relacionados, por lo tanto, una de las primeras preguntas a responder al determinar el potencial de reactividad cruzada es el grado de similitud entre alérgenos (Hoffmann-Sommergruber et al. 2008; Ivanciuc, Garcia, et al. 2009).

La segunda causa de alergia en México, después de los ácaros del polvo, corresponde a los pólenes de árboles, y de éstos, los pólenes de fresno, roble y ciprés son de importancia alergológica (Larenas-Linnemann et al. 2011; Medina-Hernández 2009).

En el clima semiseco de Querétaro, los alérgenos con mayor relevancia son aquellos con mayor capacidad de resistencia a la sequía: malezas, y árboles del tipo mezquite, álamo y ciprés. En un estudio previo, encontramos correlación positiva entre polen de ciprés y plantas alimenticias regionales, entre ellas, el trigo. En México no existen estudios sobre la prevalencia de la alergia alimentaria y por lo tanto, de los alérgenos alimentarios más frecuentes. Dado que el ciprés es un polen predominante en México, y que el trigo es uno de los alimentos de mayor consumo en nuestro país, es probable que existan proteínas con reactividad cruzada, capaces de inducir una respuesta inmunogénica.

2.7 Polen del ciprés y alergia al polen del ciprés

Las coníferas conforman uno de los cuatro grandes grupos (divisiones) clasificadas como gimnospermas: *Coniferophyta*, *Cycadophyta*, *Gingophyta* y *Gnetophyta*. Todos estos grupos corresponden a plantas vasculares, dentro de las cuales, las coníferas constituyen el grupo más importante para el hombre desde el punto de vista económico. De ellos se obtiene madera, papel y una gran variedad de resinas utilizadas en la industria química y farmacéutica. Se conocen alrededor de 50 géneros (500 especies) que se agrupan en siete familias principales: *Picea* (abetos, pinos, oyameles, cedros, abetos canadienses), *Cupressaceae* (juníferos y cipreses), *Taxodiaceae* (secuoidas y ahuehuetes), *Popocarpaceae* (pinos antárticos) y *Araucariaceae* (Araucaria). Casi todas las coníferas presentan un tronco principal en torno al cual se desarrolla un importante crecimiento secundario, presentan hojas simples aciculares o en forma de escamas, de textura áspera. La estructura reproductiva más común es el cono y se polinizan mediante el viento (INE 2002).

Los árboles de los órdenes Fagales, Oleaceae y Cupressaceae contienen las fuentes de pólenes alergénicos clínicamente mas relevantes a nivel mundial (Ferreira y cols., 20014). El género cupressus está formado por 30 especies, es originario de las regiones templadas y subtropicales del Hemisferio Norte, de las montañas del sur y este de la región mediterránea. Se extiende en Asia Central, China y Norteamérica, poliniza preferentemente en invierno, aunque tiene variaciones. *Cupressus arizónica* es originaria del sur de Estados Unidos y el norte de México, y ha sido exportado ampliamente. Tiene forma de torre, es una conífera siempre verde que puede crecer hasta 25 metros de altura. Sus hojas van de un verde pálido a un azul-gris. Sus flores son amarillas, onconspicuas, monecius (flores individuales, que pueden ser femeninas o masculinas, pero ambos sexos pueden encontrarse en la misma planta), poliniza preferentemente de octubre a febrero, sin embargo, en algunas áreas este polen puede estar presente la mayor parte del año. Otras especies, como *Cupressus sempervirens* poliniza preferentemente de enero a abril. Año con año, las variaciones en los picos máximos de polinización entre especies pueden variar aproximadamente 29 días y la precocidad de polinización está en relación con el calentamiento global. El polen del ciprés tiene dos importantes características: una baja concentración de proteínas y un alto contenido de carbohidratos. (Charpin et al. 2005; Gouitaa et al. 2005; Cianferoni & Spergel 2009; Shahali et al. 2007; Shahali et al. 2010).

En la región del Mediterráneo, representa del 20 al 40% de la lluvia total de pólenes. Este incremento progresivo en las concentraciones anuales totales se debe al cultivo con fines ornamentales en jardines, parques públicos, aceras, jardines privados (Charpin, 2005; Rocha-Estrada y Rahim Foroughbakhch-Pournavab, 2008). Sus granos de polen miden entre 20 y 30 mcg, generalmente son inaperturados (aunque pueden presentar un poro), esféricos y tienen una exina delgada con gránulos redondeados o yemas de varias formas y tamaños (Charpin, 2005).

Con respecto a sus propiedades alergénicas, la especie mejor estudiada es *Cupressus arizónica*. La familia de *Cupressaceas* contiene 3 proteínas de relevancia alergológica descritas:

1. Cup a1, de 43 kD, descrito por Togawa y cols., 2003 como alérgeno mayor, con actividad de liasa de pectina y reactividad cruzada entre árboles de la misma

especie, 19 de 33 sueros (57%) de los pacientes alérgicos al ciprés han mostrado reactividad significativa a Cup a1 purificado. sin embargo, no se ha descrito reactividad cruzada con alimentos (Shahali et al. 2007; Shahali et al. 2010; Gunawan et al. 2008; Togawa et al. 2008).

2. Cup a2, poligalacturonidasa

3. *Cupressus sempervivens* contiene una proteína asociada con la patogénesis (PR-5), cup a3, proteína inespecífica transportadora de lípidos (nsLTPs) de 21 kD con reactividad cruzada entre ciprés y cedro de la montaña (Togawa, 2003) con actividad semejante a la taumantina, actividad de proteasas de serina y, actividad enzimática de cisteína que podría contribuir a modificar el microambiente, causando malfuncionamiento de las barreras y de la inflamación favoreciendo la sensibilización o exacerbación tanto de lípidos derivados de pólenes y oxidasas. Se considera alérgeno mayor, ya que 63% de 104 pacientes alérgicos al ciprés ha demostrado tener ac IgE específicos contra Cup a3. Presente de forma más constante en diferentes especies de ciprés, se presenta dos semanas después de la polinización y que se expresa principalmente en ambientes contaminados pero se desconocen sus propiedades y reactividad cruzada (Shahali et al. 2007; Shahali et al. 2010; Gunawan et al. 2008)

4. Cup a4 (Cup s8), de 18 kD, con actividad de proteína de unión a canales de calcio (Okamoto et al. 2009).

Estas proteínas se expresan de forma diferente dependiendo de condiciones climáticas y contaminación atmosférica de modo que la potencia alérgica de los extractos de ciprés depende de dónde y cuándo fueron colectados. Los alérgenos purificados del ciprés muestran reactividad cruzada mediada por IgE muy importante, debida en parte al contenido de determinantes de carbohidratos. (Charpin y cols., 2005; Cianferoni y Spergel, 2010; Shahali y cols, 2010; Ferreira y cols., 2014).

En un estudio comparativo entre ciprés mediterráneo (*C. Sempervives*) vs el ciprés de Arizona (*C. Arizonica*), el primero mostró una variedad mas amplia de alérgenos mientras que el último tenía una mayor cantidad del alérgeno mayor de 43 kDa.

Una proteína de 14 kDa fue identificada recientemente en *C. sempervives* ha demostrado tener epítomos conformacionales estables al calor, y se expresa

en niveles más altos en *C. sempervirens* que en *C. arizonica* y *Cryptomeria japonica*. Esta es, probablemente, una proteína de transferencia de lípidos.

La alergia al polen del ciprés se menciona por vez primera en 1929 por Black, quien menciona el papel del *Juniperus sabinooides* en la inducción de la fiebre del heno en Texas y los estados del sur de los Estados Unidos (Shahali et al. 2010)

Los pólenes de los árboles de la familia de las *Cupresáceas* se consideran alérgenos importantes en el área mediterránea. En grupos seleccionados de pacientes expuestos a estos alérgenos, los reportes de prevalencia se incrementan rápidamente, oscilando del 1,04% a 62,9 % dependiendo de la localización geográfica ocupando el primer lugar en polinosis en la zona (Gouitaa et al. 2005; Charpin et al. 2005; Sin et al. 2008; Sposato et al. 2014)

Aun cuando se han reportado alergia al ciprés en numerosos países como Sudáfrica, Francia, Australia, Italia, España, Marruecos, Israel, Albania, Grecia, Turquía, Irán y Japón, y se reconoce que la alergia debida a polinosis va en aumento, en el caso del ciprés, se ha subestimado la misma. La alergia al polen del ciprés es la principal causa de los síntomas de alergia respiratoria invernales, comúnmente se asocia con síntomas de rinoconjuntivitis, fiebre del heno, tos seca y asma. (Charpin et al. 2005; Cianferoni & Spergel 2009; Shahali et al. 2010)

Debido a su tamaño, menor de 5 micras, los mecanismos protectores, generalmente pueden removerlo con facilidad, y cuando llega a ser causa de alergia se asocia preferentemente con enfermedades alérgicas en conjuntivas y tracto respiratorio superior (Boutin y cols., 2005; Charpin, 2005; Cianferoni y Spergel, 2009). Boutin y cols (2005) evaluaron los factores epidemiológicos personales que influyen en el desarrollo de la alergia al ciprés, y encontraron diferencias significativas en el caso de monosensibilización o polisensibilización. En el primer caso (monosensibilización), el sexo femenino, la edad tardía de inicio de síntomas, historia familiar de atopia negativa y niveles bajos de IgE sérica total comparado con respecto a alergia a polen de ambrosía. Este patrón es comparable al descrito en alergia ocupacional con respecto a los agentes de bajo peso molecular. Esta peculiaridad podría estar determinada por la naturaleza de los alérgenos del ciprés: carbohidratos de bajo peso molecular; mientras que en la polisensibilización la exposición temprana en la vida es determinante para la

sensibilización, especialmente en los casos de alergia severa (Charpin, 2005; (Gouitaa et al. 2005).

2.8 Cereales y alergia al trigo

Las gramíneas son plantas de crecimiento global. La familia Poaceae incluye más de 600 géneros y más de 11 mil especies reconocidas. Más del 95% de las gramíneas de importancia en alergia pertenecen a alguna de las subfamilias: Pooideae, Chloridoideae y Panicoideae. Podemos dividir las gramíneas espontáneas, que son las que crecen en las orillas de los caminos y las gramíneas cultivadas o cereales, como el trigo, cebada y centeno (Tatham & Shewry 2008; Gadermaier et al. 2013).

Los alérgenos de los pólenes de gramíneas se agrupan de acuerdo con su estructura proteica y función. Se han descrito 10 grupos de alérgenos mayores y menores (tabla 1). Debido a su abundancia y potencia, los alérgenos de gramíneas de los grupos uno y 5 de los alérgenos de la familia Pooideae se consideran inmunodominantes mientras que los alérgenos del grupo 5 son exclusivos de la familia Pooideae. Los alérgenos del grupo 1 están presentes en otras familias de gramíneas. En contraste, las profilinas (grupo 12) y polcalcina (grupo 7) contribuyen a la reactividad cruzada entre gramíneas, árboles y polen de malezas presentes en el 10 a 15% de los pacientes sensibilizados a gramíneas (Ferreira y cols., 2014).

Tabla 1. Alérgenos del grupo de polenes de gramíneas

Grupo alergen	Función bioquímica	Peso Moleculo (kDa)	Miembro en Phelum pratense	Características	Reactividad con IgE
1	β - expansina	27-35	Phl p1	Glicoproteína, alergen principal. Producido por todas las especies de gramíneas	>90% 85 a 99%

2	Desconocida	11	Phl p2	Altamente homologo al grupo 3 y a la proci3n C-terminal del grupo 1	35 a 50% 40 a 60%
3	Desconocida	11-14	Phl p3	Altamente homologo al grupo 2 y a la porci3n c-terminal del grupo 1	35 a 70% 57 a 67%
4	Oxidoreducta sa	50-60	Phl p4	Glicoprote3na, miembro de la familia de enzimas puente berberina	50 a 75% 45 a 88%
5	Desconocida	27-35	Phl p5	Se encuentra en las especies <i>Pooideae</i> asociado con particulas submicromicas citopl3smicas de almid3n	65 a 85% 50 a 88%
6	Desconocida	12-13	Phl p6	Hom3logo de secuencias internas del grupo 5 s3lo en <i>Anthoxantum odoratum</i> , <i>Phleum pratense</i> y <i>Poa pratensis</i>	60 a 70% 45 a 70%
7	Polcalcina, prote3na	8-12	Phl p7	Panalergeno, montaje de d3meros en polen de gram3neas	5 a 35% 2 a 12%

fijadora de
calcio

11	Proteína relacionada con Ole e-1	16-20	Phl p11	Glicoproteína, estructura similar a la de los alergenos del polen del olivo (Ole e1) y lamb's quarter (Che a1)	18 a 56%
12	Profilina	13-14	Phl p12	Panalergeno, altamente conservado, reactividad cruzada entre polenes y plantas alimenticias	10 a 40% 9 a 32%
13	Poligalacturo-nasa	45-60	Phl p13	Glicoproteína, susceptible a la degradación de proteasas	30 a 40% 36 a 56%

La introducción de cereales en la alimentación ocurrió hace aproximadamente 10000 años, con el advenimiento de la agricultura. El trigo, arroz y maíz son los cereales de más alto consumo alrededor del mundo. El trigo, el cultivo que más se cosecha. En los países occidentales, es un alimento básico en la dieta de todos los días. Es inmensamente diverso, con más de 25 mil variedades modificadas aunque las especies mas utilizadas para el consumo son el trigo blando (*Triticum aestevium*), que se utiliza para productos de panadería, y el trigo duro (*T. durum*), que se utiliza para la pasta, cuscús y algunos tipos de pan (Pastorello et al. 2007; Sapone et al. 2012). Esto representó un cambio evolutivo que creó las condiciones para la aparición de enfermedades en los humanos debidas a la exposición al gluten, las más conocidas de las cuales están mediadas por el sistema inmune adaptativo: la alergia alimentaria y la

enfermedad celiaca. En ambas enfermedades, la reacción al gluten está mediada por la activación de células T en la mucosa del tracto digestivo. Sin embargo, en la alergia al trigo, el desencadenante es la unión entrecruzada entre IgE y secuencias repetidas en péptidos del gluten (por ejemplo: serina-glutamina-glutamina-glutamina-(glutamina)prolina-prolina-fenilalanina) la que dispara la liberación de mediadores químicos como la histamina de los basófilos y células cebadas. En contraste, la enfermedad celiaca es una enfermedad autoinmune en la que se ha demostrado autoanticuerpos séricos específicos, principalmente antitransglutaminasa tisular y anticuerpos antiendomiso. Entre la enfermedad celiaca y la alergia al gluten existen casos de reacciones al gluten en las que no se han podido demostrar mecanismos alérgicos o autoinmunes, los que se definen como sensibilidad al gluten. La prevalencia de la alergia alimentaria debida al trigo tiene una distribución mundial. Su prevalencia se ha reportado, en Europa y Estados Unidos, entre 0.2-0.9% (Sapone et al. 2012; Tatham & Shewry 2008).

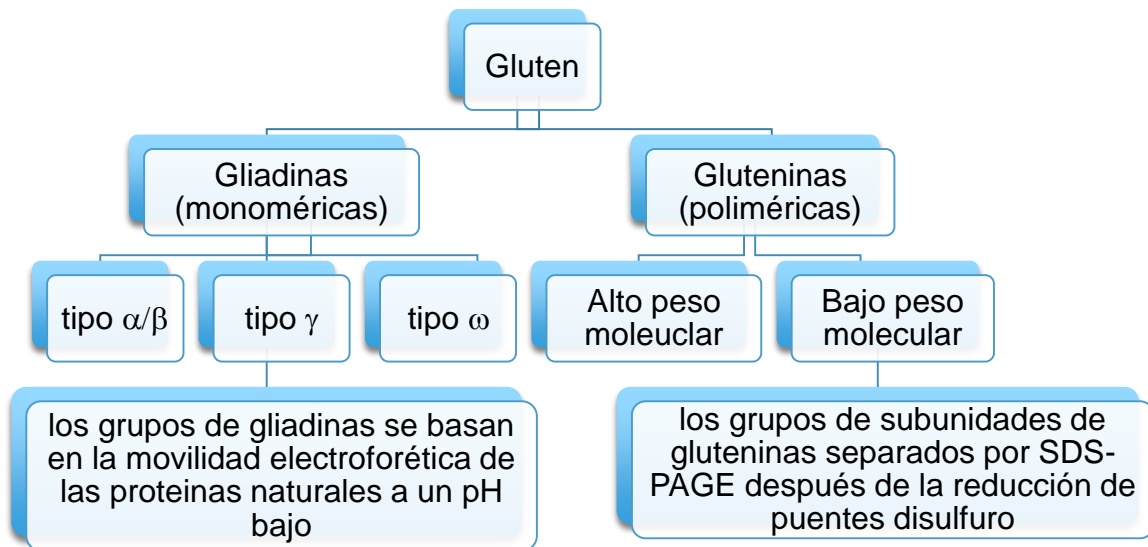
Basados en su solubilidad, las proteínas del trigo se clasifican como albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), gliadinas (solubles en 70-90% de etanol, lo que comprende el 34% del total de proteínas del trigo), y gluteninas (insolubles bajo todas las condiciones previamente mencionadas y corresponden al 47% del total de proteínas de trigo). La gliadina (40kDa) esta formada por una cadena de péptidos de cuatro diferentes fracciones que contienen uniones disulfuro. Estas juegan un papel en la formación de película, resistencia y elasticidad. La glutenina, una mezcla de proteínas, tiene un peso molecular entre 100 y 1000 kDa. Los puentes disulfuro presentes en la glutenina y en la gliadina ayudan en la determinación de la resistencia de la matriz de proteínas (Sapone et al. 2012; Salcedo & Quirce 2011).

Los cereales contienen numerosas proteínas con poder alergénico. El trigo contiene varias proteínas de unión a IgE, que están representadas en las tres fracciones proteicas de Osborne (albúmina / globulinas, gliadinas y gluteninas), que mantienen su alergenicidad después de la cocción, es decir, en la forma en la que trigo se consume (figura 1) (Pastorello et al. 2007).

En la actualidad, se conocen dos grupos principales de alergenos en el trigo: el primer grupo está representado por la fracción de albúmina / globulina,

en el que los alérgenos más importantes son el inhibidor de las subunidades de α -amilasa/tripsina, responsables de asma del panadero y también de la alergia a los alimentos de trigo, como se ha demostrado por James et al. en niños con dermatitis atópica, y por Simonato et al. y Armentia et al. en los adultos. (Pastorello et al. 2007; Sapone et al. 2012). El segundo grupo de alérgenos de trigo está representado por la fracción de gluten, principal complejo protéico de los cereales. Está constituido por dos fracciones, las gliadinas y las gluteninas. La fracción gliadina está constituida por proteínas monoméricas clasificadas en $\alpha, \beta, \gamma, \omega$ – gliadinas, generalmente conocidas como responsables de la enfermedad celíaca. Varios estudios han demostrado que este grupo de proteínas también está involucrado en las reacciones mediadas por IgE a la ingesta de trigo, especialmente en niños con dermatitis atópica y en anafilaxia inducida por el ejercicio de dependiente de trigo (AIEDT) a través de epitopes diferentes a los implicados en la enfermedad celíaca capaces de reaccionar con células B. (Pastorello et al. n.d.; Salcedo & Quirce 2011; Sapone et al. 2012)

Figura 1. Clasificación de las proteínas del gluten de trigo. Adaptado de Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. Clin Exp Allergy 2008; 38(11): 1712-26.



Hasta ahora, poco se sabe sobre el potencial alergénico de gluteninas, que son proteínas poliméricas compuestas de subunidades de alto y bajo peso molecular unidas por puentes disulfuro. Una subunidad de glutenina de 42 kDa de peso molecular ha sido descrita como un alérgeno importante en pacientes

con síntomas gastrointestinales después de la ingestión de trigo; y en AIED. El papel de otros alérgenos de cereales tales como las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) recientemente identificados como alérgenos resistentes al calor pertinentes en el maíz y la cebada, aún se desconoce en el trigo (Pastorello et al. 2007).

2.9 Sensibilización y Respuesta alérgica

Se considera un pre-requisito para el desarrollo de respuestas de hipersensibilidad tipo I, a la formación de respuestas Th2, las cuales llevan a la producción de IgE y al acoplamiento de IgE específica sobre células cebadas y basófilos. En una primera exposición, los linfocitos con fenotipo Th2 (linfocitos T cooperadores capaces de producir IL4, IL5, IL10 e IL13) cambian la producción de IgM a IgE en individuos con predisposición genética. Ésta IgE producida como respuesta a un antígeno específico se fija a su receptor de alta afinidad en la superficie de las células cebadas. A esta primer respuesta inmunológica se le conoce como sensibilización alérgica (Kay, 1999), (Jenkins et al. 2005).

En la respuesta alérgica, los ligandos lipídicos y conjugados glicanos de las proteínas interactúan con los receptores tipo Toll, receptores de lectina tipo C y receptores tipo NOD, así como receptores activados por proteasas (presentes en las células epiteliales y dendríticas) o con proteínas surfactantes (presentes en forma soluble) para manifestar su alergenicidad, desviando la respuesta inmune hacia una respuesta de linfocitos con fenotipo Th2; pero en otros casos, es la actividad enzimática, específicamente como proteasas, las que pueden iniciar respuesta inflamatoria vía activación Th2. (Radauer et al. 2014; Chapman et al. 2007; Radauer & Breiteneder 2007; Sánchez-Zauco et al. 2010)

Contactos posteriores con el alérgeno, llevan a la degranulación de células cebadas y liberación de mediadores proinflamatorios, citocinas y quimiocinas en el tejido. Horas después se observa la llegada de eosinófilos y otras células pro-inflamatorias que son las responsables de la respuesta inflamatoria tardía vista en la hipersensibilidad tipo I. (Larenas-Linemann et al. 2008; Traidl-Hoffmann et al. 2009) Las funciones finas, de las células T, sólo se logran por la interacción orquestada entre receptores de células T (TCR), moléculas coestimuladoras, y citocinas además de factores adyuvantes presentes en el microambiente. Es importante mencionar que estas propiedades de desviar la respuesta inmune hacia una respuesta Th2, puede hacer que otras

proteínas sin estas características, se transformen en alérgenos en una exposición simultánea. (Traidl-Hoffmann et al. 2009) (Radauer et al. 2014; Chapman et al. 2007; Radauer & Breiteneder 2007; Sánchez-Zauco et al. 2010)

Desde una perspectiva clínica es crucial identificar los factores de riesgo en el individuo. Las enfermedades previas o comorbilidades son importantes en este sentido, y son esenciales para estudiar las condiciones en que se da la sensibilización primaria a un alérgeno para el desarrollo de una alergia clínica. El aparente aumento de la prevalencia de la alergia alimentaria en las últimas décadas también pide estudios de regulación epigenética en la fase de sensibilización, un campo no estudiado en detalle hasta ahora, por lo que quedan por resolver desafíos para la predicción de la sensibilización de proteínas que incluyen (a) las vías de exposición; (b) la frecuencia y la dosis de exposición; (c) las relaciones dosis-respuesta; (d) la función de la digestión, procesamiento de alimentos, y la matriz alimentaria; (e) el papel de la infección; (f) el papel de la microbiota intestinal; (g) la influencia de la estructura y propiedades fisicoquímicas de la proteína; y (h) el fondo genética y la fisiología de los consumidores (Poulsen et al. 2014).

El almidón es el principal polisacárido de reserva de la mayoría de los vegetales, y la fuente de calorías más importante consumida por el ser humano. Está constituido por dos compuestos de diferente estructura: amilosa y amilopectina. Los almidones de los cereales contienen pequeñas cantidades de grasas. Los lípidos asociados al almidón son, generalmente, lípidos polares, que necesitan disolventes polares tales como metanol-agua, para su extracción. Algunas proteínas asociadas con gránulos de almidón de trigo resultaron ser alergénicas, incluyendo proteínas de almidón sintetasa y puroindolinas, que tienen un papel en la determinación del grano suave. Estas proteínas del gránulo de almidón representan alrededor del 0,2% de almidón de trigo y, potencialmente, podrían ser responsables de la alergenicidad residual de este derivado de trigo. Las puroindolinas son rica en cisteína, proteínas que, al igual LTP, se unen fuertemente a los lípidos polares de membranas celulares de lípidos, por lo tanto participan en defensa de las plantas frente a patógenos. El papel de los nuevos alérgenos que encontramos en la fracción de glutenina merece mayor esclarecimiento en vivo (Pastorello et al. 2007).

Dependiendo de la ruta de exposición al alérgeno y de los mecanismos inmunológicos involucrados, la alergia al trigo se ha clasificado en una reacción de alergia alimentaria clásica, con manifestaciones en la piel (urticaria por contacto), el tracto gastrointestinal y/o respiratorio; anafilaxia inducida por ejercicio; asma ocupacional y rinitis. Gran parte de las investigaciones sobre las reacciones alérgicas al trigo se han centrado en la alergia respiratoria conocida como asma del panadero, la cual es una de las enfermedades alérgicas ocupacionales con mayor prevalencia a nivel mundial. La alergia alimentaria al trigo, en su forma extrema (anafilaxia) es capaz de causar la muerte, pero probablemente no sea tan frecuente en la población general (Sapone et al. 2012). Las respuestas de hipersensibilidad al trigo mediada por IgE, son más frecuentes en niños, mientras que las formas de anafilaxia inducida por el ejercicio son más frecuentes en adolescentes y adultos (Sapone et al. 2012; Morita et al. 2012; Pastorello et al. 2007).

En la celiacía hay una afección causada por una reacción a determinadas proteínas, llamadas prolaminas. El trigo, la cebada y el centeno son especies de gramíneas estrechamente relacionadas pertenecientes a la familia Triticeae. En la composición de sus semillas intervienen diferentes clases de proteínas: las solubles (albúminas, en agua; globulinas, en sal; gliadinas, en alcohol y agua) y las insolubles (gluteninas, que son conocidas como prolaminas). Las proteínas solubles constituyen el 25% de las proteínas de las semillas y numerosos estudios han confirmado su importancia en las repuestas mediadas por IgE, tanto por su papel en la dermatitis atópica como en la sensibilización inhalatoria (Sapone et al. 2012; Salcedo & Quirce 2011).

Se ha considerado que las globulinas y gluteínas (aglutinina de las semillas), peroxidasas y proteínas transportadoras de lípidos son los antígenos responsables de la hipersensibilidad inmediata frente a los cereales ingeridos, mientras que en el asma producida por inhalación de harina (enfermedad del panadero) las albúminas serían los alérgenos más importantes. Es de interés que tanto la peroxidasa como LTPs pueden asociarse con asma del panadero. La respuesta alérgica por ingestión de trigo puede dividirse en dos tipos. La anafilaxia inducida por ejercicio es un síndrome bien definido causado por un tipo específico de proteína: omega5-gliadina. Otras respuestas alérgicas incluyen

dermatitis atópica, urticaria y anafilaxia y podrían estar relacionadas con otro grupo de proteínas del trigo. Estas pueden variar entre poblaciones y estar relacionadas con la edad y el tipo de síntomas. Estudios con proteínas purificadas mediante ensayos de unión a IgE específica con sueros de pacientes, mostraron que el 60% tenían anticuerpos IgE específicos para α -gliadina, β -gliadina y subunidades de bajo peso molecular, 55% a γ -gliadina, 48% a ω -gliadinas y 26% a subunidades de alto peso molecular (Pastorello et al. 2007; Pastorello et al. 2011; Tatham & Shewry 2008).

2.10 Alérgeno y Respuesta Alérgica

Se define como antígeno a la molécula que es capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos (Abbas et al. 2012a).

El término alérgeno es un término más amplio que antígeno. Un requisito absoluto para que una molécula sea reconocida como alérgeno es que ésta sea capaz de unirse a anticuerpos de tipo Inmunoglobulina E (IgE) específicos. Las moléculas que son capaces de instruir al sistema inmune para producir anticuerpos IgE específicos son llamados sensibilizadores primarios. (Delves, 2006; van Ree, 2014)

Para que una molécula se transforme en un sensibilizador primario deben tenerse en cuenta las propiedades potenciales alergénicas endógenas de una molécula, la respuesta inmune del sujeto susceptible, y factores asociados.
Propiedades endógenas:

Un anticuerpo reconoce fragmentos de la molécula del antígeno, llamados epítopes, éstos pueden ser de orden geométrico (tridimensional) o estructural. Están conformados predominantemente por péptidos o fragmentos de carbohidratos, con un tamaño mayor de 10 kDa (Puc 2003). Cuando son de tamaño menor, se conocen como haptenos; que se definen como moléculas menores a los 10 kDa, que sólo unidas a una proteína transportadora serán capaces de generar activación inmunológica (alérgenos incompletos). Cuando los péptidos que forman el epítope son secuenciales, el epítope se denomina continuo, cuando es resultado del arreglo conformacional de péptidos se conoce como discontinuo (Delves, 2006). Un hallazgo importante es la restricción

relativa de los alérgenos alimentarios a un pequeño número de familias de proteínas. Algunas propiedades de las proteínas incluyendo estudios de otras capacidades biológicas de los alérgenos, como la actividad enzimática, tipos específicos de glicosilación y la facultad de unirse a lípidos podrían ser determinantes en la alergenidad vía su interacción con el sistema inmune innato. (Chapman et al. 2007; Radauer & Breiteneder 2007; Radauer et al. 2014; Poulsen et al. 2014)

Sistema inmune innato:

El sistema inmune innato censa, responde y modula la respuesta a antígenos por medio de receptores que están codificados en la línea germinal, entre ellos los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), tipo NOD (dominios de oligomerización de nucleótidos NLR) y receptores de lectina tipo C. (Sánchez-Zauco et al. 2010)

En el nivel mecanicista, un factor importante para la formación de una respuesta alérgica, es el sistema inmune, donde los leucocitos pueden ser modulados por escisión enzimática de los receptores, tales como CD23 o CD25, o por la activación de receptores inmunes innatos tales como los receptores Toll-like, por lípidos o hidratos de carbono (Poulsen et al. 2014)

Los TLR son una familia de moléculas de superficie y citoplasmáticas que participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP). Originalmente se describió a la proteína Toll como la responsable de la polaridad dorsoventral en el embrión de *Drosophila* y en la mosca adulta, participando en la protección de infecciones fúngicas. Los TLR son receptores transmembranales tipo I; tienen un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (LRR), de 24 a 29 aminoácidos; tienen una o dos regiones ricas en cisteína, además de un dominio intracelular de aproximadamente 200 aminoácidos por medio del cual se lleva a cabo la transducción de señales. En mamíferos se han descrito 13 receptores homólogos a Toll (TLR). Algunos de los más importantes son: TLR2 que reconoce peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicoico (LTA) y lipoproteínas de bacterias Gram positivas, así como “zimosan” de levaduras. TLR3 reconoce RNA de doble cadena (dsRNA). TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas,

proteínas de choque térmico (HSP) de 60 y 70 kDa, entre otros. TLR5 reconoce flagelina bacteriana y TLR9 participa en el reconocimiento de islas de CpGs, de DNA no metilado. TLR1, TLR6 y TLR10 pueden formar heterodímeros con TLR2 aumentando la especificidad por sus ligandos. Los TLR representan un puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo ya que la activación del sistema inmune innato induce la fagocitosis, la opsonización y la producción de mediadores de la inflamación, bloqueando la diseminación del patógeno (Sánchez-Zauco et al. 2010).

Los receptores NOD son una familia de al menos 20 miembros que se expresa en el citosol. Sólo reconocen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos). Su función es reconocer componentes como peptidoglicanos, pero también señales de daño celular (especialmente Nod-3). Nod-1 y Nod-2 inducen la expresión y la secreción de citocinas proinflamatorias. (Sánchez-Zauco et al. 2010)

Los TLR y NLR que están expresados en las células presentadoras de antígeno (CPA), tras reconocer a sus ligandos, se activan e inducen moléculas que participan en la presentación de péptidos antigénicos sobre su superficie. En el complejo principal de histocompatibilidad (CMH) los péptidos son reconocidos por las células T antígeno específicas, uniéndose así la respuesta inmune innata y la adaptativa. (Sánchez-Zauco et al. 2010)

Otros:

Las propiedades potenciales alergénicas endógenas de una proteína no pueden ser vistas de forma aislada; la forma en que un alimento se procesa puede alterar su interacción tanto con los procesos digestivos y el sistema inmune con la microbiota intestinal como un factor de intercalación. A factores como la resistencia al calor y a la digestión proteolítica deben sumarse factores como el inicio de la exposición, el tiempo de la misma, la dosis y la presencia de cofactores que pueden tener efectos protectores o favorecedores de la alergia. También la integridad de la mucosa puede estar en juego, ya que se ha demostrado que algunos alérgenos tienen actividad enzimática para interferir con las uniones estrechas, activar receptores por proteasas e iniciar una reacción inflamatoria haciendo el epitelio más susceptible a la captación de alérgenos (Abbas et al. 2012a; Pomés 2008; Demoly et al. 2014; Poulsen et al. 2014).

2.11 El papel de las proteínas como alérgenos

Los alérgenos que provocan alergias tipo I o primarias (pacientes con sensibilización específica al alérgeno) son principalmente proteínas o glicoproteínas (Jenkins et al. 2005; Asero et al. 2009).

Un gran número de alérgenos tiene funciones biológicas intrínsecas. Entre los alérgenos que figuran actualmente en las bases de datos de dominio público (como: Allergome o la Base de datos de estructuras de proteínas alérgicas), más de 80 diferentes alérgenos aparecen como proteasas, sin embargo para muchos otros alérgenos, apenas se comienza a entender como su función biológica puede influir en su alergenicidad. Se han reportado liasas de pectina, inhibidores de tripsina, proteínas de unión a calcio, proteínas transportadoras de lípidos, proteínas de unión a actina y otras. Algunas de estas actividades biológicas pueden contribuir a su alergenicidad al modificar el microambiente en el que se encuentra el alérgeno, algunos pueden incrementar la distribución tisular del alérgeno a través de la digestión de la matriz extracelular (por ejemplo hialuronidasa), degradación de las moléculas de adhesión (ejemplo: alérgeno principal del ácaro del polvo Der p1 o el alérgeno de la penicilina (Pen ch13) o por efectos tóxicos directos (ejemplo: melitina y fosfolipasa) en las células del microambiente. Otros, como el alérgeno principal del abedul Bet v1, actúan como proteínas de unión a membrana al unirse a los fosfolípidos de la membrana, lo cual podría ayudarles a cruzar la barrera mucosa y facilitarles el acceso a las células presentadoras de antígeno (Traidl-Hoffmann et al. 2009; Pomés 2008).

A pesar de la evidencia del papel de las proteasas en la alergenicidad, muchos otros alérgenos, como Fel d1 (alérgeno principal del gato), Der p2 y Der p5 (alérgenos menores de un tipo de ácaro del polvo) no tiene actividad de proteasas, y algunos de ellos funcionan como inhibidores de proteasas de cisteína (Fel d3). Está pendiente por descubrir la actividad relevante de éstos alérgenos, aunque pareciera que la alergenicidad de éstas proteínas es independiente de su función biológica. Es decir, las funciones intrínsecas específicas pueden contribuir a la alergenicidad de ciertas proteínas, pero no son un prerrequisito obligatorio para un alérgeno. Además, hasta ahora, ninguna función biológica ha sido identificada como un discriminador confiable de las

proteínas alergénicas (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009; Ivanciuc, Garcia, et al. 2009; Powe et al. 2013).

Se le ha dado poca atención al contexto natural bajo el cual estos alérgenos se encuentran con el organismo. Excepto por las pruebas en entornos clínicos, los individuos jamás se exponen a alérgenos de forma aislada, sino que generalmente se exponen a alérgenos junto con moléculas acarreadoras. De forma general, los transportadores de alérgenos, representan paquetes de señales de peligro que pueden influir sobre los resultados de la respuesta inmune en diferentes formas. Las fuentes más importantes de alérgenos son dispersadas por el viento: granos de polen de los árboles, esporas de hongos, caspa de animales y veneno de insectos. Esto implica que otros factores son liberados del acarreador o de ambos (alérgeno y acarreador) durante la presentación antigénica. Por ejemplo, existen moléculas microbianas que son ubicuas en el medio ambiente y en el polvo. En consecuencia, los individuos están expuestos a los alérgenos junto con estas moléculas microbianas que activan directamente a los receptores expresados en los componentes celulares del sistema inmune innato. En la misma línea, los granos de polen no sólo liberan alérgenos sino también mediadores lipídicos asociados al polen (PALMs), moléculas bioactivas no alergénicas, que tienen efectos proinflamatorios e inmunomoduladores en las células que participan en la respuesta inmune alérgica. Los PALMs proinflamatorios (por ejemplo oxilipina) atraen y activan a los eosinófilos y neutrófilos independientemente del estado de sensibilización del sujeto, sugiriendo que actúan primero como un adjuvante que puede aumentar el proceso inflamatorio, como en la fase de provocación de la respuesta alérgica. Los PALMs inmunomoduladores, como los fitoprostanos E1, inhiben la producción de IL12 de las células dendríticas y citocinas tipo Th1 e incrementan la capacidad de las células dendríticas para inducir la diferenciación y reclutamiento de los linfocitos Th2, lo cual indica que promueven una respuesta alérgica. Además, los pólenes liberan oxidasas que tienen efectos deletéreos en las células epiteliales del tracto respiratorio a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Poulsen et al. 2014).

La sensibilización puede ocurrir en el lugar de contacto con el alérgeno como en las vías aéreas y la piel, pero también puede ocurrir a través del tracto gastrointestinal. En términos generales, la exposición a bajas concentraciones

de alérgenos induce producción de IgE y alergia, mientras que la exposición a altas concentraciones de alérgeno induce tolerancia a través de la activación de linfocitos T reguladores. Una respuesta Th2 modificada con la producción de altos títulos de anticuerpos IgG subclase 4 específicos para el alérgeno, o ambas podría terminar bloqueando la unión de los complejos inmunes alérgeno-IgE específica a la célula efectora. La exposición a alérgenos de exteriores, como el alérgeno principal del polen del abedul, Bet v1, durante la época de polinización puede calcularse, basada en el vuelo del polen y los datos de liberación del alérgeno obtenidos in vitro, en el orden de 0.03 a 1 ng/d. (Traidl-Hoffmann et al. 2009). Sin embargo, no todas las personas expuestas llegarán a estar sensibilizadas y presentar alergia. Existe una alta variabilidad en la respuesta individual a un alérgeno (Traidl-Hoffmann et al. 2009), además los contaminantes ambientales constituyen factores contribuyentes para facilitar el desarrollo de las alergias de tipo I por diferentes mecanismos. Las partículas contaminantes más estudiadas son las partículas de escape de diesel (DEPs), las cuales pueden transformarse de un neoantígeno inocuo a un alérgeno capaz de inducir altos niveles de IgE alérgeno-específica. Se ha identificado susceptibilidad genética para el efecto adjuvante de DEPs (por ejemplo: glutatión S-transferasa) y se sugiere que el estrés oxidativo inducido por DEPs tiene un papel central en el proceso. Además, las partículas contaminantes pueden actuar directamente sobre las células presentadoras de antígeno locales y modular su función cambiando el fenotipo de superficie y perfil de citocinas (disminución en producción de IL12) resultando en un patrón proalérgico de activación del sistema inmune innato. Finalmente los contaminantes como dióxido de nitrógeno (NO₂) y ozono (O₃) en concentraciones atmosféricas importantes pueden conducir a la nitración de alérgenos ambientales como Bet v1 transformándolos en neoantígenos (Traidl-Hoffmann et al. 2009).

A pesar de que podemos describir características comunes de los alérgenos, la biología estructural no puede aportar elementos de discriminación confiables que permitan su identificación. La utilización de herramientas bioinformáticas disponibles para clasificar las proteínas en familias sobre la base de sus secuencias de aminoácidos compartidos y la posibilidad de evaluar su estructura tridimensional se encuentran disponibles en varias bases de datos de familias de proteínas, incluyendo Pfam. Un enfoque bioinformático estructural

combinado, contribuiría al proceso de evaluación del riesgo alergénico, en particular para proteínas para las que la sensibilización se produce con las proteínas plegadas nativas. La combinación de información estructural con análisis de conservación de la estructura primaria indica que la conservación de características de la superficie (en particular principales conformaciones de cadena que no pueden ser evaluados mediante el uso de las homologías de aminoácidos simples) ofrecería una base más sólida para evaluar el potencial de reactividad cruzada observada clínicamente en las proteínas obtenidas de diferentes fuentes. El análisis bioinformático (in silico) de alérgenos principales (alérgenos mayores) y las bases de datos de alérgenos han demostrado que la mayoría son relativamente pequeños (<70 kd), con carga negativa, con baja hidrofobicidad y alta estabilidad. Además, modificaciones post-traslacionales, como glicosilación o la presencia de uniones disulfuro, puede aumentar la estabilidad y biodisponibilidad de los alérgenos. El análisis de los patrones de conservación de residuos en 4 familias de alérgenos y sus homólogos no alergénicos mostró la presencia de regiones alérgeno-específicas con una alta proporción de residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie. El hecho de que un alérgeno induzca un cambio hacia el isotipo IgE monoclonal, oligoclonal o policlonal en respuesta a una estructura específica (que bien podría ser de reactividad cruzada con estructuras homólogas) indica fuertemente que los elementos estructurales relacionados con alérgenos específicos debe participar en el proceso. Sin embargo, cualquier tipo de análisis in silico tiene que ser considerado junto con otros factores. Tenemos que ampliar la imagen hacia factores que induzcan el proceso de cambio (Th2 e IgE) con una variedad de temas relacionados con el paciente (carga genética) y la función intrínseca del alérgeno sino también con una variedad de factores ambientales, tanto antropogénicos como biogénicos, que ocurren con la exposición al alérgeno, tales como la exposición al polen, los hábitos alimenticios, el efecto de la elaboración de alimentos, y la matriz, y los factores individuales, incluyendo antecedentes genéticos, que pueden predisponer a los individuos vuelvan alérgicos (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009; Ivanciuc, Garcia, et al. 2009; Powe et al. 2013).

A pesar de la cantidad y diversidad de las proteínas codificadas en el genoma de las plantas, el universo de los alérgenos de la planta es en realidad

bastante pequeña, con aproximadamente el 65% de los alérgenos alimentarios vegetales procedentes de sólo 4 familias de proteínas. También es evidente que la distribución de los alérgenos en familias Pfam no se limita a reflejar la abundancia relativa de las familias de genes en plantas. Las comparaciones de las estructuras en 3 dimensiones sugieren que la proteínas se pliegan y pueden predisponer a la aparición de nuevos alergenicos. Por lo tanto, para aquellas familias de alérgenos tales como las superfamilias de prolaminas en la que se cree que la sensibilización se produce a través del tracto gastrointestinal, las propiedades de estabilidad conferidos por el plegamiento puede potenciar la inmunogenicidad de proteínas, un factor para determinar su alergenicidad. La notable conservación de ambos residuos en la superficie y principales conformaciones de cadena en la familia Bet v 1 juega un papel importante en la conservación de los epítomos de unión a IgE y el fundamento de los síndromes de alergia de reactividad cruzada entre polen y frutas u hortalizas (Ivanciuc, Schein, et al. 2009).

2.12 Funciones intrínsecas de los alergenicos

Uno de los principales retos de la alergología molecular es identificar y evaluar las características de una molécula que confiere sus propiedades alergénicas cuando entra en contacto con un sistema inmunológico atópico. La investigación en alergenicos se ha centrado en identificar alergenicos simples y caracterizarlos en sus propiedades estructurales, funcionales y bioquímicas. (Jenkins et al. 2005; Asero et al. 2009; Poulsen et al. 2014)

De acuerdo con la definición conjunta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), una proteína se considera como un alérgeno cuando es capaz de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos al menos en 5 individuos (Traidl-Hoffmann et al. 2009).

Los nombres de los alérgenos son asignados por el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la IUIS basándose en el género/especie de la fuente y el orden en el que fueron identificados, así a los alérgenos se les da nombre empleando las 3 primeras letras en latín de su género, una letra de la especie y un número de acuerdo con la prioridad del descubrimiento y purificación del alérgeno; por ejemplo, Phl 1 corresponde al alérgeno principal del polen de gramíneas *Phleum pratense*. Este sistema de nomenclatura es

independiente de la naturaleza estructural y bioquímica de la molécula y los nombres no permiten la identificación de relaciones entre alérgenos. Actualmente, más de 1000 proteínas alergénicas han sido secuenciadas, y el número de alérgenos conocidos se incrementa de forma sostenida. El comité es responsable que, de la lista de alergenios aprobados, se forme una base de datos funcional por lo que la clasificación de alérgenos según su origen (de origen animal, de plantas alimenticias o de pólenes) ha cambiado para ubicarlos en unas pocas familias de proteínas lo que muestra que ciertas estructuras proteicas son más o menos alergénicas, en contraste con la idea de que todo antígeno puede ser alergénico (Traidl-Hoffmann et al. 2009; Ivanciuc, Schein, et al. 2009; Radauer et al. 2014; Abbas et al. 2012b).

En el caso de los alergenios alimentarios, los últimos 20 años han visto una explosión en la identificación y secuenciación de alergenios. Se han publicado las secuencias de más de 100 alergenios alimentarios diferentes, lo que corresponde al 70 a 80% de los alergenios alimentarios identificados y cuando se incluyen isoalergenios (alergenios de la misma especie con una identidad de secuencias mayor al 67%) el número de secuencias reportadas se eleva a más de 200 (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009).

2.13 Panalergenios

Dentro de los alergenios a pólenes, la clasificación habitual incluía su división en alérgenos mayores (más del 50% de los pacientes alérgicos están sensibilizados) y menores. Entre éstos últimos se encuentran algunos panalergenios que pueden suponer un importante factor de confusión diagnóstica (Luque Piñana 2011).

En general una molécula panalergenica es una molécula con una funcionalidad esencial cuya estructura bien parcial o totalmente, se ha mantenido prácticamente inalterada en el proceso evolutivo, Esto hace que se mantengan epitopes comunes en distintas especies y que exista un reconocimiento inmunológico por parte de moléculas IgE dirigidas inicialmente frente a una molécula distinta. Las diferencias estructurales hacen que la afinidad de esta IgE pueda variar entre las distintas moléculas y se cree que puede ser un factor fundamental en el paso del reconocimiento molecular a la implicación causal de la sintomatología alérgica.

Existen varias moléculas que se pueden considerar como panalergenos implicados en fenómenos de reactividad cruzada entre polenes, alimentos y latex, como son:

- Las proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas de defensa vegetal, entre las que se encuentran la proteína transportadora de lípidos (LTP), endoproteasas, peroxidases, defensinas, proteínas tipo taumantina.
- Determinantes de carbohidratos (CCDS): algunas proteínas están glicosiladas y existen pacientes alérgicos cuya IgE se une frente a estas estructuras.
- Proteínas reguladoras: como las profilinas y polcalcinas.

El descubrimiento de estos panalergenos constituyó por tanto un indicio sobre la posibilidad de que no hubiera tantas proteínas alergénicas diferentes como se pensaba, sino proteínas estructuralmente muy similares, con funciones equivalentes y que el número total de alérgenos con el que se puedan diagnosticar y tratar las sensibilizaciones alérgicas no sea tan elevado, lo cual, sin duda, tiene implicaciones sobre posibilidades terapéuticas futuras.

2.14 Proteínas relacionadas con la patogenicidad

Las proteínas asociadas con la patogenicidad (PRP) se expresan por las plantas en respuesta a condiciones de estrés, como infecciones, exposición a ciertos químicos, rupturas o condiciones ambientales. Sin embargo, en algunos tejidos de las plantas, las PRP se expresan de forma constitutiva, por ejemplo en los pólenes o frutas, tejidos más propensos a sufrir agresiones (por insectos u hongos) o expuestos a condiciones atmosféricas (radiaciones UV). Las PRP tienen muchos efectos en las plantas, entre otros, su actividad antimicrobiana y por lo tanto pueden considerarse como parte del sistema de defensa de las plantas. Analizando lo que se sabe de las secuencias de aminoácidos y funciones de los alérgenos alimentarios (clonados) es notable que muchas de estas moléculas pueden clasificarse como PRP. Muchas PRP son estables a pH bajos, y tienen resistencia a proteasas. De acuerdo con la secuencia característica y su actividad enzimática o biológica, las PRP pueden clasificarse en 14 grupos. Siete de estos catorce grupos contienen proteínas con propiedades alergénicas, seis grupos contienen alérgenos alimentarios.

1. Alérgenos alimentarios con homología a PRP tipo 2: beta1,3 glucanasas y proteínas monoméricas con un peso molecular de 25-35kDa. Estas enzimas inducidas por patógenos unen y degradan beta 1,3 glucanos, componentes de

hongos y paredes celulares de las plantas. Hev b2, un alérgeno de *Hevea brasiliensis* (látex), se ha identificado como b-1,3 glucanasa. Se han encontrado proteínas homólogas en plátano, donde la expresión de glucanasas esta relacionada a la madurez de las plantas. Hev b2 juega un papel en la hipersensibilidad al plátano asociado con la alergia al látex.

2. Alérgenos alimentarios con homología a PRP tipo 3: incluyen quitinasas básicas de clase I, moléculas con actividad antifúngica. Estas enzimas hidrolizan la quitina, componente del exoesqueleto de insectos y de la pared celular y de hongos. Se han identificado quitinasas clase I del aguacate, castañas y plátano como alérgenos alimentarios con reactividad cruzada.
3. Alérgenos alimentarios con homología a PRP tipo 4: las proteínas relacionadas a la patogenicidad tipo 4 son quitinasas semejantes a la papa. Se ha identificado una proteína de unión a IgE perteneciente a este grupo en el nabo y la baya del sauco.
4. Alérgenos alimentarios con homología a PRP tipo 5: también denominadas como proteínas semejantes a la taumantina (TLP, por sus siglas en inglés). La taumantina es una proteína que proporciona un sabor intensamente dulce que se encuentra en la planta *Thaumatococcus danielli*. Los TLPs tienen una actividad antifúngica. Los alérgenos alimentarios pertenecientes a esta familia comprenden a los alérgenos menores de la manzana Mal d2, de 31 kDa, al alérgeno principal de la cereza Pru av2 y a un alérgeno de 23 kDa del pimiento (paprika).
5. Alérgenos alimentarios con homología a PRP 10: El alérgeno de reactividad cruzada más importante es Bet v1, alérgeno principal del abedul, una proteína relacionada a la patogenicidad del grupo PR 10. Estas proteínas se producen en respuesta a agentes patógenos y condiciones de estrés, y se supone que están implicadas en el transporte de esteroides. Bet v 1 es un péptido de 159 aminoácidos y peso molecular (PM) de 17,4 kDa⁷. Presenta una alta homología (80-90 %) con los alérgenos mayores de avellano, aliso, castaño y carpe (árboles del orden Fagales. Consecuentemente, todos los alérgenos homólogos en alergia alimentaria por alimentos de origen vegetal pueden ser atribuibles al mismo grupo funcional. Un número considerable de alérgenos alimentarios relacionados con Bet v1 han sido clonados y caracterizados: Mal d1 (manzana) tiene 159 aminoácidos y PM de 17,7kDa. Presenta una alta homología con Bet

v 1: 65 % de identidad en la secuencia de aminoácidos y 56 % de identidad a nivel de ácidos nucleicos; Pru av1 (cereza), Pru ar1 (chabacano), Pru c1 (pera), Api g1 (apio), y Dau C1 (zanahoria). También se han identificado alérgenos homólogos en perejil y papa.

Este grupo de alérgenos homólogos de Bet v 1 están implicados en más del 90 % de los pacientes que presentan alergia a alimentos vegetales asociada con polinosis de abedul. La sensibilización primaria parece producirse por vía inhalatoria al exponerse al polen de abedul. La sensibilización a esta familia de alérgenos da lugar a una sintomatología que caracteriza el llamado Síndrome de Alergia Oral (SAO). En los países del Centro y norte de Europa la alergia al polen del abedul se asocia hasta en un 70% con alergia a rosáceas, principalmente manzana. En las regiones en que no hay abedules, como es el Centro de España, se detecta sensibilización a Bet v 1 en menos del 10 % de los alérgicos a frutas rosáceas. Su trascendencia clínica es hasta ahora desconocida. (Fernandez-Rivas 2009; Ebner et al. 2001; Bartra et al. 2009)

3. Alérgenos alimentarios con homología a PRP 14: también conocidas como proteínas transportadoras de lípidos (LTPs). Las LTPs son una familia de polipéptidos altamente conservados que presentan un PM de 8-10 kDa, y que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. su función biológica consiste en transferir fosfolípidos de los liposomas a las mitocondrias, Se sugiere que intervienen en el transporte de la cutina y monómeros de subserina. Están implicados en la formación de cutícula y se localizan fundamente en las cubiertas exteriores de los vegetales, lo que justifica la mayor alergenicidad de las pieles de las rosáceas, además tienen actividad antimicrobiana. El potencial alergénico de los LTPs está influenciado por varios factores: localización y estabilidad a la desnaturalización proteolítica y térmica. Son moléculas estables, consideradas verdaderos alérgenos mayores en la zona del mediterráneo, en contraste con la sensibilización a LTPs poco frecuente observada en los países del centro y del norte de Europa. Hasta ahora se han reportado como alérgenos, LTPs derivados de 63 fuentes botánicas diferentes, 46 de ellos presentes en partes comestibles de plantas, y todos ellos pertenecen a la subfamilia de proteínas LTP1. Se ha especulado que estas diferencias geográficas se deben a las diferencias en la exposición a pólenes y consumo de alimentos (Hauser, 2010). Teniendo en cuenta las características de esta familia de proteínas es fácil comprender que

se comporten como verdaderos alérgenos alimentarios, produciéndose la sensibilización por vía oral. Alérgenos del tipo LTPs con peso molecular bajo (8-10 kDa) se encuentran en la manzana (Mal d3), durazno (Pru p3), chabacano, ciruela, cereza y cebada. No está claro el papel que la exposición a determinados pólenes del área mediterránea, que contienen LTPs, pudiera tener en el desarrollo de alergia a alimentos vegetales. El alérgeno principal de parietaria (Par j 1) es una LTP, pero no se ha establecido hasta ahora un patrón claro de asociación de alergia a este polen con alimentos vegetales. Sin embargo, se ha observado que en pacientes alérgicos a durazno, que presentan IgE específica frente a su alérgeno mayor, Pru p 3 (una LTP), que la sensibilización al LTP del polen de artemisa amplía el patrón de sensibilizaciones a otros alimentos vegetales taxonómicamente no relacionados (castaña). Recientemente, se ha observado en España una clara asociación entre la alergia al polen de plátano y la alergia a alimentos de origen vegetal que estaría en relación con LTPs en pacientes del área mediterránea no expuestos al polen de abedul (Ebner et al. 2001; Fernández-Rivas 2003). El mejor caracterizado es el LTP del durazno (Pru p3) y en el diagnóstico de alergia, existe la tendencia de emplearlo para evaluar a todos los LTPs de origen vegetal, desafortunadamente algunas revisiones reportan evidencia de comportamiento inmunológico heterólogo (R Asero 2011; Giangrieco et al. 2012).

2.15 Profilinas

Las profilinas son proteínas globulares de pequeño tamaño, ubicuas de células eucariotas. Tienen una masa molecular de entre 12-19 kDa, organizada alrededor de 124-174 residuos de aminoácido en cuatro hélices alfa y siete hebras beta antiparalelas, dependiendo del organismo del cual proviene. Se pueden clasificar en dos grupos basados en su secuencia y propiedades bioquímicas. En el grupo I se encuentran las profilinas ubicuas que se expresan constitutivamente en todos los tejidos. En el grupo II se encuentran las profilinas específicas a un tejido, un ejemplo son las profilinas expresadas en células germinales de plantas y animales, las cuales se expresan sólo en el desarrollo celular y embrionario. Se ha descrito la participación de profilinas en diversos procesos biológicos, entre los cuales, el más estudiado es su intervención en el rearrreglo del citoesqueleto, regulando la polimerización-despolimerización de la

actina, que participa en la estructura y motilidad celular, muy importante en diversos procesos biológicos como son la división celular, la embriogénesis y la citocinesis. La función de las profilinas está dada por la interacción que tienen con diferentes ligandos y la isoforma que participa. Las interacciones más estudiadas son con G-actina, fosfatidilinositol (PIP2), la subunidad alfa de la cinasa p85 y proteínas ricas en secuencias repetidas de L-prolina (Landa-Pineda et al. 2013; Radauer & Breiteneder 2007).

Descrita por primera vez por Carlsson y cols en 1976, como proteínas formadoras de complejo “profilamentosos”, de ahí debe su nombre profilina (PRO-FILamentous actIN). A pesar de su descubrimiento en células eucariontes y su función importante, principalmente en el dinamismo de la actina, se ha reportado profilinas provenientes de virus y se propone que su función es similar a la reportada en los vertebrados sugiriéndose que los virus pueden utilizar esta proteína como ligando del fosfatidilinositol (PIP2) para tener contacto con las células de mamíferos.

a) Familia de genes y expresión de las profilinas

El número de genes por organismo que codifican para profilinas correlaciona ampliamente con su complejidad. Los eucariontes inferiores contienen uno o dos genes y ocasionalmente tres, mientras que, en eucariontes superiores, como las plantas, el número de genes que codifican para profilinas es amplio, además pueden ser generadas nuevas variantes de ARNm por splicing alternativo. Las secuencias de ADN genómico que codifican para estos polipéptidos están formadas por tres exones y dos intrones de diversos tamaños.

En algunos mamíferos, como el hombre, se han descrito solo cuatro genes que codifican para profilinas, dándoles el nombre de Pfn1 al Pfn4. El gen Pfn1 codifica para la isoforma I la cual es ubicua. El gen Pfn2 produce, por splicing alternativo dos variantes, la profilina II es expresada principalmente en células neuronales y una forma menor, profilina IIb, expresada principalmente en riñón. Los genes Pfn3 y Pfn4 codifican para variantes que son tejido-específicas localizadas en testículo y riñón. La expresión de estas proteínas específicas de espermatozoides regula el desarrollo de la célula y del tejido, lo cual se puede correlacionar con la expresión también específica de proteínas relacionadas con la actina (T-actina 1 y T-actina 2) presentes en células germinales masculinas y

de igual manera se ha visto su participación en la reacción acrisola del espermatozoide de equinodermo.

Las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas contienen aproximadamente diez diferentes genes, entre ellos algunos pseudogenes no codificantes, mientras que las secuencias de ADN codificantes permiten la producción de estos polipéptidos y algunas isoformas del mismo. De acuerdo a su secuencia y propiedades bioquímicas se pueden clasificar en dos grupos. En el grupo I se encuentran las profilinas ubicuas que se expresan constitutivamente en todos los tejidos y en el grupo II se encuentran las profilinas tejido-específicas. Un ejemplo son las expresadas en células germinales de plantas y animales, estando presentes exclusivamente durante el desarrollo celular y embrionario.

Su papel alergénico fue descrito por primera vez por Valenta en 1991, consecuencia de sus investigaciones en el polen de abedul. Rápidamente se observó su presencia en otros polenes de plantas taxonómicamente distintas y en alimentos de origen vegetal, demostrándose su responsabilidad en fenómenos de reactividad cruzada y acuñándose así por primera vez el término de panalergeno para esta molécula, término para el que posteriormente se han incluido otras proteínas como tropomiosinas, proteínas de transferencia de lípidos y, proteínas de defensa (Luque Piñana 2011)(Radauer & Breiteneder 2007; Luque Piñana 2011; Landa-Pineda et al. 2013).

La profilina de abedul –Bet v 2– fue la primera identificada, clonada y secuenciada, y presenta un PM de 14 kDa. En la actualidad se dispone comercialmente de profilina de abedul recombinante (rBet v2) para determinación de IgE específica in vitro (CAP-FEIA, Pharmacia). También se han identificado profilinas de pólenes de gramíneas y de artemisa, y se ha demostrado su presencia en una gran variedad de alimentos de origen vegetal. La profilina como alérgeno se ha constatado su presencia en polenes de *Phleum pratense* (*Phleum p12*), *Cynodon dactylon* (*Cyn d2*), *Artemisia vulgaris* (*Art v4*), *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Parietaria judaica* (*Pae j3*), *Chenopodium album* (*Chen a2*), *Ambrosia elantior*, *Olea europaea* (*Bet v2*), *Corylus avellana* (*Cor a2*), *Alnus glutinosa*, *Castanea sativa*, *Palmera* (*Pho d2*) *Mercurialis annua* (*Mera1*). Y además se ha documentado su presencia en alimentos de origen vegetal como manzana (*Mal d4*), durazno (*Pru p4*), melón (*Cuc m2*), sandía, plátano (*Mus xp1*), apio (*api g4*), zanahoria (*Dau c4*), avellana (*Cor a2*),

cacahuete (Ara h5), cereza (Prup av4), pera (Pyr c4), piña (Ana c1), tomate (Lyc e1), soya (gly m3), pimienta (Cap a2) también látex (Heb b8).

Se ha demostrado la implicación de la profilina en la alergia a apio (Api g 2) en pacientes alérgicos a pólenes de abedul y artemisa; en la alergia a avellana, manzana (Mal d 2) y otras rosáceas, apio y zanahoria en pacientes alérgicos al polen de abedul; y en la alergia a rosáceas y otras frutas en pacientes españoles alérgicos a pólenes de gramíneas y/u olivo. En la alergia a alimentos vegetales en pacientes alérgicos al polen de abedul la profilina se comporta como un alérgeno menor. Su trascendencia clínica no está aclarada. Se sabe que amplía el espectro de sensibilizaciones detectadas mediante pruebas cutáneas y/o test in vitro, pero no está claro que se correlacione con la expresión clínica de la alergia a alimentos. Por el contrario, en la alergia a rosáceas asociada a polinosis (en su mayoría por polen de gramíneas) en pacientes de la zona Centro de España la profilina es un alérgeno importante. Estas personas también están sensibilizadas a LTPs, que son los alérgenos principales de estas frutas en esta población. La relevancia clínica de la profilina, que de nuevo se comporta como un "segundo alérgeno", no está elucidada. (Fernández-Rivas 2003)

Las profilinas de abedul, gramíneas y artemisa presentan una alta homología en sus secuencias (en torno a un 80 %), y tienen una antigenicidad y alergenicidad similares. Las profilinas forman parte de tejidos de almacenamiento (frutos, nueces, especias y látex) y, por tanto, son también responsables de la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos e, incluso, entre pólenes y látex. Al igual que otros panalergenos, las profilinas poseen secuencias muy conservadas, con identidades entre 70 y 85% (Bet v2 y Ole e2), y una prevalencia del 20% en la mayoría de los alérgicos al polen, aunque existen excepciones, como la profilina del polen del chenopodium (*Chenopodium album*) (Che a2), para la que se ha encontrado una prevalencia > del 50%, hasta el punto de ser considerada como alérgeno principal.

Hay trabajos que han permitido cuantificar la cantidad de profilina de diferentes especies vegetales mediante el uso de anticuerpos monoclonales profilina específicos, permitiendo medir cantidad de profilina en una determinada muestra, con un rango de entre 4 a 250 ng/ml (Luque Piñana 2011).

2.16 Profilina como alergeno

La primera identificación de la profilina como alergeno fue en el polen de abedul, *Betula verrucosa*, posteriormente algunos investigadores han centrado sus estudios en la búsqueda de profilinas alérgicas presentes en otros pólenes de importancia etiológica notable, como: *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Artemisia vulgaris*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Ambrosia elatior*, *Olea europea*, *Corylus avellana*, *Alnus glutinosa*, *Castanea sativa*, así como otros con menor capacidad sensibilizante o de más reciente descripción como: *Mercurialis annua*, *Crocus sativus*, *Zygophyllum fabago*, *Ricinus communis*, *Brassica napus*, entre otros. Identificándose a la fecha profilinas en una gran variedad de alimentos de origen vegetal incluyendo las frutas rosáceas, siendo reportadas hasta el momento más de 800 secuencias de profilina y sus isoformas de diferentes organismos (<http://www.uniprot.org>) de las cuales 170 son reportadas como alérgenos (<http://www.allergome.org>) y se ha resuelto la estructura tridimensional de más de 40 de ellas (<http://www.pdb.org>).

Las profilinas de abedul, gramíneas y Artemisa presentan alta homología en su secuencia de aminoácidos, cercana al 80% y tienen una antigenicidad y alergenidad similares.

En el norte y el centro de Europa se ha reportado que la profilina está dentro de los cuatro principales alérgenos con importancia, debido a que los pacientes alérgicos a rosáceas presentan reacción cruzada por polinosis con abedul y/o gramíneas, dando reconocimiento de IgE's a la profilina en un poco menos del 20% de los casos.

Como se ha descrito las profilinas son importantes alérgenos provenientes del polen de árboles, maleza, hierba y algunos alimentos. Otros estudios realizados por diferentes investigadores han descrito que la profilina proveniente del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), también conocida como Hev b8, es reconocida por las IgE's de pacientes que padecen espina bífida y en un 95% en personas alérgicas al látex que trabajan para el sector salud. En niños con espina bífida y adultos alérgicos al látex se reporta que la profilina es un alergeno relevante desde el punto de vista de frecuencia de reconocimiento in vivo para ambos grupos, pero es escasa la presencia en extractos de látex natural y posee baja afinidad de fijación de IgE (Landa-Pineda 2010; Landa-Pineda et al. 2013).

2.17 Reactividad cruzada

Dentro del Sistema inmunológico, una de las características principales de los anticuerpos es su gran especificidad. Sin embargo, se sabe que una determinada IgE puede reconocer antígenos diferentes, es decir, otros epítopes con características estructurales o secuenciales similares que pueden ocupar el mismo sitio de unión al anticuerpo, y que son reconocidos con menor afinidad, permitiendo la unión de complejos alérgeno-anticuerpo sobre la superficie de células cebadas y basófilos, y son capaces de inducir una respuesta inmunológica, lo que se denomina reactividad cruzada (Abbas et al. 2012b).

La base etiopatogénica de este hecho está en que el anticuerpo reconoce tan solo una secuencia corta de aminoácidos del antígeno, por lo que basta que dos proteínas se asemejen en unos cuantos aminoácidos para que pueda existir reactividad cruzada entre ellas (Luque Piñana 2011).

La reactividad cruzada de alérgenos ambientales y antígenos humanos basada en el mimetismo molecular juega un papel importante en la patogenia de algunas enfermedades aunque algunos estudios han mostrado que, las proteínas que conservan una homología estructural humana mayor del 62% rara vez son capaces de inducir una respuesta alérgica (Pomés 2008; Traidl-Hoffmann et al. 2009).

Un efecto interesante del fenómeno de reactividad cruzada es que la sensibilización primaria por inhalación de un alérgeno puede provocar la reacción alérgica posterior a otra fuente alérgica, cuya ruta de exposición sea distinta. Este es el caso de la reactividad cruzada entre aeroalergenos de pólenes y ciertos alérgenos de alimentos que provocan el síndrome de alergia oral (SAO). Una vez que el alérgeno es introducido a una célula presentadora de antígeno, éste es degradado a péptidos lineales pequeños, los cuales son presentados a los linfocitos T vía complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, así que, aquellas proteínas que, durante su procesamiento presenten secuencias de aminoácidos similares a las del antígeno, serán capaces de activar a linfocitos T para proliferar e inducir la formación de citocinas. (Luque Piñana 2011; Roulias et al. 2014).

La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de una proteína permite predecir sus propiedades fisicoquímicas como su peso molecular, su punto isoeléctrico o carga, hidrofobicidad, estabilidad. Esto parecía implicar que

semejanzas estructurales o bioquímicas entre proteínas alergénicas de la misma familia podría explicar lo que determina la alergenicidad. La mayoría de los alérgenos pueden agruparse en 4 familias estructurales cuando se clasifican de acuerdo con el plegamiento de proteínas: (1) cadenas β antiparalelas; (2) cadenas β antiparalelas estrechamente asociadas con una o más hélices α ; (3) estructuras α y β no relacionadas estrechamente; y (4) estructuras α hélice (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009), sin embargo, la semejanza entre secuencias simples no es suficiente para predecir de forma concluyente la reactividad cruzada. Mientras que secuencias cortas pueden definir un epítope (son suficientes unos 10 aminoácidos para constituir un epítope), tramos cortos de secuencias idénticas no son lo suficientemente largos para predecir la reactividad cruzada de epítopes IgE con significación estadística (Pomés 2008; Ivanciuc, Garcia, et al. 2009; Traidl-Hoffmann et al. 2009; Luque Piñana 2011; Roulias et al. 2014).

La reactividad cruzada entre pólenes y alimentos se extiende entre diferentes especies y aún entre especies de diferentes continentes. Algunos alérgenos están ampliamente distribuidos en individuos taxonómicamente diferentes. Esto significa que pueden existir homólogos en muchos, si no todos, los alimentos derivados de plantas, aun cuando sean botánicamente diferentes. Estos alérgenos son « panalergenos » proteínas ampliamente extendidas en el reino vegetal, implicadas en funciones biológicas importantes (generalmente de defensa), por lo que sus secuencias y estructuras están altamente conservadas (Pomés 2008; Fernandez-Rivas 2009; R Asero 2011; Flores et al. 2012; Giangrieco et al. 2012).

Dos aspectos inmunológicos muy distintos deben distinguirse en cuanto a la capacidad alergénica de una determinada molécula: la inmunogenicidad y la reactividad. La primera se refiere a la capacidad de un alérgeno para inducir una respuesta alérgica mediada por la síntesis de IgE, en el caso de la alergia, y la segunda a la reactividad provocada a través de las IgE ya sintetizadas por una exposición previa, al unirse al alérgeno. Cuando se produce contra una proteína distinta al alérgeno que provocó la sensibilización, pero que es homóloga a él, se habla de reactividad cruzada. Este fenómeno se basa en la similitud entre la superficie molecular de las proteínas homólogas. Un grado de identidad en la

secuencia de aminoácidos no superior al 25% puede ser suficiente para que dos proteínas se plieguen de modo equivalente y compartan una estructura terciaria común. Sin embargo, un mayor grado de identidad (>70%) es necesario para que dos proteínas compartan aminoácidos expuestos en la superficie molecular y epitopes de IgE y, por tanto, para que la reactividad cruzada tenga lugar. Hay por tanto tres factores que favorecen la existencia de reactividad cruzada:

1. La estructura molecular altamente conservada, cuando la proteína posee una secuencia de aminoácidos muy parecida en las diversas fuentes alérgicas. Puede y suele ocurrir cuando las proteínas tienen idéntica función biológica;
2. Coincidencia de tejidos: la presencia de proteínas con idéntica función biológica y por tanto con estructuras semejantes se acentúa en tejidos homólogos;
3. Proximidad filogenética de las especies alérgicas: la similitud estructural entre proteínas homólogas es mayor para las procedentes de fuentes alérgicas filogenéticamente cercanas.

En ocasiones se puede predecir la reactividad cruzada entre alérgenos conociendo la taxonomía de las plantas que los producen, de manera que las más relacionadas filogenéticamente son las que producen más alérgenos homólogos. Muchos de los componentes de determinadas fuentes alérgicas, como es el caso de los grupos 1 y 5 de las gramíneas, poseen una estructura tan parecida que la sensibilización a una de ellas implica la sensibilización al resto. Por tanto, el tratamiento de los pacientes se vería notablemente simplificado si el paciente alérgico a los miembros de estas familias fuera tratado exclusivamente con el extracto de la especie con mayor prevalencia geográfica.

Mediante alérgenos como profilinas, polcalcinas y en menor medida las beta 1,3 glucanasas, también puede ocurrir que exista reactividad cruzada entre plantas poco relacionadas filogenéticamente, las profilinas y polcalcinas han sido identificadas en prácticamente todas las clases de especies vegetales y sus miembros son considerados como panalérgenos. Así, se han visto sensibilizaciones en pruebas cutáneas a pólenes a los que el paciente no está expuesto. Este es el caso por ejemplo de la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*), un árbol común en las regiones mediterráneas. En España, las cifras de sensibilización cutánea a este polen oscilan entre 5,6% en Elche y 29,41% en Zaragoza, aunque no se han encontrado pacientes monosensibles a este polen. Esto hace pensar que la sensibilización a la palmera es la expresión de una

reactividad cruzada entre polenes. Su floración tiene lugar durante los meses de primavera y su polen no es muy abundante. Solo en la zona de Elche se han encontrado concentraciones de polen de palmera apreciables. En ninguno de los estudios realizados hasta ahora en España se han encontrado pacientes monosensibles al polen de palmera datilera, esto indica que la sensibilización cutánea puede ser únicamente la expresión de una reactividad cruzada entre pólenes, posiblemente debida a una profilina. Los extractos de polen de palmera se ha visto que son ricos en estas proteínas y se ha demostrado que contienen entre 25 y 50 veces más la cantidad de profilina que los de gramíneas. En un estudio realizado en el área mediterránea, se observó una sensibilización a polen de palmera del 16,39% en prueba cutánea, porcentaje que se corresponde con la prevalencia de sensibilización a la profilina hallada en los pacientes polínicos (en torno al 20%); quizá podría explicarse porque muchos de los pacientes reconocían al alérgeno Pho d1, una profilina identificada como uno de los alérgenos principales de este polen. Todos los pacientes sensibilizados al polen de la palmera estaban sensibilizados al menos a otros cuatro polenes, y la mayoría tenía pruebas cutáneas positivas con más de seis. Esto hace pensar que estos pacientes estarían sensibilizados a algún panalérgeno, que en el 55% de los casos, es una profilina. La idea de encontrar un marcador clínico que pudiera discriminar la población sensibilizada en pacientes alérgicos a las frutas utilizando como marcador la sensibilización a cítricos, sandía, melón, jitomate y plátano.

Entre las diferentes especies vegetales existe una alta homología de las profilinas, lo que da lugar a reactividad cruzada. Aunque la existencia de epítomos específicos de especies, hacen que entre algunas de ellas la reactividad pudiera ser solo parcial, en general desde el punto de vista práctico se podría usar una de ellas para detectar la sensibilización a esta familia de moléculas (Luque Piñana 2011).

El nivel de exposición y las propiedades del propio alérgeno juegan un papel importante en la determinación del potencial alérgico (Jenkins et al. 2005).

Si bien la determinación de estructuras tridimensionales de los alérgenos permite la explicación (y posible predicción) de reactividad cruzada entre moléculas homólogas de diferentes orígenes, la destrucción de la estructura

tridimensional de las proteínas por el calor o cambios de pH explica por qué varía la alergenicidad de las proteínas. (Pomés 2008; Ivanciuc, Schein, et al. 2009; Traidl-Hoffmann et al. 2009; Roulias et al. 2014) (Luque Piñana 2011).

En los años 90, gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular, se identificaron una serie de alérgenos responsables de la reactividad cruzada que en su mayoría son proteínas con actividad enzimática proteolítica (Delves, 2006), inhibitoria de otras enzimas, proteínas estructurales o de unión, de almacenamiento o reguladoras. Los 3 grupos de proteínas altamente conservadas responsables de la gran mayoría de casos de síndrome polen-alimento son los alérgenos homólogos de Bet v 1 (alérgeno principal del abedul), las profilinas y las proteínas transportadoras de lípidos (PTL). En los pacientes alérgicos a alimentos vegetales se detecta con frecuencia IgE dirigida frente a determinantes hidrocarbonados de glicoproteínas vegetales, aunque parece carecer de relevancia clínica (Riccardo Asero 2011b; Pomés 2008; Fernandez-Rivas 2009; Flores et al. 2012)

2.18 Diagnóstico de alergia alimentaria

Actualmente, en el diagnóstico de alergia alimentaria, el cuadro clínico define el inicio del protocolo de estudio, sin embargo, en los casos de alergia alimentaria al trigo, el diagnóstico se realiza por exclusión del alimento sospechoso (el trigo) o por dietas de eliminación, y posteriormente se confirma por reto alimentario (reintroducción monitorizada de alimentos que contienen gluten) para evaluar si la salud del paciente mejora con la eliminación o reintroducción del gluten a la dieta. Este abordaje carece de especificidad y está sujeto al riesgo del efecto placebo en la dieta de eliminación y la mejoría de los síntomas. (Sapone et al. 2012). El valor predictivo positivo de los anticuerpos IgE específicos al trigo es muy bajo principalmente debido a la reactividad cruzada con polen de gramíneas y la representación incompleta de proteínas de trigo en las pruebas de diagnóstico disponibles actualmente debido a la falta de un procedimiento estandarizado para la extracción de todas las fracciones de proteína de trigo (1^o); la ausencia de estudios de exposición de alimentos doble ciego controlados con placebo que comparan el perfil alergénico de las tres fracciones de proteínas de Osborne en sujetos con verdadera alergia al trigo (2^o), y (3^o) la falta de datos sobre las diferencias en la capacidad de unión a IgE, que

no lo hacen incluir todos los alergenicos derivados de las tres fracciones de proteina de trigo con diferente solubilidad (Pastorello et al. 2007).

El conocimiento actual de los alergenicos alimentarios es incompleto, sin embargo, se han podido indentificar grupos de alergenicos importantes en plantas alimenticias. Estas 4 familias son la superfamilia de las prolaminas de cereales (por ejemplo, el alergeno ω -5 gliadina del trigo), las proteinas de transferencia inespecificas de lipidos (como Pru p3 del Durazno, y Zea m14 de maiz), albuminas almacenamiento 2S [por ejemplo, Ber e 1 de la nuez de Brasil] y los inhibidores de la tripsina y la α -amilasa); las cupinas (incluyendo proteinas de almacenamiento 7S y 11S de semillas, como Ara h 1, 3, y 4 de cacahuete); homologos del alergeno principal del polen de abedul, Bet v 1 (como Mal d 1 en manzana y Api g 1 en el apio); y profilinas (como Api g 4 de apio) (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009).

El diagnostico y tratamiento de las enfermedades alergicas esta evolucionando gracias a las nuevas tecnicas de diagnostico molecular. El impresionante auge que ha experimentado la biologia molecular en las ultimas decadas, principalmente a traves de la genomica y proteomica, ha influido de forma decisiva en multitud de campos de la biomedicina, incluyendose entre ellas, la alergologia (Luque Piñana 2011).

Para establecer el diagnostico de alergia mediada por IgE, debe demostrarse la presencia de anticuerpos de tipo IgE especificos a un alergeno en particular. La forma mas comun de realizarse es mediante la introduccion de pequenas cantidades de extracto alergenco en la piel que de origen a la formacion de una papula, sin embargo en el caso de los alimentos, los extractos empleados han demostrado poca sensibilidad. Cuando se preparan extractos de alimentos crudos, se presenta una variacion en la expresion de alergenicos debido a la variabilidad biologica. Mas aun, algunos alergenicos importantes pueden estar presentes en concentraciones bajas o no encontrarse en ciertos extractos, contribuyendo a su baja sensibilidad diagnostica (Vieths y cols, 2002). Los factores que influyen en estas diferencias son: la etapa de maduracion, las diferencias entre cultivos, la degradacion proteolitica y los protocolos utilizados para la extraccion que afectan la cantidad relativa de muchas proteinas y el perfil de los componentes alergenicicos (Giangrieco et al. 2012). Todos estos problemas pueden resolverse mediante el uso de preparaciones alergenicicas altamente

purificadas, área de interés reciente que se ha denominado “diagnóstico basado en Componentes”, el cual permite aumentar la sensibilidad diagnóstica in vitro, detectar diferencias geográficas en patrones de sensibilización o alérgenos individuales, realizar una correlación del cuadro clínico con patrones de sensibilización y/o identificar alérgenos individuales como biomarcadores de reactividad cruzada (Steckelbroeck et al. 2008; Vieths & Hoffmann-Sommergruber 2008; Luque Piñana 2011).

Puesto que parece imposible obtener extractos estandarizados con una composición alérgica constante y que contengan todas las proteínas alérgicas presentes en la fuente natural, el diagnóstico molecular ha ganado mucha atención en el pasado reciente. Un gran número de alérgenos se han caracterizado por técnicas inmunoquímicas y de biología molecular. Basados en la información de la secuencia de los alérgenos, se puede realizar un primer acercamiento de las funciones biológicas de estas moléculas (Vrtala et al. 1993). Los alérgenos tienen una naturaleza proteica, por lo tanto, tienen propiedades de las moléculas proteicas. Es bien sabido que la estructura y función proteica se ven afectadas por las características físicas y químicas del medio ambiente incluyendo la composición química del medio, la fuerza iónica, el pH, la temperatura, etc. La función de algunas proteínas está determinada por la interacción con otra molécula proteica. Esta interacción proteína-proteína puede depender de las condiciones ambientales, experimentales que ocurran en torno a estos dos actores. El diagnóstico alergológico se basa en la detección de interacciones proteína-proteína, incluyendo el alérgeno y el anticuerpo IgE que reconoce específicamente el alérgeno bajo investigación (Jenkins et al. 2005; Giangrieco et al. 2012).

2.19 Purificación de proteínas

Las proteínas (o polipéptidos) son secuencias de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos. Son moléculas grandes con un tamaño definido, forma y carga. La purificación de una proteína requiere de una estrategia inteligente en la selección y combinación de técnicas basadas en el conocimiento que de una proteína de interés se tiene, es decir de sus propiedades (Alden Green & Hughes n.d.). Tres requisitos son necesarios para desarrollar una estrategia de purificación: 1) determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su

uso posterior, 2) conocer la mayor información relacionada con la fuente y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes en la preparación biológica y 3) buscar la mejor fuente de la proteína de interés (Duarte-Vazquez 1999; Williams 2001).

2.20 Propiedades de las proteínas:

1. *Solubilidad.*- La separación exitosa de proteínas sobre la base de su solubilidad depende del control de ciertas variables. Estos incluyen el pH y la temperatura, así como la composición del disolvente y el carácter de las proteínas presentes. El disolvente se puede variar mediante la adición de cantidades variables de sales, incluyendo metales pesados o cambiando la constante dieléctrica mediante el uso de mezclas acuosas de disolventes orgánicos en lugar de agua. En general, las separaciones se realizan después de que la fase sólida y la solución han entrado en equilibrio entre sí. La solubilidad depende de las cargas electrostáticas, la carga neta depende del número, identidad, localización de los aminoácidos y pH del solvente. La característica más importante de una proteína es el número y disposición de las cargas en la molécula. Esto depende de la composición de aminoácidos - en particular, sobre el número de grupos carboxilo libres de residuos aspártico y glutámico por un lado, y de los grupos básicos de histidina, arginina, y los residuos de lisina en el otro. Depende del punto isoeléctrico (rango de 5 a 8.5). El punto isoelectrico depende de la carga de 7 aminoácidos: glutamato (grupo carboxilo δ), aspártico (grupo carboxilo β), cisteína (grupo tiol), tirosina (grupo fenol), histidina (cadenas laterales y grupo imidazol), lisina (grupo amonio ϵ) y arginina (grupo guanidina) (Alden Green & Hughes n.d.; Nehete et al. 2013).
2. *Peso molecular.* Las variaciones en el peso molecular de las proteínas dependen del número de residuos de aminoácidos. Cada aminoácido contribuye a aumentar 110 el valor del peso molecular de la proteína.
3. *Forma.* Existen proteínas globulares (por ejemplo. insulina), ovales (por ejemplo: albúmina), filamentosas o elongadas (por ejemplo: fibrinógeno).
4. *Proteínas ácidas o básicas.* Las proteínas en las que la relación de $pI > 7$, entonces es una proteína básica y si el valor es < 7 , entonces es una proteína ácida.

5. *Reacciones colorimétricas*. Son útiles para identificar la naturaleza de los aminoácidos presentes en las proteínas.
6. *Vida media en vivo*. Indica el tiempo medio en el que el 50% de la cantidad de proteína desaparecen desde su síntesis en la célula. Se utilizan 3 modelos de organismos para predecirlo: humano, levaduras y E. Coli.
7. *La regla "N-terminal"*, que se refiere a la utilización de la vida media de la proteína para identificar su residuo N-terminal.
8. *Coeficiente de extinción*. Se indica en la cantidad de luz absorbida por una proteína en una cierta longitud de onda. Este valor del coeficiente de ayuda en la estimación y la identificación de una proteína cuando se expone a un espectrofotómetro. El coeficiente de extinción molar de una proteína puede ser estimado por conocer su composición de aminoácidos.
9. *Índice alifático*. El índice alifático de una proteína indica un volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina y leucina), que también aumentan la termoestabilidad de las proteínas globulares.
10. *GRAVY*. (Gran promedio de hidropaticidad, por sus siglas en inglés). Esta se calcula utilizando la escala de Kyte - Doolittle de la siguiente manera: $GRAVY = \text{suma de los valores de hidropatía de aminoácidos} / \text{números de residuos en secuencia}$. Una puntuación positiva indica un mayor aumento de la hidrofobicidad.
11. *Secuenciación de proteínas*. Se refiere a la determinación de la secuencia de aminoácidos, la conformación de proteínas y el alcance de la formación de complejos con moléculas no peptídicas en una proteína (Nehete et al. 2013).

2.21 Conceptos en purificación de proteínas

- 1) **Factor de purificación**: es el aumento en la actividad específica después de una técnica de purificación. Es la relación entre la actividad específica después del paso de purificación y la actividad específica en el extracto crudo. Puede usarse para saber que tan buena es una técnica para aumentar la pureza de una proteína.
- 2) **Rendimiento**: es la evaluación de la cantidad de actividad o proteína activa obtenida después de un paso de purificación. Generalmente es reportado en por ciento, siendo el 100% de la actividad en el extracto crudo. Debido a que no existe especificidad ni eficiencia absoluta, algo de proteína activa es perdida

durante cada paso de purificación, lo que provoca al final de la purificación, un rendimiento de la proteína activa como un pequeño porcentaje de la original(Duarte-Vázquez et al. 2001).

2.22 Técnicas de purificación

Métodos de precipitación selectiva

1. desalado
2. Precipitación isoiónico
3. Precipitación cosolvente orgánica
4. (Two carbon organic co-solvent precipitation of proteíns.
5. Precipitación cosolvente orgánica de C4 y C5, partición de fase y extracción de las proteínas
6. exclusión de proteínas y agentes (polímeros neutros) y osmolitos
7. precipitación polielectrolito sintético y semisintético
8. Precipitación metálica y heteropolianión polifenólica
9. emparejamiento hidrofóbico de iones (HIP) de ligandos entremezclados
10. Coprecipitación de ligandos de matrices apiladas
11. Precipitación catiónica de metales di y trivalentes(Nehete et al. 2013)

PRECIPITACIÓN CON SALES

La solubilidad de una proteína está determinada por el grado de hidratación de la molécula. La precipitación por la adicción de sales neutras, es probablemente el método mas usado para el fraccionamiento de proteínas por precipitación; generalmente la proteína precipitada no se desnaturaliza y su actividad se recupera redisolviendo la pastilla formada, adicionalmente las sales pueden estabilizar a la proteína contra la desnaturalización.

Durante muchos años se ha utilizado el método de adicción de sales a las proteínas con el doble propósito de concentrar y purificar algunas proteínas específicas. La sal utilizada con mayor frecuencia es el sulfato de amonio, por su gran solubilidad, ausencia de efectos perjudiciales para la mayoría de las enzimas, relativamente barata y, en algunos casos, por su efecto estabilizan para ciertas enzimas.

Este tipo de precipitación es dependiente de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de la molécula de proteína, pero algunos se encuentran localizados hacia el exterior

de la proteína con frecuencia formando “parches”. El agua es forzada a entrar en contacto con estos grupos, pero cuando la sal se agrega al sistema, el agua sonata preferentemente a los iones de la sal y a medida que se incrementa la concentración de éstas, el agua se elimina de la periferia de la proteína exponiendo eventualmente los parches hidrófobos; estos parches hidrofóbicos de la molécula de la proteína pueden interaccionar con los de otra proteína dando como resultado la agregación de las mismas.

PRECIPITACIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS

Muchas proteínas pueden ser precipitadas por la adición de solventes orgánicos miscibles en agua tales como acetona y etanol. La adición de solventes orgánicos a soluciones de proteínas, reduce la solubilidad de éstas al reducir la constante dieléctrica del medio. Cuando se adicionan cantidades crecientes de solventes orgánicos las moléculas de proteína interaccionan más con otras moléculas de proteína que con el agua; la formación de complejos entre moléculas de proteínas de distinta carga continúa hasta que se alcanza un punto en que la proteína precipita debido al decremento de la constante dieléctrica.

Sin embargo, cuando se utilizan cantidades elevadas de solventes orgánicos, se puede producir una desnaturalización de la misma por rompimiento de los enlaces hidrófobos. Para minimizar esta desnaturalización, la precipitación debe llevarse a cabo a bajas temperaturas; el solvente orgánico debe ser preenfriado a temperaturas menores de -15 grados C, y el extracto que contiene la enzima a 0 grados C. El solvente debe adicionarse lentamente con agitación constante hasta la concentración deseada. El precipitado formado es removido y redisuelto, o secado a bajas temperaturas para remover el solvente, de otra manera, se puede perder una considerable actividad de la enzima por desnaturalización.

PRECIPITACIÓN POR POLÍMEROS ORGÁNICOS

Para la precipitación de proteínas pueden utilizarse algunos otros precipitantes orgánicos; el polietilenglicol es el polímero orgánico más comúnmente usado, sin embargo, cuando se utiliza en altas concentraciones (mayores al 20%) da como resultado soluciones muy viscosas, haciendo difícil la recuperación del precipitado.

La precipitación con polietilenglicol ha sido utilizada con éxito considerable para disminuir la solubilidad de algunas proteínas tales como las globulinas;

adicionalmente, la presencia de iones metálicos bivalentes puede disminuir considerablemente la solubilidad de varias proteínas en polietilenglicol.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía debe su nombre a que fue descrita cuando se intentó separar pigmentos auxiliares de la fotosíntesis, generando un patrón de bandas de colores. A la fecha es una de las técnicas más usadas para la separación de moléculas con actividad biológica. En general la cromatografía se basa en la absorción y/o adsorción de moléculas en matrices.

Los absorbentes más utilizados para proteínas son los intercambiadores de iones, materiales hidrófobos, ligados sintetizados químicamente, o compuestos biológicos tales como sustratos, inhibidores de enzimas, o anticuerpos, los cuales se conocen como absorbentes por afinidad. Las matrices usadas comúnmente son la celulosa, la agarosa u otros polímeros de carbohidratos.

La mayoría de los esquemas de purificación involucran de alguna manera a la cromatografía, la que se ha vuelto una herramienta esencial en todo laboratorio donde se requiere de una purificación de proteínas. Diferentes técnicas de cromatografía, con diferentes selectividades forman poderosas combinaciones para la purificación de cualquier biomolécula (GE healthcare Biosciences 2007).

SEPARACIÓN BASADA EN LA CARGA

El intercambio iónico es la técnica de cromatografía más comúnmente practicada en la purificación de proteínas, esto es en parte por su fácil escalamiento, amplia aplicabilidad y su bajo costo en comparación con otros métodos de separación.

Se requiere de un material insoluble con propiedades hidrofílicas que tenga grupos ionizables con carga opuesta a la carga neta de la proteína. Además la proteína debe ser capaz de moverse en el material insoluble de una manera selectiva.

Este tipo de cromatografía involucra dos eventos separados, (1) la unión de la proteína a la matriz y (2) la evolución o desplazamiento de la proteína de la matriz. Debido a que la retención involucra interacciones electrostáticas entre las cargas de la matriz y la proteína. Proteínas con alta densidad de carga requieren de altas concentraciones del counterion para ser eluidas.

Otra forma de eludir la proteína es por la modificación del pH. El material intercambiador debe tener una carga opuesta a la de la proteína para que ocurra la adsorción, después de la adsorción la proteína puede ser eluida por modificación del pH de la solución acarreadora de tal manera que la carga del material intercambiador o de la proteína es modificada.

SEPARACION COVALENTE

La cromatografía covalente se usa en el aislamiento de proteínas que contienen grupos tiol, por interacciones tiol-disulfuro. La estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas es estabilizada por puentes intra e inter disulfuro, formados por la oxidación de dos residuos de cisteína. El aislamiento de la proteína por el intercambio tiol-disulfuro involucra la reacción de un grupo tiol-disulfuro 2'piridil de la matriz con el grupo tiol de la proteína. Después de que la proteína se une, la elución se lleva a cabo con agentes reductores como glutatión y ditioneol.

PURIFICACION POR AFINIDAD

Las proteínas presentan sitios de unión para interactuar con otras biomoléculas llamadas ligandos; estos ligandos pueden ser pequeñas moléculas más grandes como hormonas. La cromatografía de afinidad es la técnica más poderosa para purificar proteínas, debido a su alta selectividad, además permite la purificación de una proteína sencilla de baja abundancia de una mezcla cruda de proteínas de elevadas concentraciones. En la tabla 2 se muestran algunos ligandos utilizados para la purificación de proteínas por esta técnica.

Tabla 2. Ejemplos de ligandos utilizados en la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.

Ligando	Proteína
Proteína/ Proteína G	Inmunoglobulinas de varias especies
Anticuerpos monoclonales	Antígenos
Inhibidores de proteasas	Proteasas
Polimixina B	Endotoxina C bacterina
Lectinas	Glucoproteínas
Biotina	Avidina
Heparina	Factores de coagulación

La elución de la proteína retenida de la columna se lleva a cabo por la modificación de las condiciones tales como pH, concentración de sal y en algunos casos se requiere la adición de detergentes u otras sustancias que promuevan la disociación del complejo proteína-ligando sin la destrucción de la forma activa de la proteína

SEPARACION POR INTERACCION HIDROFOBICA

Esta técnica de separación se basa en la fuerza de interacción entre zonas hidrófobas de la proteína y un ligando o grupo inmovilizado hidrofóbico. La técnica de separación hidrofobia es cada vez más utilizada debido a que es muy selectiva, de fácil manejo y con aplicaciones a prácticamente todas las proteínas. La técnica consiste en retener a la proteína en una matriz con un ligando hidrofóbico en un ambiente de alta concentración salina y la elución de la misma disminuyendo la fuerza iónica del amortiguador de elución.

SEPARACION BASADA EN EL TAMAÑO

La cromatografía de filtración en gel es utilizada para separar moléculas de diferentes tamaños; el principio básico de esta técnica es la participación de moléculas entre un solvente y una fase estacionaria de porosidad definida.

Considerando una muestra que contiene moléculas más grandes y más pequeñas que el poro de la matriz de la fase estacionaria, así como moléculas

de tamaño intermedio; las moléculas más pequeñas pueden entrar dentro de los poros de la matriz y moverse más lentamente a través de la columna, apareciendo hasta el final de la cromatografía, mientras que las moléculas más grandes son excluidas de la fase estacionaria y eluden primero de la columna.

Todas las moléculas son eluidas en orden decreciente de su tamaño.

Algunas dimensiones importantes en la filtración en gel son el diámetro del poro, el volumen interno y el diámetro hidrodinámico de la molécula de proteína.

SECUENCIA DE PURIFICACIÓN

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La purificación de proteínas varía desde un procedimiento de un solo paso como la precipitación hasta procesos de producción validados a gran escala. Con frecuencia, se requiere más de un paso para alcanzar el nivel de pureza deseado. La clave para una purificación de proteínas exitosa y eficiente es seleccionar las técnicas más apropiadas, optimizar su rendimiento para adaptarse a los requisitos y combinarlos en una forma lógica para maximizar el rendimiento y minimizar el número de pasos necesarios.

El primer paso es describir el escenario básico para la purificación. Las consideraciones generales deben contestar preguntas como: ¿Cuál es la intención de uso del producto? ¿Qué tipo de material inicial está disponible y como debería ser manejado? ¿Cuáles son los problemas de pureza en relación con el material de la fuente y la intención de uso del producto final? ¿Cómo debería removerse? ¿Qué debe removerse completamente? ¿Cuál debería ser la escala final de purificación? Si existe necesidad de escalar, ¿qué consecuencias tendrá esto en las técnicas de purificación elegidas? ¿Cuál son los costos económicos y cuáles los recursos y equipo disponibles?

Muchos de los protocolos de purificación requieren de más de un paso para lograr el nivel de pureza del producto. Esto incluye cualquier paso acondicionador necesario para transferir el producto de una técnica dentro de las condiciones adecuadas para realizar la siguiente técnica. Cada paso del proceso podrá causar alguna pérdida del producto.

Un análisis de varias estrategias de purificación publicadas, indica que la homogeneización es la técnica inicial de purificación empleada en la mayoría de las estrategias, la secuencia preferida de uso en seguida de la precipitación,

seguida del intercambio iónico, después de la cromatografía de afinidad con un paso final de filtración en gel.

La estrategia antes mencionada es hasta cierto punto lógica. Cada técnica explota una diferente propiedad de la proteína. La precipitación toma volúmenes iniciales muy grandes, de tal manera que se utiliza inicialmente para concentrar la proteína, la cromatografía de intercambio iónico remueve varios contaminantes antes de utilizar técnicas más caras de afinidad, la filtración en gel se utiliza como un paso final siempre y cuando no sea un problema la baja capacidad del sistema.

Adicionalmente se requieren varios pasos de diálisis para hacer apropiada la composición de la muestra para la siguiente etapa.

Primer paso: Preparación

La primera acción durante la purificación de una proteína es determinar cómo detectar a la proteína de interés. La necesidad de obtener una proteína, eficientemente, económicamente y con la suficiente pureza y cantidad, aplica a todos los procedimientos de purificación. Es muy importante fijar los objetivos de la purificación (si se requiere pureza, actividad o cantidad del producto final para evitar sobre o sub-uso de métodos), cantidad y mantenimiento de una actividad biológica y definir el marco de referencia económico y de tiempo para el trabajo. Toda la información concerniente a las propiedades de la proteína blanco y los contaminantes será de gran ayuda durante el desarrollo de la técnica de purificación a fin de simplificar las técnicas de selección y optimización. Algunos experimentos simples para caracterizar la muestra y la molécula blanco serán una excelente inversión. El desarrollo de ensayos analíticos rápidos y fiables es esencial para seguir el progreso de la purificación y evaluar su eficacia para la detección rápida de la proteína /actividad, recuperación y contaminantes críticos. La preparación de la muestra y los procedimientos de extracción deberían desarrollarse con anterioridad a los primeros pasos cromatógrafos de purificación. Debe prestarse especial atención a a) Minimizar la manipulación de la muestra en cada etapa para evitar procedimientos extensos los cuales aumentan el riesgo de disminuir la actividad o disminuyen la recuperación de la proteína. b) Minimizar el uso de aditivos (los aditivos pueden ser necesario que sean removidos en un paso extra de la purificación o podrían interferir con los ensayos de actividad). c) Remover los contaminantes dañinos de forma

temprana por ejemplo, proteasas. d) Usar una técnica diferente en cada paso para tener ventaja de las características de la muestra que pueden ser usadas para la separación (tamaño, carga, hidrofobicidad, especificidad de unión)

e) Disminuir el número de pasos ya que cada paso extra disminuye el rendimiento y aumenta el tiempo, por lo que es importante combinar los pasos de forma lógica.

Los requerimientos de la purificación deben tener en consideración la naturaleza de la fuente, la intención de uso del producto final y cualquier problema de seguridad especial.

Definir objetivos

Meta: Fijar objetivos mínimos para pureza, cantidad, mantenimiento de actividad biológica y economía en términos de tiempo y dinero. Definir los requerimientos de pureza de acuerdo con el uso final del producto.

Tabla 3. Ejemplos de requerimientos de pureza:

Extremadamente alta	> 99%	Usos terapéuticos, estudios in vivo
Alta	95 – 99%	Cristalografía de rayos X y la mayoría de los estudios fisicoquímicos de caracterización
Moderada	< 95%	Producción de Antígenos para anticuerpos Secuenciación N-terminal

La declaración de que una proteína es > 95% pura (por ejemplo la proteína diana constituye mas del 95% de las proteínas totales) está lejos de ser una garantía de que la pureza es suficiente para una aplicación prevista. Lo mismo es válido para el dicho de que “la proteína era homogénea mediante la tinción de Coomassie SDS-PAGE”. La pureza del 95% podría ser aceptable si el restante 5% estuviera formado por impurezas inofensivas. Sin embargo, aun las menores impurezas podrían ser biológicamente activas y podrían causar problemas tanto

en aplicaciones de investigación como terapéuticas. Por tanto, es importante diferenciar entre contaminantes los cuales deben ser removidos completamente de aquellos que pueden ser reducidos a niveles aceptables. Dado que los diferentes tipos de material de partida contendrán diferentes perfiles de contaminantes, se presentarán diferentes problemas de contaminación.

Aunque el número de etapas de la purificación debe ser minimizada, la calidad del producto final no debería comprometerse. Los resultados posteriores podrían ser cuestionados si la pureza de la muestra es baja y los contaminantes desconocidos.

La necesidad de mantener la actividad biológica debería considerarse en cada etapa durante el desarrollo de la purificación. Es especialmente benéfico si las proteasas son removidas y la proteína blanco es transferida a un ambiente amigable durante el primer paso.

Puede ser necesario el uso de técnicas analíticas dirigidas a contaminantes específicos con el fin de demostrar que se han eliminado a niveles aceptables.

[Definir las propiedades de la proteína blanco y las impurezas críticas.](#)

Meta: Determinar una “ventana de estabilidad” para la proteína blanco para una selección y optimización más fácil de las técnicas y evitar la inactivación de las proteínas durante la purificación.

Compruebe la ventana de estabilidad de la proteína blanco al menos para el pH y la fuerza iónica.

Toda la información relativa a la proteína blanco y las propiedades de los contaminantes será de ayuda para escoger las técnicas de separación y las condiciones experimentales para la purificación. Las bases de datos para la proteína blanco o proteínas relacionadas, pueden proporcionar información sobre el tamaño, punto isoeléctrico (pI), hidrofobicidad o solubilidad.

Una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa o bidimensional puede indicar la complejidad de la muestra y las propiedades de la proteína blanco y los contaminantes principales. Es particularmente importante conocer la ventana de estabilidad de las proteínas de modo que se evite la inactivación irreversible. La tabla 4 muestra como las diferentes propiedades de las proteínas pueden afectar una estrategia de purificación.

Tabla 4. Propiedades de las proteínas y sus efectos en el desarrollo de una estrategia de purificación

Propiedades de las proteínas blanco	Influencia en la estrategia de purificación
Estabilidad a la temperatura	Necesidad de trabajar rápidamente a temperaturas bajas
Estabilidad a pH	Selección de amortiguadores para la extracción y purificación. Selección de condiciones para la cromatografía: por intercambio iónico, por afinidad o de fase inversa
Estabilidad a los solventes orgánicos	Selección de las condiciones para cromatografía de fase inversa
Necesidad de detergentes	Considerar los efectos en los pasos de la cromatografía y la necesidad de remover el detergente. Considerar las opciones de detergente.
Sales (fuerza iónica)	Selección de las condiciones para las técnicas de precipitación, intercambio iónico y cromatografía por interacción hidrofóbica
Cofactores para estabilidad o actividad	Selección de aditivos pH, sales, amortiguadores
Sensibilidad a proteasas	Necesidad de remover rápidamente las proteasas o adición de inhibidores
Sensibilidad a los iones metálicos	Necesidad de añadir EDTA o EGTA a los amortiguadores

Sensibilidad Redox	Necesidad de añadir agentes reductores
Peso molecular	Selección de medios para filtración en gel
Propiedades de carga	Selección de condiciones de intercambio iónico
Afinidad bioespecífica	Selección de ligandos por afinidad media
Modificaciones traslacionales	pos Selección de medios de afinidad específica a grupos
Hidrofobicidad	Selección de medios para interacciones de cromatografía hidrofóbica

Desarrollar los ensayos analíticos

Meta: Para seguir el proceso de purificación, para evaluar la eficacia (rendimiento, actividad biológica, recuperación) y para ayudar durante la optimización.

Para progresar eficientemente durante el desarrollo de la metodología, la eficiencia de cada paso debe evaluarse. El laboratorio debería tener acceso a las siguientes técnicas:

Un estudio rápido y confiable de la proteína blanco

Determinación de pureza

Determinación de proteína total

Ensayos para las impurezas, las cuales deben ser removidas

La importancia de un ensayo confiable para la proteína blanco no debe sobrestimarse.

Cuando se evalúan fracciones cromatográficas debe asegurarse que los amortiguadores empleados en la separación no interfieren con el estudio. La pureza de la proteína blanco con frecuencia se estima mediante SDS-PAGE, electroforesis capilar, cromatografía de fase inversa o espectrometría de masas. Los ensayos de Lowry o Bradford se emplean con frecuencia para determinar la cantidad total de proteína.

Para purificaciones de proteínas de a gran escala, a menudo es necesario probar varios métodos para la purificación de proteínas blanco e impurezas críticas. En la práctica, cuando una proteína es purificada con fines de

investigación, lleva mucho tiempo identificar los ensayos específicos para los contaminantes dañinos. Un enfoque práctico es purificar la proteína hasta un cierto nivel y entonces realizar un SDS-PAGE, después de un periodo de almacenamiento para verificar la unión a proteasas. El adecuado control de los experimentos, incluyendo las pruebas de bioactividad, podría ayudar a indicar si las impurezas están interfiriendo con los resultados.

Segundo Paso: Extracción de la muestra y Clarificación

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

El primer paso para la purificación y caracterización de una proteína es, generalmente el lavado del tejido y la aplicación de una técnica que rompa las células del mismo. en el caso en que la proteína esté en el líquido biológico o en un lisiado celular, el siguiente paso es separar el extracto protéico de los restos celulares por una técnica física, la mas usada es la centrifugación.

Captura

[Remover impurezas de forma temprana](#)

Definicion: la purificación inicial de la molecula blanco de la fuente en crudo o clarificado.

Metas: aislamiento rápido, estabilización y concentración.

En la fase de captura, el objetivo es el aislamiento, concentración y estabilización del producto blanco de manera eficiente por la optimización de la velocidad y capacidad. El producto es concentrado y transferido a un medio ambiente en el cual se conserve su actividad. Con frecuencia se emplea una forma de separación basado en una elución en intercambio ionico o cromatografía por afinidad. Idealmente, la meta es remover los contaminantes críticos. Algunas veces es posible alcanzar un alto nivel de purificación si se emplea un medio de afinidad selectivo.

La capacidad de unión de una proteína en presencia de impurezas será uno de los parámetros mas importantes para optimizar y reducir la escala del trabajo. Por ejemplo, cuando se emplea cromatografía de intercambio ionico en una etapa de captura, la meta es adsorber la proteína blanco rápidamente de la muestra cruda y aislarla de contaminantes críticos como proteasas y glicosidasas. Las condiciones se seleccionan para evitar la unión de modo que la capacidad de la proteína blanco se maximice.

La técnica más común para una etapa de captura es la cromatografía de intercambio iónico (IEX) la cual tiene alta capacidad de unión. Los medios de IEX son resistentes a las ásperas condiciones de limpieza que pueden ser necesarias después de la purificación de muestras crudas. Típicamente, las proteínas son eluidas de una columna de IEX empleando un gradiente de sales. Sin embargo, durante el desarrollo de la metodología, una transferencia a una etapa de elusión dará una separación simple y robusta, en un periodo de tiempo corto y disminuirá el consumo de amortiguadores. Con frecuencia es posible emplear grandes cargas de muestra dado que el foco no está en la resolución (altas cargas de muestra pueden disminuir la resolución). La velocidad y capacidad y el bajo consumo de amortiguadores, con frecuencia son ventajas para una purificación a gran escala.

Concentración de los extractos

El paso de concentración es frecuentemente requerido después de que se ha obtenido una solución proteica clarificada, con el objetivo de ayudar a las subsecuentes etapas de purificación, obteniéndose un menor volumen, así como una elevada concentración de proteínas.

El método de concentración más utilizado es la precipitación; este método se basa en la diferencia en solubilidades entre la proteína y una sal añadida a la solución. La solubilidad de una proteína está determinada por 3 factores:

- 1) Densidad de carga, la cual está determinada por el número de residuos ácidos y básicos de los aminoácidos. Estos grupos cargados son proporcionados por las cadenas laterales aspartil, glutamil, cisteil, tirosil, histidil, lisil y arginil, así como los grupos amino y carboxílicos de los extremos del polipéptido; debido a la naturaleza hidrofílica de estos grupos ya que se orientan hacia el exterior de la molécula en contacto con la fase acuosa. La densidad de carga de la proteína se encuentra influenciada por las modificaciones en el pH. A bajos valores de pH, todos los grupos ionizables de las proteínas se encuentran protonados y la proteína tendrá una carga neta positiva. De manera que se incrementa el pH, los grupos carboxilo protonados son neutralizados, a cierto pH característico para cada proteína, esta tiene igual número de cargas positivas y negativas, en este punto la carga neta es cero (punto isoeléctrico). A medida que se incrementa el pH, las proteínas tendrán una carga neta negativa.
- 2) Grado de hidratación

- 3) Presencia de compuestos no protéicos. La presencia de grupos no aminoacídicos tales como fosfatos y carbohidratos disminuyen el grado de hidratación de la proteína.

Minimizar la manipulación de la muestra

Minimizar el uso de aditivos

Remover los contaminantes dañinos de forma temprana

Definición: Aislamiento primario de la proteína blanco de la fuente.

Meta: Preparación de una muestra clarificada para posterior purificación.

Remover los contaminantes particulados que no son compatibles con la cromatografía.

La necesidad de preparación de la muestra antes del primer paso cromatográfico depende del tamaño de la muestra. En algunos casos, las muestras pueden ser tomadas directamente después del primer paso de captura. Por ejemplo, el sobrenadante de los cultivos celulares, puede ser adecuado para ser usado directamente en una matriz como sefarosa de flujo rápido y puede requerir solo de un ajuste menor del pH o de la fuerza iónica.

Si se requiere la extracción de la muestra, la elección de la técnica debería ser robusta y adecuada para todas las escalas de la purificación susceptibles de ser utilizados. Cabe señalar que una técnica como la precipitación en sulfato de amonio, empleada frecuentemente en escala pequeña, no es adecuada para preparaciones a gran escala. La elección de los amortiguadores y aditivos debería tomarse en consideración cuidadosa si la purificación se escalará. En estos casos, amortiguadores baratos, como un acetato o citrato, son preferibles a los compuestos mas complejos usados en el laboratorio. Debería tomarse en cuenta que la diálisis y otros métodos comunes usados para el ajuste de las condiciones de la muestra no son adecuados para procesos muy largos o muestras muy pequeñas.

El gel de filtración Sefadex G-25 se usa en el laboratorio para la producción a escala de muestras y la clarificación de proteínas > 5000. Los volúmenes de las muestras, mayores de 30%, o en algunos casos, se carga el 40% del volumen total de la columna. En un solo paso, la muestra es desalada, intercambiada a un nuevo amortiguador y se remueven los materiales con bajo peso molecular. La alta capacidad de volumen, la relativa insensibilidad a la concentración de la muestra y la velocidad de este paso, permiten volúmenes de

muestra muy grandes para ser procesados rápida y eficientemente. Empleando un volumen de carga de muestra muy grande resulta en una separación con una mínima dilución de la muestra (aproximadamente 1:1,4).

La sefarosa G-25 también se emplea para el acondicionamiento, por ejemplo el ajuste rápido del pH, intercambio de amortiguadores y desalado entre los pasos de purificación.

Tercer Paso: Purificación intermedia

Definición: eliminación de contaminantes a granel.

Meta: Purificación y concentración.

En la fase de purificación intermedia el foco es separar la proteína blanco de la mayor cantidad de impurezas a granel, como otras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas y virus. La habilidad de separar componentes similares es de vital importancia. Los requerimientos para la resolución dependerán tanto del estado de la muestra producida en la etapa de captura como de los requerimientos de la pureza del producto final.

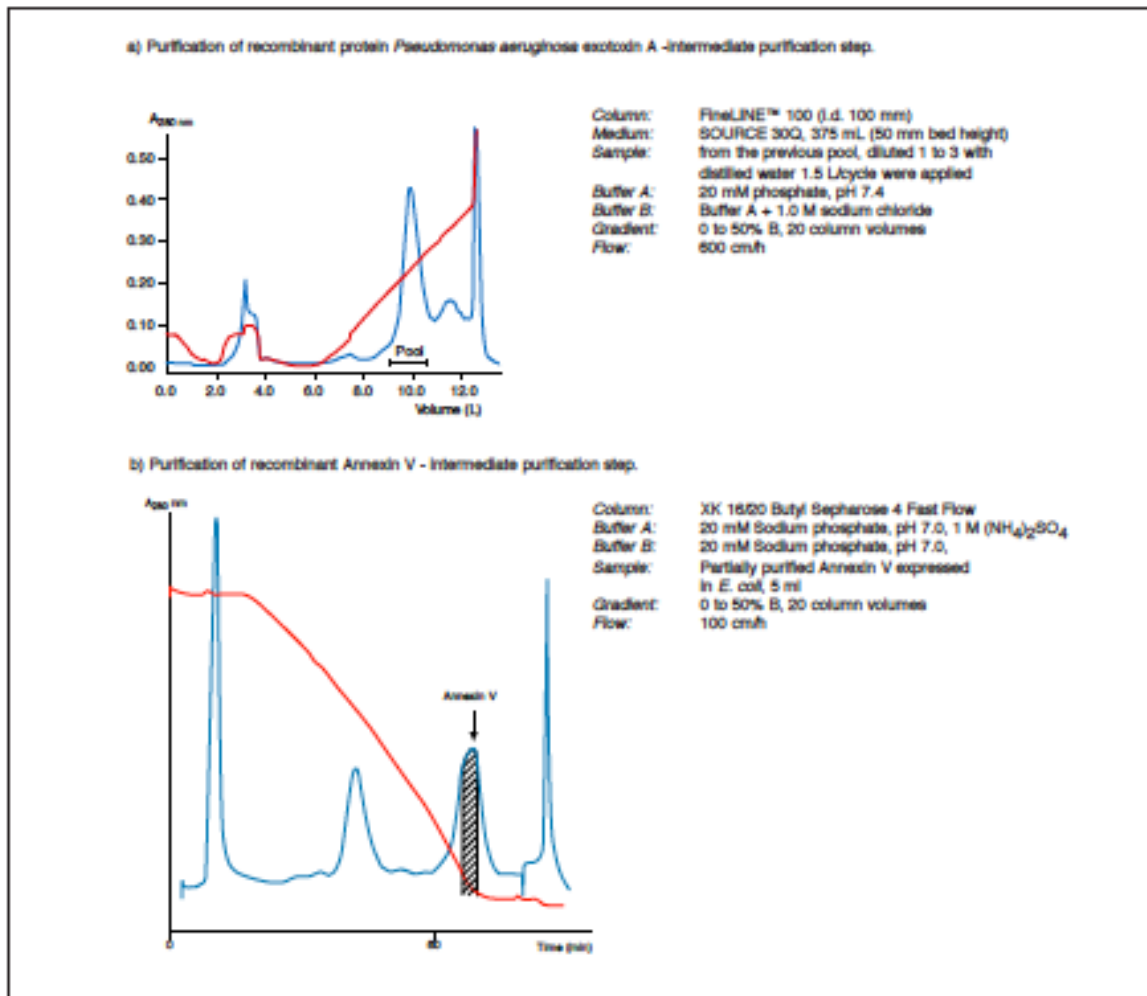
La capacidad será aun importante para mantener la productividad.

La velocidad es menos critica en la purificación intermedia dado que las impurezas causantes de proteólisis u otros efectos destructivos deberían haber sido removidos, y el volumen de la muestra debería haber disminuido, en la etapa de captura.

El balance ideal entre capacidad y resolución deberá definirse para cada aplicación específica. Esto entonces decide como las condiciones de separación deberían optimizarse durante el desarrollo de los protocolos.

Como en una etapa de captura, la selectividad durante la adsorción de la muestra será importante, no solo para lograr una alta capacidad de unión, sino para contribuir a la purificación logrando una separación posterior durante la aplicación de la muestra. Sin embargo, en contraste a la etapa de captura, la selectividad durante la desorción de la muestra de la columna es también importante y usualmente se logra aplicando un principio de desorción mas selectivo, como una columna de gradiente continuo o un procedimiento de elución de varios pasos, como se muestra en la figura 2.

Figura 2. selectividad durante la desorción de la muestra de la columna



Cuarto Paso: Pulimiento

Definición: Remoción final de trazas de contaminantes. Ajustar pH, sales o aditivos para su almacenamiento.

Meta: Producto final de pureza de alto nivel requerido.

En la etapa de pulimiento el foco está casi totalmente en la alta resolución para lograr la pureza final. La mayoría de los contaminantes e impurezas han sido casi completamente removidos excepto por trazas de impurezas como partículas filtrables, endotoxinas, ácidos nucleicos o virus, sustancias muy parecidas con variantes estructurales microheterogéneas del producto, reagentes o agregados. Para lograr la resolución, podría ser necesario sacrificar carga de muestra o aun de recuperación (por recorte de picos).

La recuperación del producto final es también una prioridad importante y

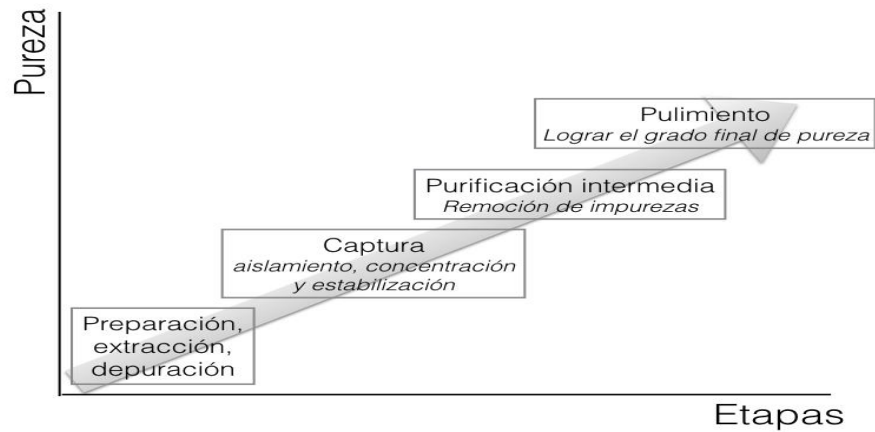
una técnica deberá seleccionarse si asegura la recuperación mas alta posible. La perdida del producto en esta etapa será mas costosa que en etapas iniciales. Idealmente el producto debería ser recuperado en las condiciones del amortiguador listo para el siguiente proceso.

La alta resolución requerida para lograr esta discriminación no siempre se alcanza empleando solamente técnicas altamente selectivas, pero usualmente se requiere de la selección de un medio altamente eficiente con tamaño de perlas uniformes y pequeñas.

Típicamente, la separación por cargas, hidrofobicidad o afinidad, ya han sido usadas, por lo que la filtración en gel de alta resolución es ideal para el pulimiento. El producto es purificado y transferido al amortiguador requerido en un paso y los dímeros y agregados con frecuencia pueden separarse.

Para remover contaminantes de tamaño similar, se requerirá una técnica alternativa de alta resolución empleando la elución con gradientes de superficie. La filtración en gel es también la mas lenta de todas las técnicas cromatograficas y el tamaño de la columna determina el volumen de la muestr que puede emplearse. Es por tanto, mas lógico emplear la filtración en gel después de tecincas que reducen el tamaño del volumen para poder emplear columnas mas pequeñas (GE healthcare Bio-sciences 2007).

Fig 3. Preparación y fases de las estrategias de purificación de proteínas.



Selección y Combinación de Técnicas de Purificación

La selección óptima y la combinación de las técnicas para captura, purificación intermedia y pulimiento es crucial para un proceso de purificación eficiente. Cada técnica ofrece un balance entre resolución, capacidad, velocidad y recuperación y deberá seleccionarse para obtener los objetivos de cada etapa de purificación.

Meta: La ruta más rápida para obtener un producto de la pureza requerida.

En general, la optimización de cada uno de estos parámetros podría alcanzarse solo a expensas de los otros, y las etapas de la purificación podrían comprometerse. La importancia de cada parámetro variará dependiendo de que la etapa de purificación en la que se este empleando para captura, purificación intermedia o pulimiento. Esto dirigirá la optimización de los parámetros críticos, así como la selección de medios de comunicación más apropiados para la etapa.

Las proteínas se purifican mediante técnicas cromatográficas de purificación las cuales se separan de acuerdo con diferencias en propiedades específicas, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Técnicas cromatográficas basados en las propiedad específicas de las proteínas

Propiedad	técnica
carga	Intercambio iónico (IEX)
Tamaño	Filtración en gel (GF)
Hidrofobicidad	Interacciones hidrofóbicas (HIC) Fase reversa (RPC)
Bioreconocimiento	Afinidad (AC)
Crga, especificidad del ligando o hidrofobicidad	Adsorción en cama ampliada siguiendo los principios de AC, IEX, HIC

Minimizar la manipulación de la muestra

Minimizar el número de pasos

Emplear diferentes técnicas para cada paso

Para cada separación cromatográfica, cada técnica diferente podrá ofrecer diferente rendimiento con respecto a la recuperación, resolución, velocidad y capacidad. Una técnica puede ser optimizada para enfocarse en alguno de estos parámetros. Por ejemplo, resolución, o lograr el mejor balance entre dos parámetros como velocidad y capacidad.

Una separación optimizada para uno de estos parámetros producirá resultados ligeramente diferentes en apariencia de aquellos obtenidos por la misma técnica pero enfocados en un parámetro alternativo.

Capacidad, se refiere a la cantidad de proteína blanco obtenida durante la purificación. En algunos casos, la cantidad de la muestra la cual deberá ser cargada, estará limitada por el volumen (como en la filtración en gel), o por grandes cantidades de contaminantes mas que por la cantidad de la proteína blanco.

La **velocidad** es de gran importancia al inicio del procedimiento de purificación donde los contaminantes como proteasas, deberán ser removidos lo mas rápidamente posible.

La **recuperación** comienza a tener mayor importancia en los procedimientos de purificación debido al valor aumentado de los productos de purificación. La recuperación está influenciada por los procesos destructivos en la muestra y por las condiciones desfavorables en la columna.

La **resolución** se consigue mediante la selectividad de la técnica y la eficiencia de la matriz cromatográfica para producir picos estrechos. En general, la resolución es el más difícil de lograr en los estadios finales de la purificación cuando las impurezas y la proteína blanco pueden tener propiedades muy similares.

Una guía de la adecuación de cada técnica de purificación para cada etapa se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Adecuación de las técnicas de purificación para la estrategia e purificación de tres etapas

Técnica	Características principales	Captura	Purificación intermedia	Pulimento	Condiciones de la muestra al inicio	Condiciones de la muestra al final
IEX	Alta resolución Alta capacidad Alta velocidad	+++	+++	+++	Baja fuerza de unión iónica Sin límite en el volumen de la muestra	Alta fuerza de unión iónica o carga de pH Concentrada
HIC	Buena resolución Buena	++	+++	+	Alta fuerza de unión iónica sin límite en el	Baja fuerza de unión iónica Concentrada

	capacidad Alta Velocidad				volumen de la muestra	
AC	Alta resolución empleando Superdex	+++	+++	++	Condiciones de unión especificas Sin limitaciones de volumen de la muestra	Condiciones especificas de eluido concentrado
GF	Alta resolución empleando superdex		+	+++	Volumen de la muestra limitado (<5% del volumen total de la columna) y bajo rango de flujo	Intercambio de amortiguadores (si se requiere) Diluido
RPC	Alta resolución		+	+++	Requiere de solventes orgánicos	En solventes orgánicos, riesgo de perdida de la actividad biológica concentrado

Evitar pasos de acondicionamiento de la muestra

El producto debería ser eluido desde la primer columna en condiciones adecuadas para comenzar en la siguiente columna.

Las condiciones de inicio y fin de las técnicas se muestran en la tabla 4.

Por ejemplo, si la muestra tiene una baja fuerza de unión iónica, podría aplicarse a una columna de intercambio iónico. Después, de la elución del IEX la muestra estará en un amortiguador con una alta fuerza iónica y podrá transferirse a una columna HIC (si fuera necesario, el pH deberá ajustarse y añadirse más sal). En contraste, si la muestra es eluida de una columna HIC, es probable que tenga altas concentraciones de sal y requerirá una dilución o pasar por una etapa de intercambio a un amortiguador a fin de disminuir la fuerza de unión iónica a un nivel adecuado para IEX. Por lo tanto es más sencillo pasar de IEX a HIC que viceversa. La precipitación en sulfato de amonio es una forma sencilla de clarificación y concentración en el laboratorio para realizar HIC (el cual requiere altas concentraciones de sal para mejorar la unión al medio) el cual es ideal como paso de captura. Las concentraciones de sal y el volumen total de la muestra podrán ser reducidos significativamente después de la elución de la columna HIC. La dilución de la muestra fraccionada o intercambio por amortiguador empleando columnas de desalación con sefarosa G-25 la preparará para el siguiente paso de IEX o AC.

La selección de la estrategia final dependerá siempre de las propiedades específicas de la muestra y del nivel de purificación requerida. Las combinaciones lógicas de las técnicas se muestran en la figura 4.

Fig. 4a Combinaciones lógicas de las etapas cromatográficas.

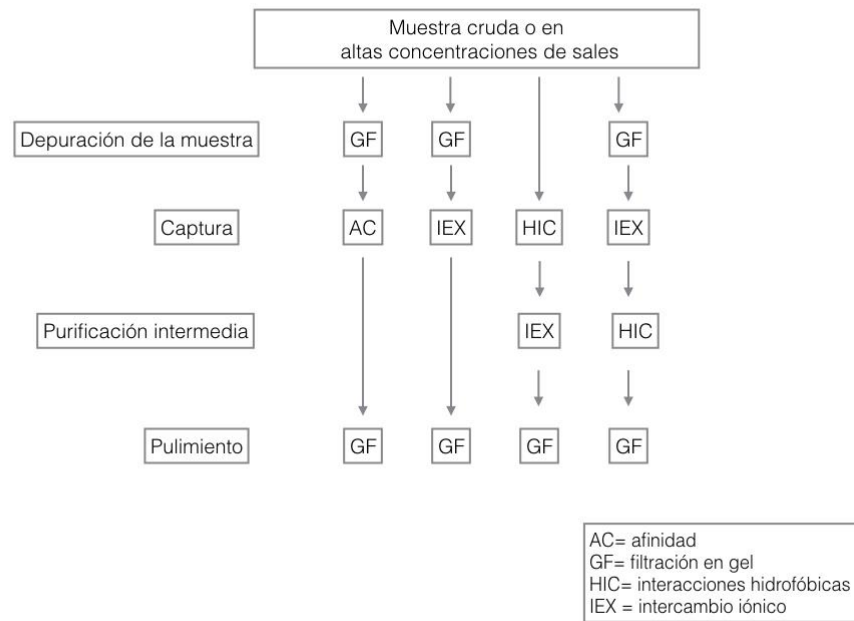
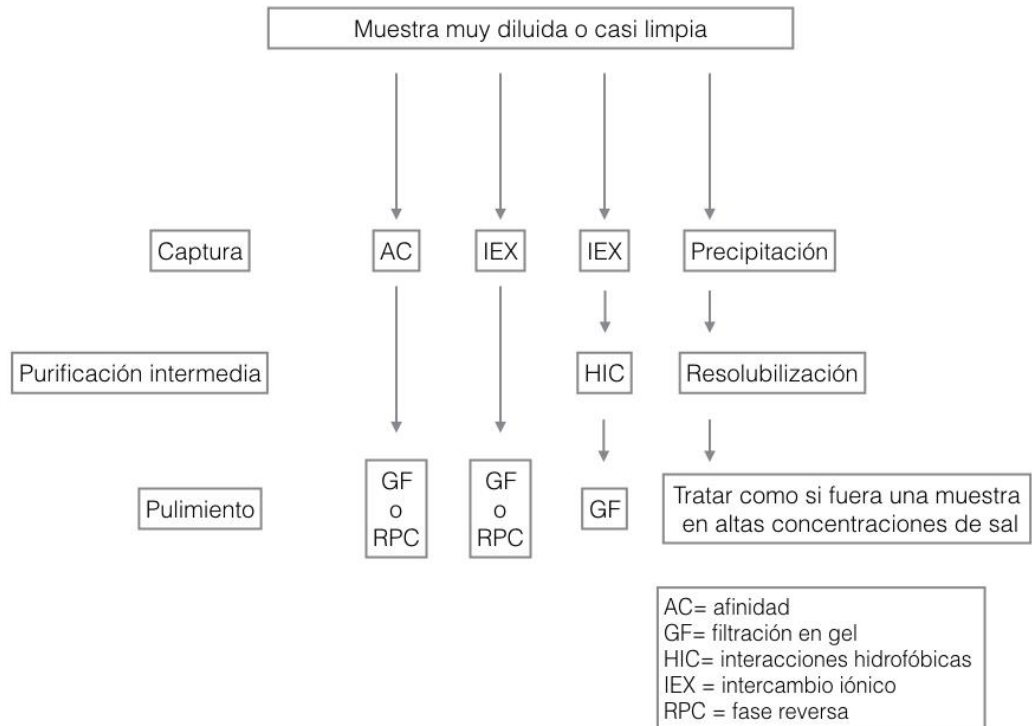


Fig. 4b Combinaciones lógicas de las etapas cromatográficas.



Para cada paso de captura, seleccionar las técnicas mostrando la unión mas fuerte a la proteína blanco, y la unión mas débil a la mayor cantidad de contaminantes que sea posible, por ejemplo la técnica con la mayor selectividad para la proteína de interés.

Una muestra es purificada empleando una combinación de técnicas y selectividades alternativas. Por ejemplo, en una estrategia de Purificación de Tres Etapas la etapa de captura selecciona entre diferencias en carga (IEX), la etapa de purificación intermedia de acuerdo a diferencias en hidrofobicidad (HIC) y la etapa de pulimiento en diferencias en tamaño (GF)

Si no se conoce nada sobre la proteína blanco, emplear IEX-HIC-GF.

IEX es una técnica que ofrece diferentes selectividades empleando intercambio aniónico y catiónico. La separación por pH podrá ser modificada para alterar las características de intercambio de los componentes de la muestra. Es

por tanto posible emplear IEX mas de una vez en una estrategia de purificación, para la captura, etapas intermedias o pulimiento.

Considerar RPC para un paso de pulimiento que provea que la proteína blanco pueda resistir las condiciones de la corrida.

La cromatografía de fase inversa (RPC) separa las proteínas y los peptidos en base a la hidrofobicidad. RPC es una técnica altamente selectiva (alta resolución), que requiere el uso de solventes orgánicos. La técnica es ampliamente usada para realizar ensayos de pureza cuando la recuperación de la actividad o estructura terciaria no son esenciales. Debido a que muchas proteínas son desnaturizadas por solventes orgánicos, la técnica no es generalmente recomendada para purificación de proteínas cuando podrían comprometerse la recuperación de la actividad y el retorno a una estructura terciaria. Sin embargo, en la fase de pulimiento, cuando la mayoría de las impurezas han sido removidas, RPC puede ser excelente, particularmente para proteínas blanco pequeñas, las cuales con frecuencia no se desnaturizan por solventes orgánicos.

- Si la purificación no se escalará (por ejemplo si solo se requieren miligramos de un producto), emplear técnicas de alta acción, medios preempacados como sefarosa de alto rendimiento (IEX, HIC), SOURCE (IEX, HIC), Monobeads (IEX) o Superdex (GF) para todos los pasos.

Preparación de la muestra

A pesar de que debe evitarse la manipulación adicional de la muestra entre los diferentes pasos de la purificación, podría ser necesario ajustar las condiciones del amortiguador a un producto eluido (pH, fuerza ionica y/o iones amortiguadores) para garantizar la compatibilidad con la siguiente etapa de la purificación.

La sefarosa G-25 es un medio ideal para una desalación rápida y ajuste del pH mediante intercambio de amortiguador entre las etapas de la purificación. Se cargan volúmenes de muestra mayores al 30%, o en algunos casos 40%, del volumen total de la columna. En un solo paso, la muestra es desalada, intercambiada a un nuevo amortiguador y se remueven las impurezas con bajo peso molecular. La figura 7 muestra una separación por intercambio típica. La alta capacidad de volumen y la velocidad de esta etapa tolera que puedan

procesarse grandes volúmenes rápida y eficientemente. La carga de grandes volúmenes de muestra resulta en una separación con mínima dilución de la muestra. Sefarosa G-25 también se emplea para un aclaramiento de la muestra rápido en una escala de laboratorio.

Emplear columnas pre-empacadas con sefarosa G-25 para un rápido acondicionamiento de la muestra en el laboratorio, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Uso de columnas preempacadas de sefarosa para acondicionamiento

Columna preempacada	Volumen de muestra cargada corrida	de	Volumen de muestra recuperada corrida	de Lote No.
HiPrep Desalado 26/10	2.5-15 ml		7.5-20 ml	17-5087-01
HiTrap Desalado	0.25-1.5 ml		1.0-2.0 ml	17-1408-01
Desalado rápido PC 3.2/10	0.05-0.2 ml		0.2-0.3 ml	17-0774-01
Desalado PD-10	1.5-2.5 ml		2.5-3.5 ml	17-0851-01

- La dilución puede ser usada como una alternativa a la desalación antes de la aplicación a una columna de intercambio iónico.

Métodos para la cuantificación de proteínas

Resulta prácticamente imposible aislar una proteína sin una técnica que permita evaluar la cantidad de la misma, esta determinación es necesaria para conocer el grado de purificación de cada paso. Existen varias técnicas disponibles, sin embargo, la selección de alguna de ellas depende de la exactitud, la precisión y la rapidez que se requiera. La cuantificación de proteína ayuda a calcular la actividad específica de una proteína activa.

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se requiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para muchos otros propósitos.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de éstos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. En la Tabla I se recogen los métodos más usados, así como sus respectivas sensibilidades. Cada uno de éstos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, las principales se recogen en la tabla II.

Resulta prácticamente imposible aislar una proteína sin una técnica que permita evaluar la cantidad de la misma, esta determinación es necesaria para conocer el grado de purificación de cada paso. Existen varias técnicas disponibles, sin embargo, la selección de alguna de ellas depende de la exactitud, la precisión y la rapidez que se requiera. La cuantificación de proteína ayuda a calcular la actividad específica de una proteína activa (Bollang et al, 1996)

Conocer la mayor información relacionada con la fuente y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes en la preparación biológica

Cuando se prepara un extracto total de proteínas de fuentes alimenticias crudas, debe tomarse en cuenta la variación en la expresión de proteínas alergénicas debida a la biovariabilidad. Algunos alérgenos importantes pueden estar presentes en bajas concentraciones y pueden perderse de algunas preparaciones de extractos, además la actividad enzimática endógena de fuentes alimenticias crudas podría degradar algunos alérgenos durante la extracción disminuyendo el contenido de alérgenos importantes. (Salcedo & Quirce 2011)

Tabla 8. Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad

Método	Rango de sensibilidad (mg)	Coefficiente de extinción o cálculo de la concentración
Método de	.	-
Absorción	100-3000	$E_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
A_{280}	3-100	$E_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
A_{205}	100-3000	Proteína (mg/mL) = $1.55A_{280} - 0.76 A_{260}$
$A_{280-260}$	25-700	Proteína (mg/mL) = $A_{235} - A_{280}/2.51$
$A_{235-280}$	5-180	$A_{224} - A_{236}/0.6$
$A_{224-236}$	2-45	Proteína (mg/mL) = $144 (A_{215} - A_{225})$
$A_{215-225}$		
Métodos		
Derivados		
Colorimétricos		
Buret	1000 - 100000	$E_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25 – 100 a 500 nm 2 – 30 a 660 nm 1 – 2 a 750 nm	Usar curva estándar
BCA	0.5 - 10	Usar curva estándar
Métodos		
		$E_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
Derivados		
Fluorométricos		
O-ftalaldehido	1 – 5 Λ excitación a 340 nm Λ emisión 475 nm	Usar curva estándar

Tabla 9. Principales métodos para la cuantificación de proteínas. Principales ventajas e inconvenientes.

Método	Ventajas	Inconvenientes
Método de absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Métodos Derivados		
Colorimétricos		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico, etc
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método mas sensible Es el que muestra menos interferencias	
Métodos Derivados		
Fluorométricos		
O-ftalato	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

Método de Biuret

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. 1Cu^{2+} se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

Método de Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Método de BCA

El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

OH^-



(Fernández & Galván 2004)

Electroforesis

No existe una medida para cuantificar directamente las impurezas de una muestra de proteínas. La demostración de la pureza de una proteína involucra el aseguramiento de la cantidad y tipo particular de impureza; además la pureza se

puede considerarse como la ausencia de cantidades detestables de materiales contaminantes.

Las técnicas electrofóreticas son generalmente usadas para determinar el grado de pureza más que para purificar una proteína. No obstante, en cualquier caso aproximadamente 100 miligramos de proteína pueden ser purificados en un solo paso. En la mayoría de los casos se requiere de 1 miligramo o menos de proteína. La separación de proteínas por este método es dependiente de la densidad de carga, distribución de la carga, forma y tamaño.

La densidad de carga (carga por unidad de masa), puede ser modificada por cambios de pH de la solución, a medida que se eleva el pH se disminuye la movilidad de la proteína donde la movilidad es cero. A valores de pH por debajo de este punto la proteína migra como catión; por encima de este pH se mueve como un anión. Es importante mencionar que el perfil de movilidad es diferente para cada tipo de proteína.

Principio de la electroforesis

Las proteínas en solución a un pH diferente a su punto isoeléctrico, poseen carga eléctrica como resultado de los residuos de aminoácidos ácidos (ácidos glutámico y ácido aspártico) y básicos (lisina y arginina) que la constituyen, y puesto que las constantes de disociación de estos grupos difieren ampliamente, la carga eléctrica neta de una proteína dependerá del pH al cual se encuentren y este será determinante para la movilidad electrofóretica de la molécula. Si una molécula con carga eléctrica neta q , es colocada en un campo eléctrico, se ejerce una fuerza F sobre ella que dependerá de la carga neta de la propia molécula y de la resistencia del medio en el cual se coloca la molécula, lo anterior puede ser expresado matemáticamente como sigue:

$$F = E \cdot q$$
$$\frac{F}{d}$$

en donde E es la diferencia de potencial entre los dos electrodos y d es la distancia entre ellos. La relación E/d frecuentemente se define como la resistencia del medio. La intensidad del arrastre sobre la molécula depende del

tamaño y forma de la molécula y de la viscosidad del medio a través del cual se mueve, esto puede expresarse matemáticamente por la ecuación de Stokes:

$$F = 6 \pi r n v$$

en donde r es el radio de la molécula esférica, n es la viscosidad del medio y v la velocidad a la cual se desplaza.

La fuerza de desplazamiento generada por el campo eléctrico tiene oposición por el arrastre y por lo tanto:

$$\frac{E \cdot q}{d} = 6 \pi r n v$$

Arreglando la ecuación anterior tenemos:

$$v = \frac{E q}{6 \pi r n d}$$

Por la fórmula anterior se puede deducir que la velocidad (v) a la cual una molécula se desplaza, es proporcional a la resistencia del medio y a la carga eléctrica neta de la molécula, pero inversamente proporcional a su tamaño y a la viscosidad de la solución.

Isoelectroenfoque

Es un método bastante sensible para separar y determinar la pureza de una proteína. La electroforesis se desarrolla en un gradiente de pH producido por una solución acuosa de un anfótero. La proteína migra en un campo eléctrico hasta solución acuosa de un anfótero. La proteína migra en un campo eléctrico hasta llegar a un punto en la solución donde el pH es igual al punto isoeléctrico. De esta manera puede determinarse el punto isoeléctrico de una proteína.

Electroforesis desnaturizante

Esta técnica de electroforesis es llevada a cabo en una solución que contiene dodecilsulfato de sodio como detergente y B-mercaptoetanol para

reducir los puentes disulfuro, y para asegurar una completa desnaturalización, la muestra es hervida por unos cuantos minutos.

Comparada con la electroforesis nativa, la electroforesis desnaturalizante presenta dos principales ventajas: en electroforesis nativa los agregados y partículas insolubles causan con frecuencia malos resultados principalmente por un bloqueo de los poros; cuando estos son completamente desnaturalizados, estos agregados son solubilizados y convertidos en polipéptidos sencillos. Otra ventaja es que la movilidad esta relacionada con el tamaño del polipéptido, de tal manera que se obtiene una indicación inmediata del peso molecular del componente (Duarte-Vazquez 1999).

Método de dispersión de luz dinámica

La dispersión (o difusión) de la luz es el fenómeno mediante el cual la radiación electromagnética, al chocar con pequeñas partículas de tipo coloidal o incluso molecular, es desviada en su dirección de propagación, de forma aparentemente caótica, en casa uno de los núcleos de dispersión, por tener un índice de refracción diferente del medio. La medida de la luz dispersada (o difusa), da lugar a técnicas muy útiles en la determinación de la concentración de sustancias en suspensión, así como en la caracterización de la forma y del tamaño de las partículas coloidales y macromoleculares. Estas técnicas son de dos tipos: turbidimetría y nefelometría (Valero 2012).

A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa

una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.

Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

En los últimos años, dispersión de luz dinámica (DLS) se ha convertido en un método popular para abordar y comprender mejor el crecimiento de cristales, el inicio de la agregación o la nucleación de macromoléculas. Debido a que es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución. (Cuadros-Moreno et al. 2014)

Tipo de fuente a emplear:

Se sugiere emplear una fuente natural si la proteína se mantendrá estable durante el proceso de purificación y si es abundante en la fuente natural, en caso contrario, se sugiere emplear una proteína recombinante obtenida de un sistema de expresión heterólogo. Cualquier modificación postraduccional de una proteína que afecte su capacidad general de unión a IgE debe mantenerse durante todo el proceso de la purificación. Si no se conocen modificaciones críticas, la estabilidad es otro punto clave. Un número de proteínas se sabe que están presentes en varias isoformas. Si el rango de isoformas contribuye a la actividad alérgica completa, la purificación de la mezcla de isoformas de fuentes naturales podría ser apropiada en orden de replicar la composición del alimento lo más cercano posible.

Si hay moléculas hipo o hiperalérgicas, la producción de una sola isoforma con una alta reactividad alérgica deberá ser considerada.

Si las proteínas están expuestas a la actividad de proteasas durante los procedimientos de extracción y purificación, como ocurre con las plantas alimenticias, necesita abordarse la susceptibilidad a la proteólisis. Para proteínas que se degradan fácilmente durante la extracción de fuentes naturales, el método de elección es la expresión en sistemas heterólogos. La abundancia es otro factor clave. Si los alérgenos se expresan en grandes cantidades deberán optimizarse protocolos de purificación adecuados, mientras que las preparaciones de alérgenos expresados en escasas cantidades pueden presentar dificultades. Para proteínas que pueden degradarse durante la extracción de fuentes naturales y son poco abundantes, la expresión en sistemas heterólogos es una alternativa importante y tal vez el método de elección.

En caso de modificaciones postraduccionales o abundancia de isoformas que contribuyan a la alergenicidad total del alimento, se preferirá la purificación de fuentes naturales. Por ejemplo, si el procesamiento proteolítico tiene lugar en fuentes naturales para generar una proteína madura con actividad alergénica completa, como ocurre con las proteínas de almacenamiento, la purificación de alérgenos naturales será mejor que los recombinantes. Si los puentes disulfuro son importantes para establecer la estructura del epítopo de IgE (Hoffmann-Sommergruber et al. 2008)

El diagnóstico de alergia alimentaria es complejo. Muchos de los estudios de prevalencia de alergia alimentaria a plantas alimenticias, se basan en auto-reportes de síntomas, y pocos estudios han utilizado retos alimentarios o la determinación de niveles de IgE específica.

Los pólenes y alimentos involucrados con frecuencia no tienen relación botánica pero contienen proteínas homólogas conservadas a las que se conoce como “pan-alérgenos” por su amplia distribución en el reino vegetal y están extensamente involucrados en la reactividad cruzada mediada por IgE entre antígenos de especies vegetales no relacionados (Hoffmann-Sommergruber et al. 2008)

La posibilidad de que proteínas de nuevos alimentos, medicamentos u organismos genéticamente modificados pudieran tener reactividad cruzada con alérgenos conocidos, debiera ser motivo de preocupación tanto de las agencias reguladoras como de los científicos y los médicos (Ivanciuc, Schein, et al. 2009)

Debido a que la polinosis es la causa más frecuente de alergia respiratoria y que tiene variaciones geográficas, es fácil comprender que las plantas causantes de alergia digestiva estarán relacionadas con dichos pólenes. Además, los hábitos alimenticios de las diferentes poblaciones influyen en ciertos patrones de alergia a pólenes y plantas alimenticias, así en los países de Europa del norte y Central, las reacciones alérgicas a plantas alimenticias se asocian a alérgenos del polen del abedul; homólogos de Bet v1 y profilinas, presentando sintomatología alérgica con la ingesta de frutas de la familia de las rosáceas como cereza, durazno, chabacano, pera y manzana. En Europa del Sur (España e Italia), los pólenes con más altas concentraciones son el olivo, chenopodium, parietaria y las LTP son más importantes. En los Estados Unidos, donde el polen más frecuente es la artemisia, se ha reportado asociación con plátano y melón; en Japón, la polinosis más frecuente se debe al cedro japonés y presenta reactividad cruzada con jitomate (Hauser et al. 2010; Bartra et al. 2009; Flores et al. 2012; Maeda et al. 2010)

Cuando se preparan extractos de alimentos crudos, se presenta una variación en la expresión de alérgenos debido a la variabilidad biológica. Más aun, algunos alérgenos importantes pueden estar presentes en concentraciones bajas o no encontrarse en ciertos extractos, contribuyendo a su baja sensibilidad diagnóstica (Vieths et al. 2002)

Además, la actividad enzimática endógena en los alimentos crudos puede degradar los alérgenos durante los procesos de extracción disminuyendo el contenido de alérgenos importantes. Todos estos problemas pueden resolverse mediante el uso de preparaciones alérgicas altamente purificadas, área de interés reciente, que se ha denominado "diagnóstico basado en componentes", el cual permite aumentar la sensibilidad diagnóstica in vitro, detectar diferencias geográficas en patrones de sensibilización o alérgenos individuales, realizar una correlación del cuadro clínico con patrones de sensibilización, identificar alérgenos individuales como biomarcadores de reactividad cruzada (Steckelbroeck et al. 2008; Vieths & Hoffmann-Sommergruber 2008)

En México no existen estudios sobre la prevalencia de la alergia alimentaria y por lo tanto, de los alérgenos alimentarios más frecuentes. En diversos estudios se ha reportado que la profilina tiene gran relevancia como alérgeno del polen de diferentes plantas, pero no existen estudios moleculares o

inmunológico detallados que determine la importancia de la profilina de *Cupressus arizonica* o *Triticum* como alérgeno.

Es importante caracterizar a un alérgeno a nivel molecular e inmunológico con la finalidad de proporcionar alternativas profilácticas que combatan y diagnostiquen eficaz y tempranamente el agente causal de la alergia y con esto contribuir al conocimiento y entendimiento de las bases moleculares de la respuesta alérgica.

2.23 Objetivo General:

Purificación y caracterización de la profilina del trigo y compararla con la profilina del polen *Cupressus arizonica* en busca de homología estructural como mecanismo de reactividad cruzada entre el polen del ciprés y trigo.

2.24 Objetivo Particular:

Purificación de la profilina a partir de la harina de trigo.

Caracterización estructural de la profilina a partir de la harina de trigo.

3. METODOLOGIA

3.1 Mediciones y análisis

Preparación del extracto de trigo crudo

Se empleó harina de trigo entero comercial, la cual se mantuvo en condiciones de almacenamiento hasta su utilización.

Se preparó una solución amortiguadora de carbonato de sodio a una concentración 25 mM (en un litro de agua destilada se agregó 3.4 grs de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se ajustó el pH a 9 dado el pI teórico de las profilinas.

A un litro de buffer de carbonato de sodio se agregó 500 grs de trigo molido, y se mezclaron en un plato de agitación por espacio de una hora. Se dejó en reposo hasta su total precipitación. El sobrenadante se filtró con malla para separar del sedimento de harina.

Se mezcló, en una proporción 1:2, 250 ml de sobrenadante con 500 ml de acetona congelada a cuatro grados centígrados, en un plato de agitación por espacio de dos horas, para precipitar las proteínas.

Se colocó el sobrenadante en tubos ependorf (50 ml) y se centrifugó a cuatro grados centrígrados a 11000 rpm por espacio de 10 minutos para formar una pastilla que contenía el concentrado de proteínas. Se decantó. Se resuspendió la pastilla con buffer de carbonato sódico (Na_2CO_3) mezclando en vortex y se congeló a -4 grados centígrados para su posterior utilización.

La pastilla pasó por varios filtros de separación de tamaños en membranas de nylon (2.5 mm, 1 mm y 0.45 mm) para evitar que se taparan las columnas de separación por tamaño e intercambio iónico.

Se realizó una primera separación de proteínas mediante cromatografía por columnas, por intercambio iónico, empleando la resina dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa) en la fase inmóvil. La elución de la proteína de interés se llevó a cabo mediante el aumento de la concentración de sal en la columna que compiten por la unión a la amina terciaria.

La proteína eluída, se sometió a cromatografía de permeación en gel, con agarosa (Sephadex G25) en la fase inmóvil.

La concentración de proteína en el extracto se determinó mediante la técnica de Bradford. Los extractos que contenían SDS (dodecilsulfato de sodio) se diluyeron con agua y con el extracto diluido se realizó determinación de Bradford empleando albúmina sérica bovina como un estándar. La concentración de proteína en la fracción fue de .75 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Identificación de las proteínas de trigo

Los productos obtenidos de las diferentes etapas de la purificación, así como el contenido proteico del extracto total de trigo se analizaron mediante SDS-PAGE, 15% utilizando poliacrilamida 30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:5:1 #160158 BioRad.

Para la ruptura de puentes disulfuro y estructura secundaria se utilizó amortiguador de muestra al 6% de b-mercaptoetanol y SDS en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System de la marca BioRad conectada a una fuente de poder PowerPac Basic de la misma marca.

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (G-250) blue silver.

Tabla 8. Preparación del Gel de separación de electroforesis SDS-PAGE al 15%

Componentes del gel de electroforesis al 15% volumen total 10mL	
H2O	2.3 mL
Poliacrilamida	5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.3 mL
10% SDS	0.1 mL
10% Persulfato de Amonio	0.1 mL
TEMED	0.04 mL

Tabla 9. Preparación del Gel de empaquetamiento de electroforesis SDS-PAGE al 5%

Componentes del gel de empaquetamiento de electroforesis al 5% volumen total 5mL	
H2O	3.4 mL
Poliacrilamida	0.83 mL
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.63 mL
10% SDS	0.05 mL
10% Persulfato de Amonio	0.05 mL
TEMED	0.05 mL

Tabla 10. Preparación del buffer de corrida de proteínas (electrodo 2x)

28.8 g	Glicina
6 g	Tris (base)
2 g	SDS

Ensayo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Se realizó un ensayo de dispersión de luz dinámica para identificar la presencia de las proteínas con un peso molecular entre 12 y 19. Los ensayos se realizaron a pH 7, con agua filtrada, la distribución del tamaño de las partículas tuvieron un promedio de 293.22 nm para la de trigo y 276.58 nm para la de polen de extracto alergénico de cupressus arizonica (figura 6). Los resultados mostrados en estas figuras son un ejemplo de la distribución de partículas que fueron observadas en el equipo de dispersión de luz marca Brookhaven modelo BI200SM con una fuente de luz láser He-Ne de 35 mW modelo 9167EB-1 marca Melles-Griot.

Por otra parte, se hicieron 5 repeticiones para cada tipo de muestra, las cuales nos dan la aproximación en tamaño de ambas muestras que muestran similitud. Con este ensayo podemos confirmar que el tamaño de partícula medida en dispersión de luz dinámica es casi la misma.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de proteínas de trigo

La extracción proteica de harina de trigo y su purificación por cromatografías se realizó mediante suspensión 1:1 (p/v) en amortiguador de carbonatos 25mM con PMSF como inhibidor de proteasas. El contenido proteico del extracto clarificado y su precipitación con acetona centrifugación y filtrado, se cuantificó dando un rendimiento de 10 mg de proteínas totales por gramo de harina procesada.

Al extracto purificado de trigo se tomó una alícuota de peso 0.0288 gr de extracto purificado de trigo en PBS (buffer de fosfatos) para la cuantificación en Bradford. La concentración que existe de proteína en el Bradford es de .75 µg/mL.

Se identificó del concentrado purificado dos proteínas similares con masa molecular de entre 35 a 40 kDa aproximadamente (figura 1 carril 8) y se comparó con un control estandarizado de extracto alergénico del polen cupressus arizonica de la marca IPI-**ASAC**® (figura 1 carril 3 y 4) tomando 20 µL + 80 µL de PBS en cada pozo. El resultado fue que el Control tiene el mismo peso

molecular que las muestras del extracto proteico de trigo carril 8 tomando 20 μL de una disolución de 0.288g/mL para este pozo mientras que los carriles 5, 6 y 7 son diluciones de 50, 25 y 12.5 % de la disolución de 0.288g/mL. Los carriles 1 y 10 contienen un marcador de peso tomando 3 μL en cada pozo de Spectra TM Multicolor Low Range Protein Ladder de la marca ThermoFisher Scientific. Los carriles 2 y 9 no contienen nada de muestra

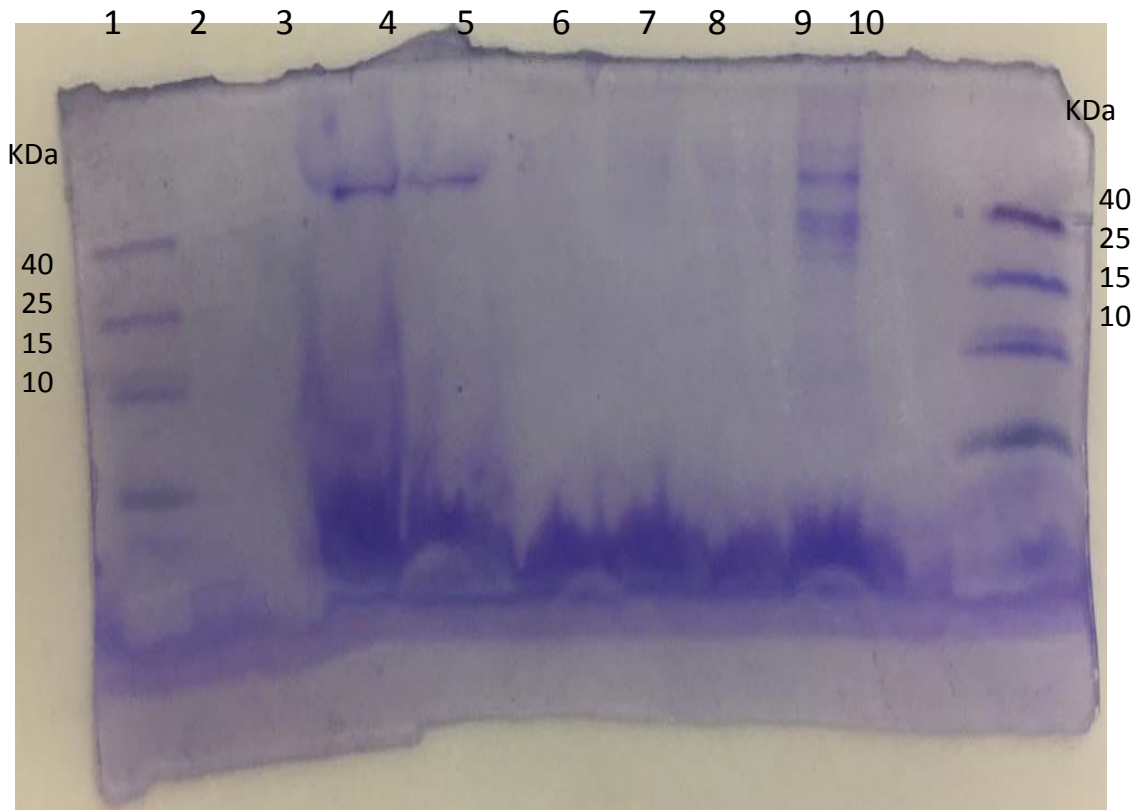


Figura 5. SDS-PAGE. En el carril 1, se presentan los marcadores de masa molecular. Carril 2 y 9 están vacíos. Carril 3 y 4 control estandarizado. Carril 5-8 extracto de trigo purificado.

Resultados del método de dispersión de luz dinámica

Los resultados nos dan la aproximación en tamaño de ambas muestras dando una similitud en ambas, con este ensayo podemos confirmar que el tamaño de partícula medida en dispersión de luz dinámica es casi la misma,

como se aprecia en la figura 6, dando promedios de 293.22 nm para la de trigo y 276.58 para la de extracto de polen de *cupressus arizonica*.

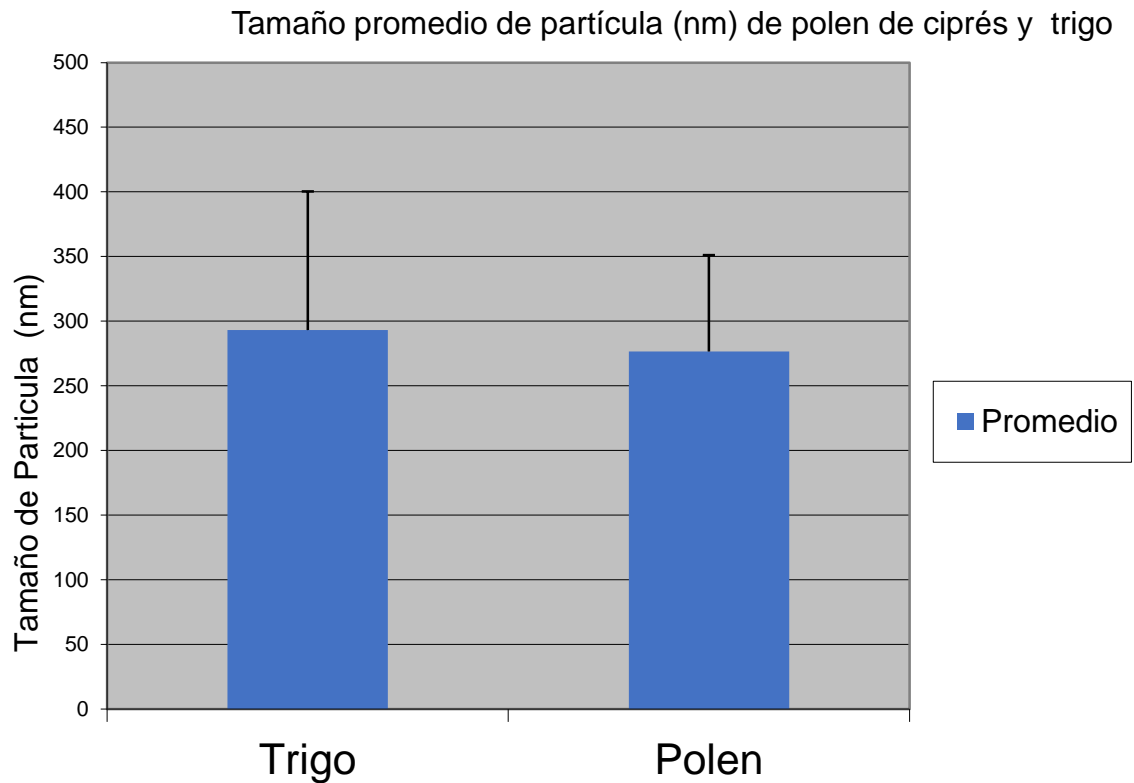


Figura 6: Tamaño promedio de partícula (nm) de polen de ciprés y trigo.

La diferencia entre el promedio de tamaño de las dos moléculas no es significativo en donde se obtuvo una T de .78 lo cual nos dice que el tamaño en estas es muy similar (Figura 7).

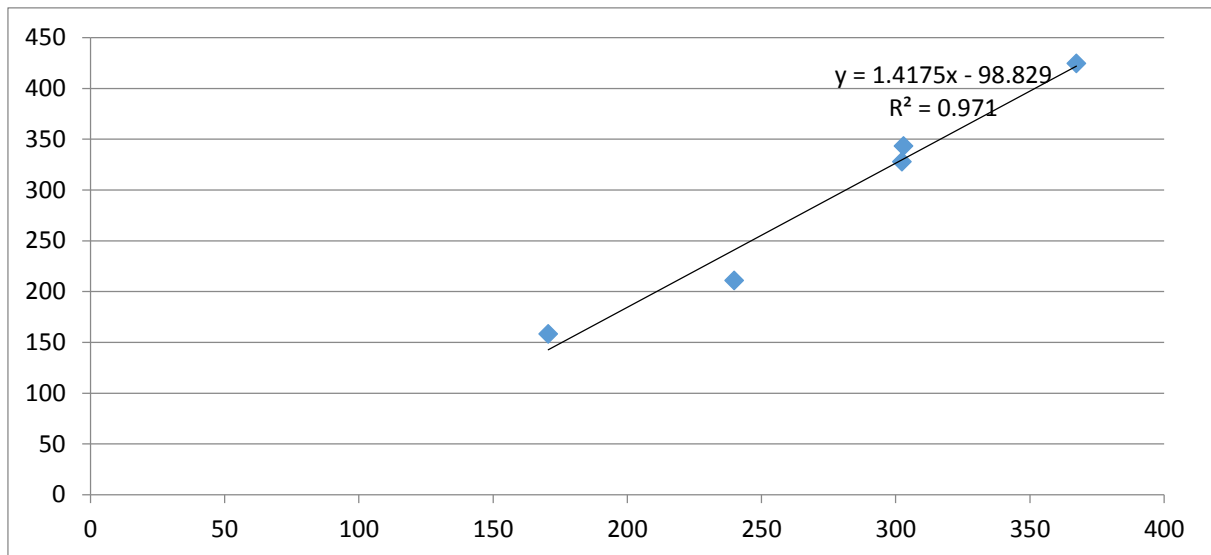


Figura 7: Diferencia entre el promedio de tamaño de las dos moléculas de trigo y polen de ciprés.

DISCUSION

En el presente trabajo se realizó la identificación de proteínas contenidas en el trigo que podrían tener potencial alergénico y que estructuralmente podrían compararse con proteínas alergénicas contenidas en los extractos de polen de *Cupressus arizonica*.

El alérgeno principal del ciprés se describe como una proteína de 43 kDa con actividad de pectatoliasa, la cual pudo identificarse por electroforesis mientras que en el presente trabajo, en la purificación de las proteínas del trigo se obtuvieron moléculas de dos tamaños en electroforesis, una en el rango de 35 a 38 kDa que podría corresponder con el alérgeno Tri a20, una gamagliadina, y una subunidad peptídica de 40 kDa, contenida en las fracciones de gluteninas de bajo peso molecular, identificada como Tri a 36 en la literatura.

A pesar de que podemos describir características comunes de los alérgenos, la biología estructural no puede aportar elementos de discriminación confiables que permitan su identificación. Al día de hoy, se reconocen dos grupos de alérgenos principales en el trigo: el primero, está representado por las proteínas contenidas en la fracción albúmina/globulina, en la que las subunidades inhibitorias de tripsina / alfa amilasa, son las más importantes. El segundo grupo de alérgenos de trigo está representado en la fracción del gluten,

constituido por proteínas monoméricas. Hasta ahora, poco se conoce sobre el potencial alergénico de las gluteninas, proteínas poliméricas formadas por subunidades peptídicas de alto (HMW) y bajo (LMW) peso molecular unidas a puentes disulfuro. Una subunidad de glutenina de 42-kDa se ha descrito como el alérgeno principal en los pacientes con síntomas gastrointestinales tras la ingesta de trigo, el cual corresponde al alérgeno Tri a36 descrito en la literatura. Sin embargo, la actividad de unión a IgE deberá probarse.

La utilización de herramientas bioinformáticas disponibles para clasificar las proteínas en familias sobre la base de sus secuencias de aminoácidos compartidos y la posibilidad de evaluar su estructura tridimensional se encuentran disponibles en varias bases de datos de familias de proteínas, incluyendo Pfam. Un enfoque bioinformático estructural combinado, contribuiría al proceso de evaluación del riesgo alergénico, en particular para proteínas para las que la sensibilización se produce con las proteínas plegadas nativas. Sin embargo, cualquier tipo de análisis *in silico* tiene que ser considerado junto con otros factores. Tenemos que ampliar la imagen hacia factores que induzcan el proceso de cambio (Th2 e IgE) con una variedad de temas relacionados con el paciente (carga genética) y la función intrínseca del alérgeno sino también con una variedad de factores ambientales, tanto antropogénicos como biogénicos, que ocurren con la exposición al alérgeno, tales como la exposición al polen, los hábitos alimenticios, el efecto de la elaboración de alimentos, y la matriz, y los factores individuales, incluyendo antecedentes genéticos, que pueden predisponer a los individuos vuelvan alérgicos (Jenkins et al. 2005; Traidl-Hoffmann et al. 2009; Ivanciuc, Garcia, et al. 2009; Powe et al. 2013)

En años recientes, una variedad de proteínas PR y sus homólogos, causantes de alergia en humanos, han sido aisladas y caracterizadas. Las proteínas PR principalmente se han asociado con un alto grado de reactividad cruzada por su homología estructural. Evaluar la estructura y el papel de los miembros de estas proteínas en la alergenicidad nos permitiera entender la reactividad cruzada y explicara las diferencias en la frecuencia de sensibilización y severidad de alergenicidad en individuos sensibilizados (Sinha et al. 2014).

La dispersión de luz dinámica es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica. Las aplicaciones típicas son la caracterización de partículas o moléculas en suspensión ya que, debido al movimiento browniano, la luz láser se dispersa en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano, y por tanto del tamaño de la partícula mediante la relación de Stokes-Einstein.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. k, Lichtman, A.H. & Pillai, S., 2012a. Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias. In Elsevier, ed. *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: Elsevier Inc., p. 2,3.
- Abbas, A. k, Lichtman, A.H. & Pillai, S., 2012b. Relaciones entre estructura y función en las moléculas de anticuerpo. In Elsevier, ed. *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: Elsevier Inc., p. 103.
- Alden Green, A. & Hughes, W.L., Protein Fraction on the Basis of Solubility in Aqueous solutions of Salts and Organic Solvents. In *Protein Fraction by solubility*. pp. 67–90.
- Asero, R. et al., 2009. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(4), pp.547–55. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220321> [Accessed May 8, 2014].
- Asero, R., 2011a. Introductory lecture: Pollen food allergy syndrome. *Clinical and Translational Allergy*, 1(Suppl 1), p.S35.
- Asero, R., 2011b. Lipid transfer protein cross-reactivity assessed in vivo and in

- vitro in the office: pros and cons. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 21(2), pp.129–36. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21462803>.
- Asero, R., 2011. Lipid transfer protein cross-reactivity assessed in vivo and in vitro in the office: pros and cons. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 21(2), pp.129–36. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21462803>.
- Bartra, J. et al., 2009. From pollinosis to digestive allergy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 19 Suppl 1, pp.3–10.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476048>.
- Berkner, H. et al., 2014. Enlarging the toolbox for allergen epitope definition with an allergen-type model protein. *PLoS ONE*, 9(10), pp.16–19.
- Burney, P.G.J. et al., 2014. The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy*, 69(3), pp.365–71. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372074> [Accessed April 28, 2014].
- Chapman, M.D. et al., 2007. Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 119(2), pp.414–20.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17166572> [Accessed June 7, 2014].
- Charpin, D. et al., 2005. Allergy to cypress pollen. *Allergy*, 60(3), pp.293–301.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15679713> [Accessed May 8, 2014].
- Christensen, M.J. et al., 2014. Patterns of suspected wheat-related allergy: a retrospective single-centre case note review in 156 patients. *Clinical and translational allergy*, 4(1), p.39. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4405838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Cianferoni, A. & Spergel, J.M., 2009. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 58(4), pp.457–466. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847094>.

Cuadros-Moreno, A. et al., 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8(4), pp.4314–1.

Demoly, P. et al., 2014. Global Atlas of Global Atlas of ALLERGY. In C. A. Akdis & I. Agache, eds. *Global Atlas of allergy*. European Academy of allergy and clinical Immunology. Available at: www-eaaci.org.

Drossman, D. a & Dumitrascu, D.L., 2006. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, 15(3), pp.237–41. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013448>.

Duarte-Vazquez, M., 1999. *Extracción, purificación y caracterización de peroxidases de nabo (Brassica napus L. var. esculenta D.C.) y estudios de su extracción usando micelas inversas*. Universidad Autónoma de Querétaro.

Duarte-Vázquez, M.A. et al., 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. Var. Purple top white globe) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), pp.4450–4456.

Ebner, C., Hoffmann-Sommergruber, K. & Breiteneder, H., 2001. Plant food

- allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy*, 56 Suppl 6(7), pp.43–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298007>.
- Fernandez-Rivas, M., 2009. Food allergy in Alergológica-2005. *Journal of investigational allergology & clinical immunology : official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, 19 Suppl 2, pp.37–44.
- Fernández-Rivas, M., 2003. Reactividad cruzada en frutas y vegetales. *Allergologia et immunopathologia*, 31(3), pp.141–6.
- Fernández, E. & Galván, A., 2004. Métodos para la cuantificación de proteínas. In N. A. Diaz et al., eds. *Prácticas generales de Bioquímica y Biología Molecular*. Córdoba, España: universidad de Córdoba, pp. 1–7.
- Flores, E. et al., 2012. Plant food allergy in patients with pollinosis from the Mediterranean area. *International archives of allergy and immunology*, 159(4), pp.346–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832505> [Accessed May 8, 2014].
- Gadermaier, E., Flicker, S. & Lupinek, C., 2013. Determination of allergen specificity by heavy chains in grass pollen allergen – specific IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), pp.1185–1193.
- GE healthcare Bio-sciences, 2007. *Protein purification handbook AC.*, Sweden: Amersham Biosciences. Available at: www.amershambiosciences.com.
- Giangrieco, I. et al., 2012. Allergens in allergy diagnosis: a glimpse at emerging new concepts and methodologies. *Translational medicine @ UniSa*, 4(3), pp.27–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Gouitaa, M. et al., 2005. Personal risk factors for cypress pollen allergy. *Allergy*, 60(4), pp.533–5. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727590> [Accessed May 8, 2014].
- Gunawan, H. et al., 2008. Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 57(1), pp.83–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209508>.
- Hauser, M. et al., 2010. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 6(1), p.1. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2830198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Mills, E.N.C. & Vieths, S., 2008. Coordinated and standardized production, purification and characterization of natural and recombinant food allergens to establish a food allergen library. *Molecular nutrition & food research*, 52 Suppl 2, pp.S159-65. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19031434> [Accessed May 8, 2014].
- Ibañez, M. & Garde, J.M., 2009. Allergy in Patients Under Fourteen Years of Age in Alergológica 2005. *J Investig Allergol Clin immunol*, 19(suppl 2), pp.61–68.
- INE, 2002. Cambio de uso del suelo y vegetación, 2000. *INE; SEMARNAT; UNAM*. Available at: http://mapas.inecc.gob.mx/#!/page_vegetacion.
- Ivanciuc, O., Garcia, T., et al., 2009. Characteristic motifs for families of allergenic proteins. *Mol Immunol*, 46(4), pp.559–568.
- Ivanciuc, O., Schein, C.H., et al., 2009. Structural analysis of linear and

- conformational epitopes of allergens. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 54(3 suppl), pp.1–19.
- Jenkins, J. a. et al., 2005. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An in silico analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), pp.163–170.
- Jesenak, M. et al., 2008. Food allergens and respiratory symptoms. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 6, pp.311–20. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218655>.
- Jockush, B., Murk, K. & Rothkegel, M., 2007. The profile of profilins. *Review in physiological Biochemistry Pharmacology*, 159(August), pp.131–149.
- Kummeling, I. et al., 2009. The EuroPrevall surveys on the prevalence of food allergies in children and adults: background and study methodology. *Allergy*, 64, pp.1493–1497.
- Landa-Pineda, C.M., 2010. *Aislamiento, caracterización molecular de la profilina del polen de Amaranthus palmeri e importancia como alergeno*. Insituto Politécnico Nacional.
- Landa-Pineda, C.M. et al., 2013. Profilinas: alergenos con relevancia clínica. *Revista alergia Mexico*, 60, pp.129–143.
- Larenas-Linemann, D., Guidos-Fogelbach, G.A. & Arias-Cruz, A., 2008. Patrones de práctica de alergólogos mexicanos en cuanto a pruebas cutáneas con alergenos durante 2005-2006. *Revista Alergia Mexico*, 55(1), pp.10–17.
- Larenas-Linnemann, D.E. et al., 2011. Patterns of skin prick test positivity in allergic patients: usefulness of a nationwide SPT chart review. *Allergologia*

- et immunopathologia*, 39(6), pp.330–6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216084> [Accessed May 8, 2014].
- Luque Piñana, V. de, 2011. *Estudio Observacional, Prospectivo y Transversal para Valoración de la Relevancia Clínica del Panalérgeno Profilina en pacientes polínicos polisensibilizados [Recurso electrónico] / Virginia de Luque Piñana ; [Directores] José Conde Hernández, Pedro Guard.* Universidad de Sevilla,. Available at:
http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2405830__SDisnea__Orightresult__U?lang=spi&suite=cobalt.
- Maeda, N. et al., 2010. Correlation of oral allergy syndrome due to plant-derived foods with pollen sensitization in Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 104, pp.205–210.
- Marrugo, J., Hernández, L. & Villalba, V., 2008. Prevalence of self-reported food allergy in Cartagena (Colombia) population. *Allergologia et immunopathologia*, 36(6), pp.320–4. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150030>.
- Medina-Hernández, A., 2009. *Reactividad cruzada polen cipres y plantas alimenticias en Queretaro*. University of queretaro.
- Morita, E. et al., 2012. Prevalence of wheat allergy in Japanese adults. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 61(1), pp.101–5. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377522>.
- Nehete, J.Y. et al., 2013. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), pp.107–16. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3841988&tool=p>

mcentrez&rendertype=abstract [Accessed August 15, 2014].

Okamoto, Y. et al., 2009. Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 58(2), pp.155–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307773>.

Pastorello, E.A. et al., Food and drug reactions and anaphylaxis Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 ° C , as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind , placebo-.

Pastorello, E. a. et al., 2007. Wheat IgE-mediated food allergy in european patients: ??-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins - Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *International Archives of Allergy and Immunology*, 144, pp.10–22.

Pastorello, E., Scibilia, G. & Farioli, L., 2011. Wheat and maize allergy: which allergens are involved and relationship with symptoms severity. *Clinical and Translational Allergy*, 1(Suppl 1), p.S57. Available at: <http://www.ctajournal.com/content/1/S1/S57> [Accessed August 20, 2014].

Pomés, A., 2008. Allergen structures and biologic functions: the cutting edge of allergy research. *Current allergy and asthma reports*, 8(5), pp.425–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682111>.

Poulsen, L.K. et al., 2014. Sensitizing properties of proteins: executive summary. *Clinical and translational allergy*, 4(1), p.10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3989794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Powe, T.D. et al., 2013. Assessment of 3D models for allergen research. *Proteins*, 81(4), pp.545–554.
- Puc, M., 2003. Characterisation of pollen allergens. *Ann Agric Envirom Med*, 10, pp.143–149.
- Radauer, C. et al., 2014. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, 69(4), pp.413–419. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/all.12348> [Accessed May 13, 2014].
- Radauer, C. & Breiteneder, H., 2007. Evolutionary biology of plant food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(3), pp.518–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689599> [Accessed May 24, 2014].
- Ring, J. et al., 2012. Davos declaration: allergy as a global problem. *Allergy*, 67(2), pp.141–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235793> [Accessed June 2, 2014].
- Rodríguez-Ortiz, P.G. et al., 2009. Epidemiological characteristics of food-allergic patients treated at the Regional Center of Allergy and Clinical Immunology of Monterrey. *Revista Alergia Mexico*, 56(6), pp.181–187.
- Roulias, a et al., 2014. Differences in the intrinsic immunogenicity and allergenicity of Bet v 1 and related food allergens revealed by site-directed mutagenesis. *Allergy*, 69(2), pp.208–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24224690> [Accessed May 15, 2014].
- Salcedo, G. & Quirce, S., 2011. Wheat Allergens Associated With Baker ' s Asthma. *J Investig Allergol Clin immunol*, 21(2), pp.81–92.
- Sánchez-Zauco, N.A., Giono-Cerezo, S. & Maldonado-Bernal, C., 2010.

- Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. *Salud Pública de México*, 52(5), pp.447–454. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000500012&lng=es&nrm=iso&tlng=es [Accessed June 20, 2014].
- Sapone, A. et al., 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC medicine*, 10(1), p.13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3292448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 13, 2014].
- Shahali, Y. et al., 2007. Comparative study of the pollen protein contents in two major varieties of *Cupressus arizonica* planted in Tehran. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 6(3), pp.123–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893432>.
- Shahali, Y. et al., 2010. IgE Reactivity to Common Cypress (*C. sempervirens*) Pollen Extracts: Evidence for Novel Allergens. *World Allergy Organization Journal*, 3(8), pp.229–234. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651100&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sin, A.Z. et al., 2008. Prevalence of cypress pollen sensitization and its clinical importance in Izmir, Turkey, with cypress allergy assessed by nasal provocation. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 18(1), pp.46–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361102>.
- Sinha, M. et al., 2014. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*, 2014.

- Sposato, B. et al., 2014. Cypress Pollen: An unexpected Major Sensitizing Agent in Different Regions of Italy. *J Invest*, 24(1), pp.23–28. Available at: <http://www.jiaci.org/issues/vol24issue1/3.pdf> [Accessed June 14, 2014].
- Steckelbroeck, S., Ballmer-weber, B.K. & Vieths, S., 2008. Potential , pitfalls , and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), pp.1323–1330.
- Tatham, A.S. & Shewry, P.R., 2008. Allergens to wheat and related cereals. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(11), pp.1712–1726.
- Togawa, A. et al., 2008. Identification of Italian cypress (*Cupressus sempervivens*) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity. *Ann Allergy Asthma immunol*, 97(3), pp.336–342.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T. & Behrendt, H., 2009. Determinants of allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123(3), pp.558–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152966> [Accessed June 10, 2014].
- Valenta, R. et al., 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of experimental medicine*, 175(2), pp.377–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Valero, J., 2012. Dispersion de luz. In *universidad de Granada*. pp. 1–5.
- Vieths, S. & Hoffmann-Sommergruber, K., 2008. Editorial. *Molecular nutrition & food research*, 52(S), pp.157–158.
- Vieths, S., Scheurer, S. & Ballmer-Weber, B.K., 2002. Current understanding of

- cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964(0), pp.47–68. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023194>.
- Vrtala, S. et al., 1993. Properties of tree and grass pollen allergens: Reinvestigation of the Linkage between Solubility and Allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol*, 102, pp.160–169.
- Wang, J. & Sampson, H. a, 2009. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy, asthma & immunology research*, 1(1), pp.19–29. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 8, 2014].
- Wiedemann, P. et al., 1996. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *The Journal of biological chemistry*, 271(47), pp.29915–29921.
- Williams, A., 2001. Overview of conventional chromatography. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 8, p.Unit8.1.
- Zuidmeer, L. et al., 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121(5), p.1210–1218.e4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378288> [Accessed May 8, 2014].