



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Posgrado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Química

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS PRESENTES
EN GUANTES DE LÁTEX PARA CIRUJANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Christian Galicia Díaz Santana

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Adela Rodríguez Romero
Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Dr. Abraham Landa Piedra
Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F., MAYO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO DE QUÍMICA



PDCB/grad/046/Jur/2015

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM

Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión 361^a del 25 de febrero de 2015 designó el siguiente jurado para examen de DOCTOR EN CIENCIAS de CHRISTIAN GALICIA DIAZ SANTANA, con número de cuenta 410042335, con la tesis titulada "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS PRESENTES EN GUANTES DE LATEX PARA CIRUJANO", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero

Presidente: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Secretario Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Vocal: Dr. Enrique Ortega Soto
Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla
Vocal: Dr. Alfredo Torres Larios

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, a 25 de febrero de 2015

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁQUEZ
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD

c.c.p. Expediente alumno

Teléfonos: 56-23-70-01

<http://www.pdcB.unam.mx> E-mail: pdcB@servidor.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mi tutor, la Dra. Adela Rodríguez Romero por guiar este proyecto.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por su apoyo en biología molecular.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández que contribuyó de forma importante a este proyecto.

Al comité tutor: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares y Dr. Abraham Landa Piedra por sus enseñanzas y sugerencias a lo largo del doctorado.

A la Quím. Eréndira García Ríos, a la QFB María del Rocío Patiño Maya y a la M. en C. Georgina Espinoza Pérez por su apoyo técnico.

A los miembros del jurado para el examen de grado por sus comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo constante.

Al CONACYT por la beca doctoral 376038 y por los proyectos 82947 y 166472.

A la DGAPA-UNAM por el proyecto PAPIIT IN207613.

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).

Al campo experimental El Palmar, Tezonapa, Veracruz.

ABREVIATURAS

APM	Fracción de alto peso molecular
BPM	Fracción de bajo peso molecular
ConA	Concanavalina A
(GlcNAc)₃	N-acetil-quitotriosa
gHev b 2	Hev b 2 purificado a partir de guantes
gHev b 6.02	Hev b 6.02 purificado a partir de guantes
IgE	Inmonoglobulinas de tipo E
LC/ESI-MS/MS	Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas por electrospray en tándem
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (por las siglas en inglés de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight)
nHev b 2	Hev b 2 purificado a partir de la fuente natural
nHev b 6.02	Hev b 6.02 purificado a partir de la fuente natural
NOESY	Espectroscopía del efecto Overhauser nuclear (por las siglas en inglés de Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
TEV	Proteasa del virus de mosaico del tabaco (por las siglas en inglés de Tobacco etch virus)
TOCSY	Espectroscopía de correlación total (por las siglas en inglés de TOfal Correlated SpectroscopY)
TOU	Tiourea

RESUMEN

El látex o hule natural se obtiene del árbol *Hevea brasiliensis* y es utilizado en la manufactura de una gran variedad de productos. Muchas de las proteínas presentes en el látex ocasionan reacciones alérgicas a personas susceptibles, principalmente por el uso de equipo médico fabricado a partir de este material como son los guantes para cirujano. Reportes recientes indican que la prevalencia de la alergia al látex es de 3-17% en el personal médico y 40-50% en pacientes con múltiples operaciones quirúrgicas, como es el caso de niños con espina bífida. En nuestro laboratorio, algunas de estas proteínas (alérgenos) han sido caracterizadas y reportadas sus estructuras cristalográficas.

El proceso de manufactura de guantes de látex incluye procesos químicos a temperaturas de más de 100°C, lo que puede modificar la integridad y estructura de proteínas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar a los alérgenos presentes en guantes de látex para cirujano, determinar su integridad estructural y su capacidad para ser reconocidas por IgE de sueros de pacientes alérgicos en comparación con los alérgenos no procesados.

Varias de las proteínas alérgicas del látex fueron identificadas en guantes. Por primera vez se aislaron algunos de los alérgenos a partir de este producto y se caracterizaron sus propiedades estructurales. Algunas de estas proteínas se encontraron fragmentadas, como es el caso de Hev b 2 (β -1,3-glucanasa). Estos fragmentos se mantuvieron glicosilados y fueron reconocidos por IgE de pacientes alérgicos. Otro alérgeno, Hev b 6.02 (heveína), se mantuvo estructuralmente íntegro, lo cual se determinó al resolver su estructura por cristalografía de rayos X a una resolución de 1.43 Å. El reconocimiento del alérgeno purificado de guantes por IgE de pacientes alérgicos es mayor comparado con el de la proteína no procesada. Ésto se atribuyó a un compuesto que interacciona con la proteína y que se observa en su estructura cristalográfica.

ABSTRACT

Natural Rubber Latex is obtained from the *Hevea brasiliensis* tree and it is used for the manufacture of a variety of products. Many of the proteins present in NRL may lead to an allergic reaction, mainly through the use of medical equipment such as surgery gloves. Recent reports indicate a NRL allergy prevalence of 3-17% for health care workers and 40-50% for patients with multiple surgical interventions as in the case of children with spina bifida. In our laboratory some of these proteins (allergens) have been characterized and their structures were reported.

Chemical processes at temperatures over 100°C are part of the manufacture of latex gloves, which potentially modifies the structure of an allergen. Therefore, the purpose of this work is to characterize the allergens present in NRL gloves, and to determine their structural integrity and their ability to be recognized by IgE in allergic patients sera, in comparison with the natural non-processed allergens.

Many of the known allergens of *H. brasiliensis* were identified in the gloves. For the first time some of these proteins were isolated from this product and structurally characterized. Some of the allergens were in fragmented form, such as Hev b 2 (β -1,3-glucanase). In this case, the fragments maintained glycosylations and were recognized by IgE from allergic patients. A different allergen, Hev b 6.02 (hevein) maintained its original structure, as determined by X-ray crystallography at a 1.43 Å. IgE from allergic patients showed greater recognition to this allergen when compared to the non-processed protein. This was attributed to a compound interacting with the protein that can be observed in the crystallographic structure.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Alergia o hipersensibilidad de tipo I.....	1
1.2 Estructura y modificación de alérgenos.....	3
1.3 Alergia a látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	5
II. ANTECEDENTES.....	8
III. HIPÓTESIS.....	11
IV. OBJETIVOS.....	11
4.1 Objetivo general.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
V. MÉTODOS.....	12
5.1 Extracción de proteínas a partir de guantes de látex.....	12
5.2 Cuantificación de proteína.....	13
5.3 Electroforesis en geles SDS-PAGE.....	13
5.4 Identificación de proteínas utilizando cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas por electro spray en tándem (<i>LC/ESI-MS/MS</i>).....	14
5.5 Purificación de un fragmento de Hev b 14 (hevamina).....	15
5.6 Purificación de Hev b 2 (β -1,3-glucanasa) a partir de guantes.....	15
5.7 Purificación de Hev b 6.02 (heveína) a partir de guantes.....	16
5.8 Purificación de Hev b 6.02 y Hev b 2 a partir de la fuente natural.....	16
5.9 Experimentos de dicroísmo circular en el UV lejano (DC).....	17
5.10 Estudios de interacción proteína – carbohidrato por fluorescencia.....	18
5.11 Determinación de la masa molecular usando espectrometría de masas MALDI-TOF.....	18
5.12 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) de gHev b 6.02 y nHev b 6.02.....	19
5.13 Cristalización y colecta de datos de difracción de rayos X de gHev b 6.02.....	20
5.14 Solución de las fases por SAD y afinamiento de la estructura.....	21
5.15 Experimentos de ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima) con IgE de suero de pacientes alérgicos.....	21
5.16 Síntesis de cADN y amplificación del gen de tiorredoxina h de <i>H. brasiliensis</i>	23
5.17 Clonación y expresión de la tiorredoxina h de <i>H. brasiliensis</i>	24
5.18 Purificación de tiorredoxina h de <i>H. brasiliensis</i>	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1 Extracción, purificación e identificación de alérgenos a partir de guantes de látex.....	27
6.2 Purificación e identificación de un fragmento de Hev b 14 (hevamina) presente en guantes.....	30
6.3 Caracterización de Hev b 2 (β -1,3-glucanasa) presente en guantes.....	31
6.4 Reconocimiento de gHev b 2 y nHev b 2 por IgE de suero de pacientes.....	34
6.5 Purificación y caracterización de Hev b 6.02 (heveína) presente en guantes.....	35
6.6 Reconocimiento de gHev b 6.02 y nHev b 6.02 por IgE.....	37
6.7 Ensayos de unión de Hev b 6.02 a (GlcNAc) $_3$	38
6.8 Caracterización estructural de gHev b 6.02 por RMN.....	40
6.9 Caracterización estructural de gHev b 6.02 por cristalografía.....	41
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	50
ANEXO.....	55

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Alergia o hipersensibilidad de tipo I

Las hipersensibilidad de tipo I, según la clasificación de Gell y Coombs de 1963, es una reacción inmune provocada por la reexposición a un antígeno específico y se caracteriza por estar mediada por inmunoglobulinas de tipo E (IgE). En la actualidad, el término alergia se refiere sólo a este tipo de hipersensibilidad y los antígenos involucrados se denominan alérgenos (Abbas et al., 2011). Los alérgenos son proteínas que forman parte de plantas y otros organismos, cumpliendo diversas funciones biológicas o, en algunos casos, son compuestos químicos que al unirse a una proteína portadora se convierten en material inmunogénico. Dichos compuestos se denominan haptenos y el caso más conocido es el de la penicilina, que se une a los grupos aminos libres de las proteínas, como los de lisina (Padovan et al., 1996).

Los alérgenos son moléculas inocuas para la población en general, por lo tanto, la hipersensibilidad de tipo I está ligada a una predisposición genética por parte de los individuos que la padecen (Blumenthal, 2004). En la **Figura 1** se muestran los eventos que ocurren a nivel celular cuando un individuo con esta predisposición reacciona frente a un alérgeno. Cuando el individuo se expone por primera vez al antígeno ocurre una fase de sensibilización, que es característica de este tipo de hipersensibilidad y durante la cual no se presentan síntomas. Las vías de exposición incluyen la piel (cutánea), vías respiratorias, por ingestión y por mucosas. Una vez en el organismo, el alérgeno es capturado por células dendríticas, las cuales digieren y presentan el antígeno a los linfocitos T cooperadores, generando una respuesta tipo Th2. Las

células B también procesan y presentan el antígeno a los linfocitos T, ya diferenciados como Th2, quienes por medio de citocinas como la interleucina 4 (IL-4), estimulan a la célula B a proliferar y cambiar el isotipo de sus inmunoglobulinas a IgE. Tras la proliferación de estas células, se produce una gran cantidad de IgE específicas para el alérgeno en cuestión; éstas se fijan a los receptores de alta afinidad FcεRI en la superficie de mastocitos principalmente, a través de su dominio Fcε. Tras este suceso, el individuo está sensibilizado y en una segunda exposición al mismo alérgeno, los complejos FcεRI-IgE lo reconocen y se produce un entrecruzamiento, provocando la desgranulación de los mastocitos, que liberan mediadores de la inflamación, como la histamina y prostaglandinas, que producen los síntomas característicos de inflamación. Según la Organización Mundial de la Salud, las alergias han ido en aumento durante los últimos 50 años, siendo los niños los principales afectados. Los síntomas relacionados con alergias incluyen asma, rinitis, urticaria, choque anafiláctico, entre otros (Abbas et. al., 2007).

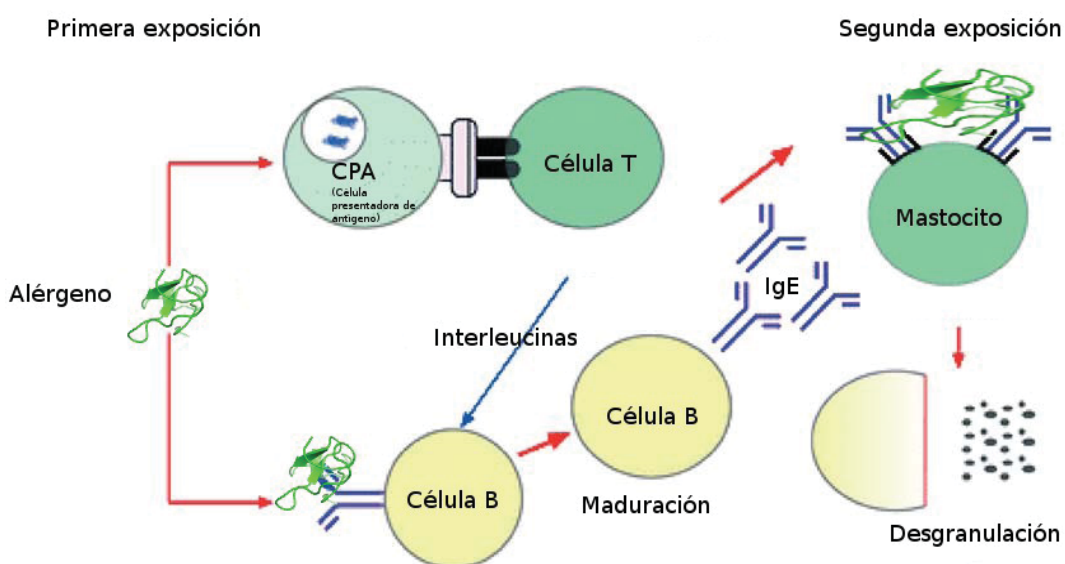


Figura 1. Esquema de la secuencia de eventos en la hipersensibilidad de tipo 1. Modificado de Bannon, 2005.

1.2 Estructura y modificación de alérgenos

Las proteínas alergénicas tienen regiones inmunodominantes llamadas epítomos, que son las zonas de reconocimiento de las inmoglobulinas. Algunos epítomos son regiones lineales en la cadena polipeptídica, mientras que otros involucran zonas en la superficie de la molécula que, aunque no son consecutivas en la secuencia, se forman cuando la proteína adquiere su conformación tridimensional. Estos últimos se denominan epítomos conformacionales y se ha reportado que las IgE reconocen éstos principalmente (Roggen, 2006; Sun et al., 2013). Por lo tanto, si se modifica la estructura de la proteína, se pueden destruir epítomos o formarse nuevos. En algunos casos, los materiales o alimentos portadores de alérgenos requieren de uno o varios procesos para su presentación o consumo final, lo que puede dar lugar a la modificación estructural de los mismos.

En el caso de los alimentos, el efecto de los procesamientos está bastante estudiado, ya que es común que algunos de éstos, como carnes o semillas, sean sometidos a varios tratamientos que pueden modificar la estructura de las proteínas alergénicas contenidas en ellos. El proceso principal es la cocción, que es un tratamiento térmico que desnaturaliza a la mayoría de las proteínas. Cualquier otro proceso, incluyendo el almacenamiento, puede modificar el potencial alergénico del producto final (Osterballe et al., 2005). Las modificaciones más comunes que sufren las proteínas en los alimentos son las producidas por glicaciones no enzimáticas también denominadas reacciones de Maillard, que dan a lugar a productos de glicación avanzada (AGE). Las glicaciones son un conjunto complejo de reacciones químicas que se favorecen en presencia de calor. Éstas son el resultado de la unión covalente, no enzimática, de un azúcar con los grupos

aminos de las proteínas, ya sea de cadena lateral o del amino terminal (Thorpe and Baynes, 2003). Es importante señalar que en esta reacción se pueden afectar epítomos conformacionales y lineales, por lo que se ha reportado que estas modificaciones son relevantes en la alergenicidad de los productos (Davis et al., 2001). El ejemplo más representativo es el del cacahuate, en el que dependiendo del tipo de tratamiento térmico que se le dé, ya sea hervido o rostizado, su alergenicidad disminuye o aumenta respectivamente (Blanc et al., 2011). Otro ejemplo es el huevo: en estudios recientes se ha mostrado que la alergenicidad de este alimento disminuye tras un tratamiento térmico extensivo (Ma et al., 2013). El tratamiento térmico de una proteína genera un desplegamiento inicialmente reversible y eventualmente irreversible. Los cambios que se pueden generar incluyen agregación, ya sea consigo misma o con otras proteínas, rearreglo de los puentes disulfuros y modificación de las cadenas laterales. Después de un tratamiento térmico, las proteínas pueden conservar, en mayor o menor grado, el plegamiento original, o bien pueden plegarse nuevamente, con una conformación diferente a la nativa. Por ejemplo, si los grupos hidrofóbicos quedan expuestos, se pueden formar agregados por interacciones hidrofóbicas o de apilamiento de aminoácidos aromáticos, o bien, tras la reducción de puentes disulfuro se pueden formar nuevos puentes, distintos a los originales, ya sea intra- o inter-moleculares, lo que también puede dar lugar a la agregación proteica (Boye et al., 1997; Davis and Williams, 1998).

El hule o caucho natural también es una fuente importante de proteínas alergénicas. Para la fabricación de productos a partir de esta materia prima, el látex se colecta del árbol y se preserva en amoniaco para prevenir su coagulación (Spengler et al., 2001). Durante su procesamiento se utilizan compuestos antioxidantes, como las aminos aromáticas, aceleradores de la vulcanización como el tiuram y otros agentes vulcanizantes como el azufre, además de altas temperaturas que van de los 100 a los 200°C (Long, 2001; Mcglothlin and Schmid, 2001;

Yunginger, 2004). A pesar de este tipo de procesos drásticos, los alérgenos del látex son capaces de ocasionar síntomas en algunos individuos cuando se ponen en contacto con los productos manufacturados con este material.

1.3 Alergia a látex de *Hevea brasiliensis*

El hule natural se obtiene del látex del árbol *Hevea brasiliensis* y se estima que a partir de éste se producen alrededor de 40 mil productos de uso general; entre los que destacan los productos de uso médico como guantes, debido a que este material funciona como una excelente barrera biológica, además de mantener muy buena sensibilidad para el usuario. Las células laticíferas de *H. brasiliensis* contienen, además del isopreno (moléculas que forman el hule), una gran cantidad de proteínas, muchas de las cuales son capaces de provocar una reacción alérgica (Palosuo et al., 2011). A la fecha, 15 de éstas han sido clasificadas como alérgenos y se les ha asignado una nomenclatura oficial por parte de la unión internacional de sociedades inmunológicas (IUIS, por sus siglas en inglés), la cual está formada por las primeras tres letras del género y la primera letra de la especie y números consecutivos de acuerdo al orden en que fueron clasificados [<http://www.allergen.org>]. Estas 15 proteínas alergénicas, cuyos pesos moleculares varían entre 4.7 y 55 kDa, está involucradas en diversas funciones en la planta, como los mecanismos de defensa ante patógenos y la biosíntesis del hule, principalmente (**Tabla 1**).

A partir de la década de los noventa aumentó drásticamente el número de reportes de personas que desarrollaban alergia a productos de hule natural, debido principalmente al incremento en el uso de guantes por parte del personal médico, con el fin de evitar contagios por virus como los de hepatitis y el VIH. De esta forma, el personal médico se convirtió en una población de riesgo (Cremer et al., 2007). También se han descrito reacciones alérgicas ante otros

Tabla 1
Alérgenos de *Hevea brasiliensis*

Nomenclatura	Nombre trivial	MM (kDa)
Hev b 1	factor de elongación del caucho	14
Hev b 2	beta-1,3-glucanasa	34
Hev b 3	proteína de partícula pequeña del hule	24
Hev b 4	lecitinasas	53-55
Hev b 5	proteína ácida	16
Hev b 6	precursor de heveína	20
Hev b 6.02	heveína	4.7
Hev b 7	proteína homóloga a patatina	42
Hev b 8	profilina	15
Hev b 9	enolasa	51
Hev b 10	Mn superóxido dismutasa	26
Hev b 11	endoquinasa clase I	30
Hev b 12	proteína de transferencia de lípidos	9
Hev b 13	esterasa	42
Hev b 14	hevamina	30
Hev b 15	inhibidor de serín proteasa	7.5

productos de uso médico, como sondas, torniquetes y catéteres, siendo las personas más afectadas aquellas con múltiples operaciones quirúrgicas, en especial niños con espina bífida. Los síntomas de este tipo de alergia pueden incluir dermatitis, fiebre, asma, congestión nasal, urticaria y en raros casos choque anafiláctico; éstos suelen progresar rápidamente y el paciente debe recibir atención médica inmediata (Hodge and Sayers, 2013). Con el fin de disminuir el contenido de proteínas en guantes, en los últimos años se han modificado los métodos de manufactura y la presentación de los productos de hule natural, principalmente de los guantes. Los guantes libres

de talco o almidón y bajos en proteína se han asociado con un decremento de alergia al látex en el ambiente médico (Palosuo et al., 2011). Actualmente, las normas estadounidenses de la ASTM (American Society for Testing Materials) D3577 y D3578 para guantes de cirugía y de exploración, respectivamente, recomiendan que los límites de proteína extraíble en disoluciones acuosas debe ser menor a $200 \mu\text{g}/\text{dm}^2$, que corresponde aproximadamente a $50 \mu\text{g}/\text{g}$ de material. A pesar de estos controles, reportes recientes indican que la prevalencia de alergia al látex es de 3-17% para trabajadores al cuidado de la salud y de 40-50% para pacientes con múltiples operaciones, como niños con espina bífida (Amarasekera et al., 2010; Boettcher et al., 2014). Aunado a esto, se ha reportado lo que se conoce como el síndrome de látex-polen-fruta, que se produce debido a que algunos alérgenos son proteínas conservadas en plantas. Este síndrome consiste en que los pacientes que son sensibilizados con alérgenos de látex son capaces de reconocer proteínas de algunas frutas como son fresa, plátano, aguacate, kiwi, entre otras, o en caso contrario, personas que fueron sensibilizadas por pólenes o alimentos que generan una reacción ante el látex (Wagner and Breiteneder, 2002).

En la actualidad existen inmunoterapias dirigidas a pacientes con distintos tipos de alergias; el objetivo de éstas es cambiar la diferenciación de las células T de un fenotipo Th2 (relacionadas con alergia e inflamación) a uno Th1, mediante la administración de alérgenos en dosis crecientes, ya sea por vía subcutánea o sublingual. Sin embargo, estas terapias son limitadas en el caso de los pacientes con alergia al látex por la alta probabilidad de efectos colaterales, tales como asma y choque anafiláctico, probablemente debido a la gran variedad de alérgenos presentes en este material (Nettis et al., 2012).

II. ANTECEDENTES

Algunos de los alérgenos del látex han sido bien estudiados desde el aspecto inmunológico y estructural. Probablemente el más caracterizado es Hev b 6.02 o heveína, que ha sido reconocido como el principal responsable de la alergenicidad del látex (Yagami et al., 2009). Además, también se ha reportado su importancia en reactividad cruzada, seguramente debido a quitinasas de clase I, las cuales tienen un dominio tipo heveína (Chen et al., 1998). La heveína es una proteína de 43 aminoácidos que tiene la función de lectina en las plantas, su estructura cristalográfica fue reportada por primera vez en 1991 a 2.8 Å de resolución (Rodríguez-Romero, 1991). En este modelo se observó que sus ocho cisteínas forman cuatro puentes disulfuro, lo que le confiere una gran estabilidad. Posteriormente, en nuestro grupo de trabajo se obtuvo un modelo a una mayor resolución de 1.5 Å (PDB 1Q9B). En este mismo estudio se propuso un epítipo conformacional en el que participa al menos uno de los dos triptofanos de la proteína, mismos que están involucrados en el reconocimiento de azúcares en su función como una lectina. Para probar esto último, la proteína fue modificada químicamente con 3-BNPS-escatol, un compuesto que oxida el anillo indol de los triptofanos, y se demostró tanto por ELISA como por pruebas cutáneas que la proteína modificada pierde su capacidad alergénica. (Reyes-López et al., 2004).

Otro alérgeno importante es Hev b 2; esta proteína es una β -1,3-glucanasa que responde a ataques microbianos, así como a heridas en la planta. Al ser una proteína conservada en plantas, se considera uno de los principales alérgenos responsables de reactividad cruzada con polen y alimentos como el plátano (Barre et al., 2009; Palomares et al., 2005a). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó la estructura tridimensional de Hev b 2 por cristalografía de rayos

X (PDB: 4HPG); el modelo incluye dos sitios de N-glicosilación cuya estructura consiste en un grupo de manosas, así como α -1,3-fucosa unido a N-acetylglucosamina (**Figura 2**), que es una secuencia común en glicoproteínas de plantas e insectos. Además, en ese mismo estudio se determinó que estas glicosilaciones son importantes para su capacidad alergénica, ya que se demostró por experimentos de ELISA que cuando se eliminan enzimáticamente, su capacidad para unir IgE disminuye drásticamente. Por otra parte, se hicieron experimentos de desgranulación de basófilos en los que también se observó una disminución en la liberación de los gránulos cuando se estimula con el alérgeno desglicosilado, en comparación con su forma glicosilada. (Rodríguez-Romero et al., 2014).

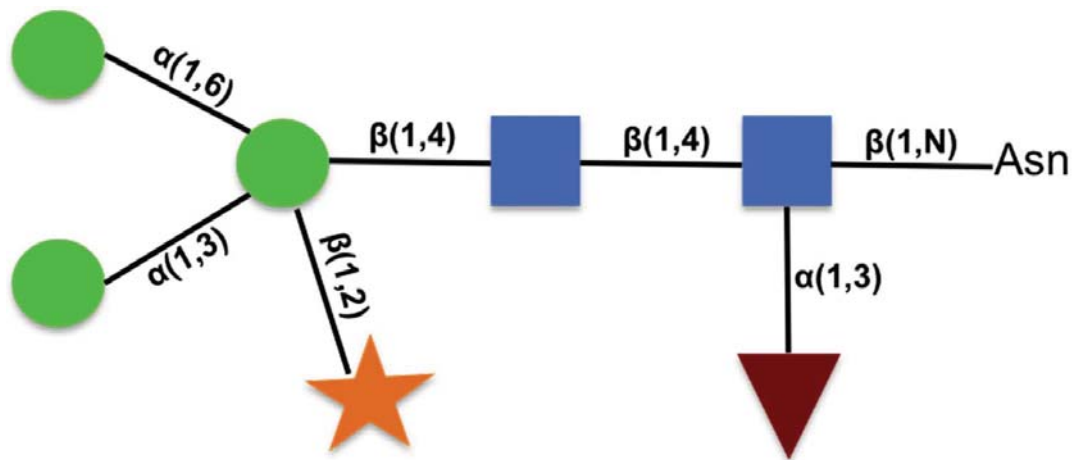


Figura 2. Patrón de glicosilación de Hev b 2 (PDB: 4HPG): GlcNAc, cuadros azules; Fucosa, triángulo rojo; manosa, círculos verdes; xilosa, estrella naranja; (Rodríguez-Romero et al., 2014).

La mayoría de los estudios que se han realizado sobre alergia al látex han sido utilizando proteínas recombinantes. En nuestro grupo de trabajo, así como algunos otros estudios, se ha trabajado con las proteínas endógenas de la planta, como es el caso de Hev b 2 y Hev b 6.02. Estas proteínas endógenas o recombinantes son las que se utilizan para diagnóstico, estudios de

prevalencia y otras investigaciones. Sin embargo, los pacientes que sufren de esta alergia lo hacen al entrar en contacto con productos manufacturados a partir de látex de *H. brasiliensis*, como se mencionó anteriormente. Akasawa y col., en 1996 realizaron un estudio interesante utilizando ensayos de ELISA de inhibición en el que compararon el reconocimiento por las IgE de una mezcla de suero de pacientes a proteínas de látex tratado con amoniaco y sin tratar. Los autores encontraron que el extracto tratado con amoniaco es capaz de inhibir al no tratado, indicando que algunos epítomos sólo se exponen tras el tratamiento. Existen algunos reportes en los que se ha corroborado la presencia de los alérgenos en productos terminados, principalmente en guantes. Los alérgenos que se han identificado a la fecha en productos manufacturados con hule son Hev b 1 (factor de elongación del hule), Hev b 2 (β -1,3-glucanasa), Hev b 3 (proteína del hule), Hev b 5 (proteína ácida), Hev b 6.01 (precursor de heveína), Hev b 6.02 (heveína), y Hev b 14 (hevamina) (Lee et al., 2010; Palosuo et al., 2011; Peixinho et al., 2013, 2012). A pesar de la identificación de estos alérgenos, poco se sabe sobre las modificaciones estructurales que pudieron haber sufrido durante el proceso de vulcanización y cómo afecta esto el reconocimiento. Es por eso que en este trabajo estamos interesados en conocer posibles diferencias conformacionales, modificaciones estructurales o fragmentación que puedan sufrir los alérgenos tras el proceso de manufactura y elucidar si ello tiene un efecto en el reconocimiento de IgE específicas de pacientes alérgicos.

III. HIPÓTESIS

El proceso de manufactura de guantes fabricados a partir de látex del árbol del hule da lugar a modificaciones estructurales o fisicoquímicas en los alérgenos presentes en este material, lo que provoca un cambio en el reconocimiento por anticuerpos IgE específicos.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar a los alérgenos contenidos en guantes de látex para cirujano y comparar su reconocimiento ante IgE de suero de pacientes alérgicos con el de los alérgenos no procesados.

4.2 Objetivos específicos

- Purificar a los alérgenos más abundantes contenidos en guantes para cirujano.
- Caracterizar a las proteínas alergénicas por métodos espectroscópicos.
- Determinar mediante pruebas de ELISA el reconocimiento de las proteínas por IgEs de sueros de pacientes alérgicos al hule.
- Obtener cristales que permitan resolver la estructura tridimensional de los alérgenos que se obtengan en mayor abundancia y pureza.

V. MÉTODOS

5.1 Extracción de proteínas a partir de guantes de látex

Se utilizaron guantes de las siguientes marcas: Dentilab, Sensimedical, Ambiderm y Protec. Para la extracción de proteínas a partir de éstos se siguió la recomendación de la norma ASTM D3577 con algunas modificaciones. Los guantes se cortaron en piezas pequeñas de aproximadamente de 1 cm² y se sumergieron en amortiguador de fosfatos salino (PBS) en una relación de 5 mL por gramo de guante y la mezcla se mantuvo en agitación durante 48 hr a 4°C. Posteriormente se filtró utilizando papel Whatman no. 2 para remover el talco y las piezas de guante, después usando un filtro Millipore con poro de 0.45 µm. Los extractos se concentraron utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte molecular de 10 kDa en un sistema Amicon (Millipore Corp., MA, EUA), obteniendo una fracción con las proteínas de mayor peso molecular a la que se le llamó APM. A la segunda fracción que contiene las proteínas menores a 10 kDa se le denominó BPM, esta fracción se concentró utilizando una membrana de ultrafiltración con corte molecular de 3 kDa. Aunque se realizaron extractos de distintas marcas de guante, las proteínas estudiadas corresponden a los guantes de marca Protec, que se seleccionó por la variedad y abundancia de proteínas alergénicas.

5.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación del alérgeno Hev b 6.02 (heveína) se llevó a cabo mediante la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu con una celda con paso de luz de 1 cm y la concentración se calculó utilizando el coeficiente de extinción de la proteína en una solución al 1% ($\epsilon^{1\%}$) de $25.4 \text{ (g/100 mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La cuantificación de otras proteínas, extractos o fracciones se estimó utilizando el ensayo del ácido bicinonínico siguiendo las recomendaciones del fabricante (BCA™, Thermo Scientific, IL, EUA).

5.3 Electroforesis en geles SDS-PAGE

El análisis SDS-PAGE de las proteínas contenidas en la fracción APM se realizó utilizando geles ya sea al 10 o 12 % de concentración de acrilamida con una fracción concentradora al inicio con 4% de acrilamida; todos los análisis se realizaron en condiciones desnaturalizantes. Antes de la migración electroforética las proteínas se prepararon en amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2.5%, azul de bromofenol 0.002%, β -mercaptoetanol 0.71 M (5%), glycerol 10%) y se calentaron por 10 minutos a 90 °C. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el “Low range-protein standard” (Bio-Rad, CA, EUA) el cual contiene fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbonica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa).

Las proteínas en la fracción BPM se analizaron por SDS-PAGE-Tricina, el gel contenía una fracción concentradora con 4% de acrilamida, una fracción espaciadora con 10% de acrilamida y una fracción separadora con 16% de acrilamida; se utilizaron condiciones

desnaturalizantes. Antes de la migración, las muestras se prepararon en amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 4%, azul de Coomasie G-250 0.01%, DTT 0.1 M, glycerol 12%) y se calentó por 10 minutos a 90 °C. Como marcador de peso molecular se utilizó el “Polypeptide standard” (Bio-Rad, CA, EUA) que contiene triosa fosfato isomerasa (26.6 kDa), mioglobina (17 kDa), α -lactoalbúmina (14.4 kDa), aprotinina (6.5 kDa), cadena b oxidada de insulina (3.5 kDa) y bacitracina (1.4 kDa).

Las proteínas en los geles resueltos se tiñeron utilizando azul de Coomasie.

5.4 Identificación de proteínas utilizando cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas por electrospray en tándem (*LC/ESI-MS/MS*)

A partir de la separación electroforética SDS-PAGE de la fracción APM, las bandas de interés se cortaron de los geles y se trataron por 5 minutos con 100 μ L de una solución desteñidora (50% (v/v) metanol, 5% (v/v) ácido acético). Tras eliminar la solución, las bandas se incubaron con bicarbonato de amonio 200 mM por 20 min., se cortaron en piezas pequeñas, se deshidrataron completamente con 100% de acetonitrilo y se secaron en vacío. Las proteínas se hidrolizaron con 30 μ L de una solución de tripsina porcina (20 ng μ L⁻¹; Promega, WI, EUA) en 50 mM de bicarbonato de amonio, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 12 hrs. Los péptidos se extrajeron con 50% (v/v) acetonitrilo y 5% (v/v) ácido fórmico por 30 minutos y se separaron por cromatografía utilizando un sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters Corporations, MA, EUA). Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas (MS/MS) en

un espectrómetro de masas en tándem híbrido 3200 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, ON, Canada), equipado con una fuente de iones nanoelectrospray (NanoSprayII) y una cabeza MicroIonSpray II. Los espectros se obtuvieron en el modo automatizado utilizando adquisición dependiente de información (IDA). La búsqueda en base de datos e identificación de proteínas se realizó con los espectros MS/MS utilizando el algoritmo de búsqueda MASCOT en la taxonomía Viridiplantae (plantas verdes) de la base de datos no redundante del NCBI (NCBIInr versión 1.6b9; Matrix Science, London, UK, disponible en <http://www.matrixscience.com>).

5.5 Purificación de un fragmento de Hev b 14 (hevamina)

La fracción APM se aplicó a una columna de exclusión molecular HiLoad Superdex 75 16/600 acoplada a un equipo FPLC (ÄKTA, GE Healthcare) utilizando un amortiguador fosfatos 20 mM pH 7.4 con 300mM de NaCl. La fracción de menor peso molecular fue colectada, y se aplicó a una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/50, acoplada al mismo equipo FPLC. Se colectó la fracción no retenida a la columna, que fue la mayoritaria. La muestra se dializó para cambiar el pH de 7.4 a 9 y se volvió realizar la cromatografía de intercambio aniónico a este pH, en el pico mayoritario estaba contenido el fragmento de Hev b 14.

5.6 Purificación de Hev b 2 (β -1,3-glucanasa) a partir de guantes

Debido a Hev b 2 es una proteína glicosilada que contiene manosas, se decidió utilizar una columna de afinidad a Concanavalina A (ConA)-Sefarosa 4B (GE Healthcare, NJ, EUA). La columna se equilibró con amortiguador ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES) 20 mM pH

6.5 y NaCl 0.5 M, este mismo amortiguador se utilizó para dializar la fracción APM y se cargó a la columna. Los péptidos retenidos se eluyeron con α -D-manopiranosido 0.5 M, contenido en el mismo amortiguador. A esta muestra purificada a partir de guantes se le denominó gHev b 2.

5.7 Purificación de Hev b 6.02 (heveína) a partir de guantes

Hev b 6.02 se purificó a partir de la fracción BPM, la cual se aplicó a una columna de fase reversa C18 (Phenomenex® Jupiter 5 μ , 300 Å), acoplada a un equipo HPLC, usando un flujo de 3.5 mL min⁻¹. Para eluir a la proteína se utilizó un gradiente de 0-60% de acetonitrilo / 0.1% TFA. El acetonitrilo fue eliminado utilizando un sistema SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, EUA). A esta proteína purificada a partir de guantes se le denominó gHev b 6.02.

5.8 Purificación de Hev b 6.02 y Hev b 2 a partir de la fuente natural

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con las proteínas procesadas con las naturales, se purificaron Hev b 2 y Hev b 6.02 a partir de lutoides (vacuolas) de látex fresco. Los lutoides se homogeneizaron con una solución 0.3 M de NaCl.

Para purificar Hev b 2, el homogeneizado se dializó contra agua destilada por 40 hrs. El precipitado que se formó se separó por centrifugación y se resuspendió en 20 mL de amortiguador MES 20 mM pH 6.5, NaCl 0.35 M. La muestra se cargó a la columna de afinidad a ConA y la proteína se eluyó con α -D-manopiranosido 0.5 M en el mismo amortiguador. Esta muestra se dializó con Tris-HCl 50 mM pH 8 y NaCl 0.1 M y se purificó a homogeneidad por cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna Resource S de 1 mL (GE

Healthcare, NJ, EUA), utilizando un gradiente lineal de 0.1 a 1 M de NaCl para eluir la proteína.

A Hev b 2 purificado de la fuente natural se le denominó nHev b 2.

Para la purificación de Hev b 6.02, el homogeneizado de lutoides se precipitó con sulfato de amonio a una saturación del 60%. El sobrenadante se separó por centrifugación y las proteínas se precipitaron a una saturación de sulfato de amonio de 100%. Este último se separó por centrifugación y se resuspendió en agua destilada, aplicándose a una columna de fase reversa C18, acoplada a un HPLC con un flujo de 3.5 mL min⁻¹. Para eluir la proteína se utilizó un gradiente de 0-60% de acetonitrilo / 0.1% TFA. El acetonitrilo fue eliminado utilizando el sistema SpeedVacTM. A Hev b 6.02 purificado de la fuente natural se le denominó nHev b 6.02.

5.9 Experimentos de dicroísmo circular en el UV lejano (DC)

Los espectros de DC se colectaron en la región del UV lejano de 200 a 260 nm, en una celda con un paso de luz de 0.1 cm, en un espectropolarímetro JASCO-J700 (Jasco Inc. MD, EUA) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier. La proteína de interés (gHev b 2 o gHev b 6.02) se dializó en un amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7.5 y se filtró con una membrana con poro de 0.22 µm. Se promediaron tres mediciones y se restó de una línea base para obtener el espectro final de la muestra. La línea base se obtuvo utilizando únicamente el amortiguador en las mismas condiciones.

5.10 Estudios de interacción proteína – carbohidrato por fluorescencia

Las curvas de emisión producidas por los triptofanos (Trp21 y Trp 23) de gHev b 6.02 y nHev b 6.02 se obtuvieron en presencia de N-acetil-quitotriosa (GlcNAc)₃. Las afinidades de unión a (GlcNAc)₃ de las muestras se determinaron registrando el cambio de fluorescencia de los triptofanos de 300 a 400 nm tras la adición del ligando, utilizando un espectrofluorómetro Olis® DM45 (Olis Inc., GA, EUA). La longitud de onda de excitación se fijó a 290 nm y la temperatura se mantuvo a 25 °C utilizando un sistema Peltier. El oligosacárido fue preparado a diferentes concentraciones en un amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7.4) con 1 mM EDTA y se adicionó en concentraciones crecientes a la solución de proteína (600 µg/mL en el mismo amortiguador). La fluorescencia emitida se midió tras 2 minutos de mezclar la solución de proteína con el ligando. Para el cálculo de las constantes de disociación (K_d) para la quitotriosa se trazaron gráficas de cambio en la intensidad de la fluorescencia, a la longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}=350 nm), contra la concentración del ligando. La curva resultante se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max} [ligando]}{K_d + [ligando]}$$

5.11 Determinación de la masa molecular usando espectrometría de masas MALDI-TOF

Para determinar las masas moleculares de las distintas muestras se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo). Los

espectros de masa se obtuvieron en modo linear para iones positivos. Las matrices utilizadas fueron ácido α -ciano-4-hidroxicinámico para las muestras de Hev b 6.02 y ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido cinapínico) para las muestras de Hev b 2, Hev b 14 y tiorredoxina.

5.12 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) de gHev b 6.02 y nHev b 6.02

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón de los alérgenos gHev b 6.02 y nHev b 6.02 se obtuvieron en un equipo Varian Inova de 500 Mhz con una sonda de detección indirecta de tres núcleos (HCN) de 3 mm. Las proteínas se prepararon a una concentración de 4 mg mL^{-1} (0.66 mM) en un amortiguador de fosfatos 150 mM, pH 6.8 con 10% D_2O a 25°C . Con el fin de investigar si el alérgeno gHev b 6.02 mantiene su estructura terciaria se obtuvieron los espectros monodimensionales ^1H y bidimensionales ^1H ^1H TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY) y NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Los espectros TOCSY se obtuvieron con un tiempo de mezclado de 70 ms y los espectros NOESY a 150 y 300 ms. Posteriormente, se cambió el pH a 2.8 con ácido trifluoroacético (TFA), debido a que se ha documentado que a este pH el extremo carboxilo terminal de la proteína está más estructurado y por lo tanto genera mejores señales en los espectros (Andersen et al., 1993), y se volvieron a obtener los espectros. Los datos fueron procesados con NMRpipe (Delaglio et al., 1995). Para la asignación de señales y análisis se utilizó Cara 1.5 con el módulo XEASY (Bartels et al., 1995).

5.13 Cristalización y colecta de datos de difracción de rayos X de gHev b

6.02

Los cristales para obtener datos de difracción de rayos X de gHev b 6.02 se obtuvieron por el método de difusión en fase de vapor, en la modalidad de gota sedente con la ayuda de los kits “Crystal Screen” y “Crystal Screen II” (Hampton Research, CA, EUA), se mezclaron partes iguales de la solución precipitante y de proteína y se dejó equilibrar con 400 μ L de solución precipitante en el pocillo. Tras las pruebas iniciales y optimización de algunas condiciones se obtuvieron cristales adecuados para difracción en dos condiciones, la primera utilizando como agente precipitante citrato de sodio 0.1 M, sulfato de amonio 2 M, con una solución de proteína de 10 mg/mL en amortiguador Tris a pH 5.5, y la segunda condición utilizando como agente precipitante citrato de sodio 1.8 M pH 6.5 con una solución de proteína de 10 mg/mL en agua.

Los cristales se difractaron en un equipo casero Rigaku MicroMax007 con un ánodo rotatorio de cobre ($\lambda=1.5416$ Å) en condiciones criogénicas (103 K) utilizando glicerol como crioprotector. Con el fin de resolver las fases por dispersión anómala simple de azufre (S-SAD) se colectaron datos con alta redundancia, 1640 imágenes con $\Delta\phi$ 0.5° a una resolución máxima de 1.43 Å, con la distancia mínima posible entre el cristal y el detector de 72 mm; se utilizó un detector de imágenes RAXIS IV++ (Rigaku, TX, EUA). Los datos fueron procesados y escalados utilizando DENZO y SCALEPACK con HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997), manteniendo las reflexiones relacionadas por simetría separadas durante el escalamiento. Para el modelo final sólo 940 imágenes fueron utilizadas debido a que el cristal presentó daño por radiación.

5.14 Solución de las fases por SAD y afinamiento de la estructura

La construcción del modelo y su afinamiento se realizó utilizando la suite cristalográfica PHENIX (Adams et al., 2010). Para resolver el problema de las fases, se utilizó dispersión anómala simple conferida por los azufres de la proteína (S-SAD), ya que Hev b 6.02 contiene 8 cisteínas (formando cuatro puentes disulfuro). Las fases experimentales se obtuvieron con el programa AutoSol (Terwilliger et al., 2009), un algoritmo para resolver las fases que utiliza HySS (Hybrid Substructure Search) (Grosse-Kunstleve and Adams, 2003) para encontrar los sitios de átomos pesados y SOLVE y RESOLVE (Terwilliger, 2003) para calcular fases experimentales y modificación de densidad. La cadena polipeptídica se construyó en forma automatizada con el programa AutoBuild (Terwilliger et al., 2008) (residuos 6 al 39, 66% del total) y se completó manualmente en Coot (Emsley et al., 2010). El modelo inicial fue sometido a varios ciclos de construcción manual y afinamiento con phenix.refine (Afonine et al., 2012). Durante todo el afinamiento se utilizó la función de máxima probabilidad a partir de las fases (phased maximum-likelihood) así como restricciones de fases experimentales. La opción de afinamiento TLS (Translation-Libration-Screw-rotation model), que afina desplazamientos anisotrópicos para grupos de átomos, se utilizó en el último ciclo a una resolución de 1.43 Å.

5.15 Experimentos de ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima) con IgE de suero de pacientes alérgicos

Los ensayos de ELISA se realizaron con el fin de detectar el reconocimiento por las IgE de Hev b 2 o Hev b 6.02. Los pozos de las placas se sensibilizaron con 8 µg de la proteína de interés por 12

hrs., a 4 °C. Las placas se lavaron con una solución de Tween-20 0.1% (v/v) en amortiguador PBS. Posteriormente se incubó una solución bloqueadora conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) 3.0% en PBS por 2.5 hrs., a 37 °C. Todos los sueros de pacientes se prepararon en una dilución 1:10 en PBS, se agregaron 50 µL de la dilución a cada pozo y se incubó a 4 °C durante la noche. Se utilizó un anticuerpo secundario producido en ratón que reconoce específicamente a la cadena ϵ de IgE humana y está unido a peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen, CA, EUA). Éste se preparó en una dilución 1:1000 en amortiguador PBS conteniendo Tween-20 0.1% y BSA 0.5%, 50 µL de la dilución se agregaron a cada pozo y la placa se incubó por 1.5 hrs., a 37 °C. Para producir la reacción colorimétrica se agregaron 100 µL a cada pozo de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y tras 15 min a temperatura ambiente se leyó la placa a 405 nm en un lector de placas (BioTek[®], VT, EUA). Los valores de absorbancia (Abs_{405}) de todas las muestras representan el promedio de tres determinaciones al cual se le restó el valor promedio de las absorbancias del suero control ante la misma muestra. El criterio para determinar si una reacción es positiva fue cuando la Abs_{405} es mayor a la del suero control más tres veces la desviación estándar. Para analizar estadísticamente si las diferencias en el reconocimiento a las formas naturales y procesadas del alérgeno son significativas se utilizó una prueba-t de Student pareada.

5.16 Síntesis de cADN y amplificación del gen de tiorredoxina h de *H. brasiliensis*

Para la síntesis del cADN se partió de ARN previamente obtenido en el laboratorio a partir de látex de la clona RIM de *H. brasiliensis*, utilizando el kit “Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kit” (New England BioLabs Inc.). Se llevaron a cabo dos protocolos, uno que utiliza el iniciador dN₉ (Random Primer 9) y el otro utiliza el iniciador dT23 (VN primer). La diferencia consiste en que este último sólo reconoce mRNA con cadenas de poliadenina en el extremo 3' (poli-A 3'). La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit.

Para la amplificación del gen se diseñaron oligonucleótidos basándose en la secuencia depositada en el GenBank FJ041113.2, que corresponde a la tiorredoxina h que se identificó a partir de extracto de guantes de cirujano. El oligonucleótido 1 (forward) contiene un sitio de restricción BamHI y una secuencia de corte reconocida por la proteasa del virus de mosaico de tabaco (TEV). El oligonucleótido 2 (reverse) contiene un codón de paro y un sitio de restricción XhoI (**Tabla 2**).

Tabla 2
Secuencias de nucleótidos para amplificación de tiorredoxina.

Oligonucleótido 1	5'→CGCGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAGGGTATG GGTGGAAATGGCCATGAACAGGTGATGAAGTCTAG AGTTGTGAAAGTA→3'
Oligonucleótido 2	5'→TGCTCGAGTTAGGTTTTGGAAGCACGAATAGAG TAAATAAA→3'

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la polimerasa “Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase” (M0530, New England BioLabs Inc.) siguiendo las

instrucciones del fabricante. La reacción de amplificación se hizo con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y finalmente 72°C por 30 segundos. Se hizo una extensión final de 72° C por 4 minutos. Las reacciones de PCR se mantuvieron a 4° C hasta ser analizadas en un gel de agarosa al 1%. El gen amplificado se purificó a partir del gel utilizando el kit “MinElute Extraction Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne TC-512.

5.17 Clonación y expresión de la tiorredoxina h de *H. brasiliensis*

Se utilizó el vector pET-28a para la clonación y expresión del gen. El vector y el gen purificado (inserto) se digirieron con las enzimas BamHI y XhoI y se ligaron utilizando ligasa T4 (New England BioLabs Inc.) en solución amortiguadora provista por el fabricante de la ligasa. Se hizo además una reacción omitiendo el inserto, como control de autoligación. El producto de la ligación se utilizó para transformar células DH5 α químicamente competentes mediante el método de choque térmico. Las células se sembraron en placas con medio Luria-Bertani (LB) con kanamicina y se incubaron a 37° C toda la noche. Las colonias obtenidas fueron sembradas en medio líquido con kanamicina, para posteriormente hacer la purificación de DNA plasmídico y realizar un análisis de clonas tras la restricción con las enzimas BamHI y XhoI. Las clonas positivas fueron confirmadas por secuenciación de nucleótidos (Laragen Inc, LA). Una vez confirmada la secuencia se llevó a cabo la sobre-expresión de la tiorredoxina en células *E. coli* Rosetta (DE3) y se registró el crecimiento de las células midiendo la densidad óptica a 600 nm; cuando ésta llegó a una valor de 0.6 se indujo la expresión de la proteína con 0.5 mM isopropil- β -

D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El tiempo de expresión de la proteína se determinó mediante una cinética de expresión tomando muestras cada dos horas hasta las 8 hrs, y cada cuatro horas hasta las 24 hrs, después de la adición de IPTG. La mayor cantidad de proteína se obtuvo a las 8 horas, por lo que ese fue el tiempo de expresión utilizado en expresiones subsecuentes.

5.18 Purificación de tiorredoxina h de *H. brasiliensis*

Las células que sobre-expresaron tiorredoxina por ocho horas se lisaron por sonicación en amortiguador Tris 50 mM pH 8, NaCl 0.3 M en presencia del inhibidor de proteasas serínicas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM; este último se mantuvo durante todo el proceso de purificación. El medio se centrifugó para retirar el contenido membranal y la proteína estuvo contenida en el sobrenadante de forma soluble. La tiorredoxina se separó gracias a la etiqueta de histidinas (His-tag) conferida por el vector en el extremo N-terminal de la proteína, para esto se utilizó una columna de afinidad a níquel equilibrada con el amortiguador de lisis. Tras un aumento escalonado en la concentración de imidazol, la tiorredoxina se eluyó a una concentración de 200 mM en el mismo amortiguador. Para cortar la etiqueta de histidinas de la tiorredoxina se le agregó a la muestra la enzima TEV y se dializó durante la noche contra amortiguador Tris 50 mM, NaCl pH 8 para eliminar el imidazol. La muestra se aplicó nuevamente a la columna de níquel para eliminar la enzima TEV que también contenía un His-tag. La **Figura 3** muestra un diagrama con los pasos de purificación a partir de la construcción que se diseñó.

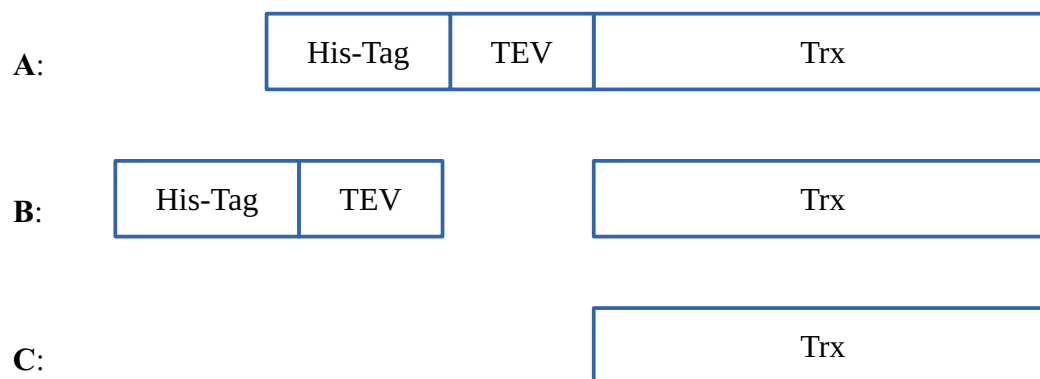


Figura 3. Diagrama de la construcción de la tiorredoxina recombinante y sus pasos de purificación. **A:** Construcción original con afinidad a níquel. **B:** Corte con enzima TEV. **C:** Recirculación por columna de níquel.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción, purificación e identificación de alérgenos a partir de guantes de látex

A partir de diferentes marcas de guantes para cirujano se obtuvieron extractos, a los cuales se les cuantificó proteína total, valor que varió entre 0.5 y 1.1 mg de proteína por gramo de guante. Es interesante hacer notar que estos productos exceden por mucho el valor de 50 $\mu\text{g/g}$ que indica la norma ASTM D3577. A partir de la fracción APM se obtuvieron los perfiles electroforéticos, los cuales se muestran en la **Figura 4**.

Como se puede observar en dicha figura, el gel marcado con el número 4 fue el que mostró mayor variedad de proteínas, esta marca de guantes también fue la que tuvo mayor abundancia de proteína total (1.1 mg/g de guante). Por lo tanto, ésta se eligió para realizar el resto

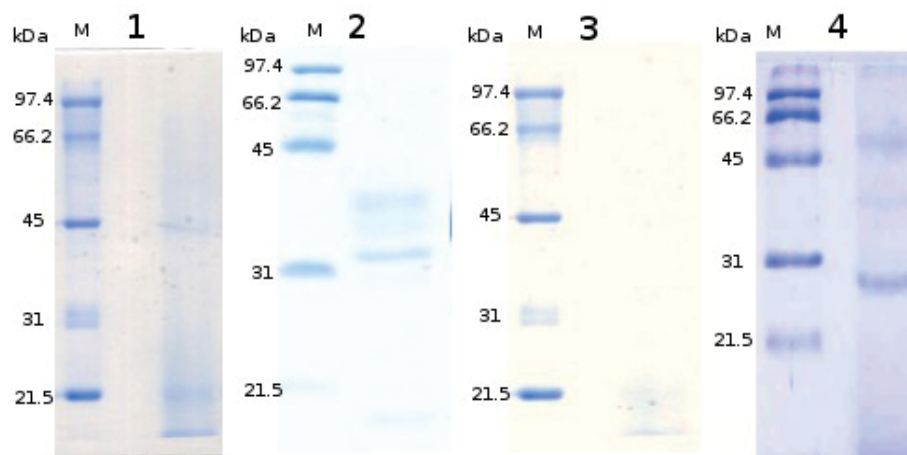


Figura 4. Geles SDS-PAGE al 12% en los que se aplicaron los extractos de cuatro marcas de guantes. 1: Dentilab, 2: Sensimedical, 3: Ambiderm, 4: Protec. Como marcador molecular (M) se utilizó el estándar Low Range (BioRad, CA, EUA).

de los análisis en este trabajo. A partir de las bandas en el gel se identificaron las proteínas contenidas mediante LC/ESI-MS/MS, las cuales esencialmente fueron alérgenos conocidos del látex como: Hev b 2, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01 y Hev b 14 (**Figura 5**). En la figura se puede observar que algunos alérgenos están presentes en más de una banda, lo que indica que pueden estar fragmentados y por lo tanto muestran distintos pesos moleculares. Además de estos alérgenos se identificó a la proteína tiorredoxina, la cual a pesar de no estar clasificada por la IUIS como alérgeno, ya se ha sugerido que es una proteína reconocida por las IgE de sueros de pacientes alérgicos (Yagami et al., 2004). Cabe mencionar que las tiorredoxinas de maíz y de trigo han sido clasificadas como alérgenos por parte de la IUIS y también se ha reportado que los pacientes alérgicos a una de estas tiorredoxinas muestran reactividad cruzada en presencia de la otra (Weichel et al., 2006) e incluso pueden generar autorreactividad al reaccionar con las tiorredoxinas propias del individuo alérgico (Glaser et al., 2008). En la **Tabla 3** se muestran las proteínas identificadas a partir de las bandas en los geles por el algoritmo de búsqueda MASCOT, la cobertura de coincidencia con la proteína y el *score* de los fragmentos trípticos que indican su confiabilidad.

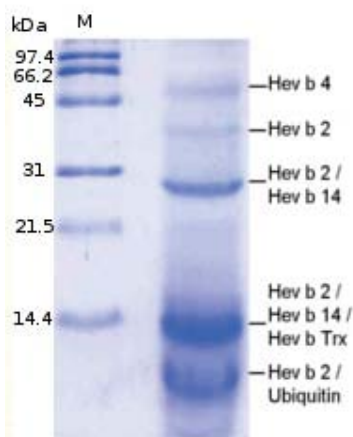


Figura 5. Gel SDS-PAGE a partir del cual se identificaron las proteínas presentes en el extracto de guantes marca Protec.

Tabla 3

Proteínas identificadas por LC/ESI-MS/MS a partir de extracto de guantes. Los números de acceso son de la base de datos UniprotKnowledge.

Proteína	Peso molecular/pI	Número de acceso	Covertura (%)	Secuencia peptídica MS/MS (<i>score</i> de los iones)
Hev b 4	41.1/4.6	Q5VLJ6	49	SELDEYLFSGDGLYDAGNAK (73), FIYDPKYLPYHHPYGTTFDYPTGR (75) TVVDFVAENVSLPR (104), IPPFK (15), FASEGATASDSNPLIDFR (134), DFGELK (26), GADDYLNYEIPSEASR (52), EQLESIVDVVLGNISDR (102), ELYDFGAR (46), KFVVENVAPLGLIPFIK (67), LPQILEK (48), EIIDAPGEHGFK (60), ESGFISPYGVK (61)
Hev b 2	41.5/9.5	ABN03966	22	NLPPVSEVIALYK (69), IYDPNQAVLEALR (90), GFWSSVR (30), YIAVGNEISPVNR (80), SPLLANIYPYFTYAGNPR (67), TYLSNLIQHVK (33), HFGLFFPNK (46)
Hev b 14	22.1/8.3	E7BQV3	63	YSYVNIAFLNK (91), FGNGQTPQINLAGHCNPAAGGCTIVSNGIR (53), VMSLGGGIGSYTLASQADAK (137), NVADYLWSNFLGGK (89), SSSRPLGDAVLGDIDFIEHGSTLYWDDLAR (190), YLSAYSKQGK (53), VYLTAAPQCPFPDR (86)
Hev b 5	16.1/4	Q39967	19	TEEPAPEADQTTPEEKPAEPEPVAEEEEPK (70)
Hev b 6.01	22.1/5.4	Q6JYR0	27	CLSVTNTGTGAK (60), NGGLDLDVNVFR (67), QLDTDGKGYER (55), GHLTVNYQFVD (78)
Tiorredoxina	13.8/4.8	Q9XF70	8	LVGANPEEIR (49)

6.2 Purificación e identificación de un fragmento de Hev b 14 (hevamina) presente en guantes

Partiendo de la fracción APM se utilizaron técnicas cromatográficas para purificar a la proteína más abundante. En la cromatografía de exclusión molecular se separó una fracción que presentaba la menor masa molecular. Ésta se purificó por intercambio iónico dando lugar a un péptido de 13.6 kDa, el cual fue identificado por LC/ESI-MS/MS como Hev b 14 (hevamina), la cual es una quitinasa de clase III (**Figura 6**). Ésta es una proteína de 33.7 kDa, por lo tanto lo que se purificó es un fragmento de la misma, seguramente producido durante el proceso de manufactura. Hev b 14 ha sido reportado como un alérgeno principal para la población de Taiwan, Lee y colaboradores (2010 y 2006) sugieren que este alérgeno junto con Hev b 1 son indicadores de alergenicidad en guantes de látex. No obstante, no se ha reportado la prevalencia de reactividad ante Hev b 14, ni su abundancia en guantes en otras regiones del mundo o por otros autores. En nuestro estudio, este fragmento es relativamente abundante en los guantes (6µg/g de guante), por lo que es probable que tenga un papel importante en la alergenicidad del producto.

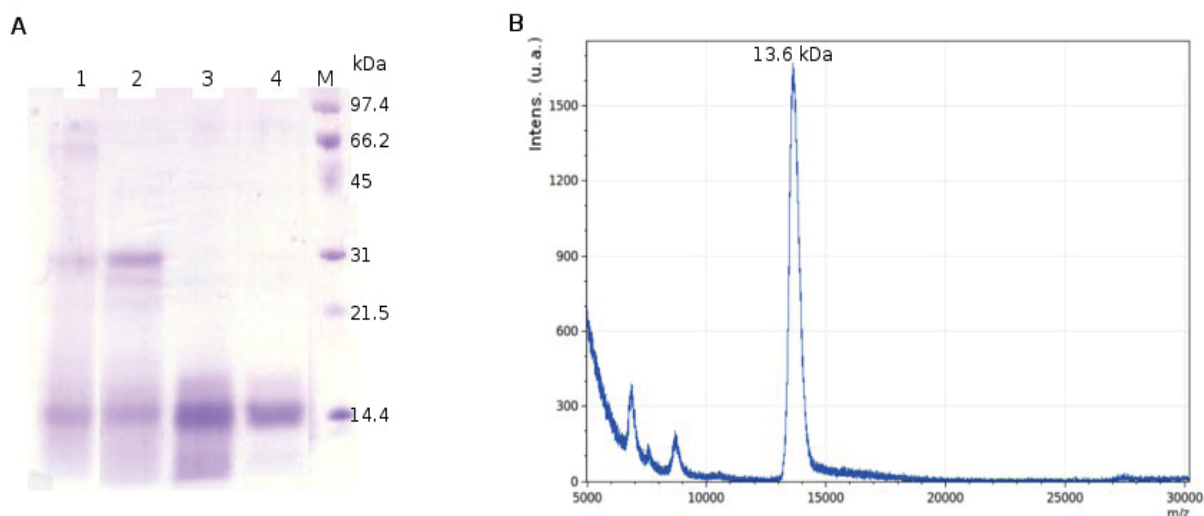


Figura 6. **A:** Gel SDS-PAGE mostrando los pasos de purificación, carril 1 fracción APM, carril 2 fracción de exclusión molecular, carril 3 y 4 fracción obtenida por intercambio iónico a pH 7.4 y 9 respectivamente. Como marcador molecular (M) se utilizó el estándar Low Range (BioRad, CA, EUA). **B:** Espectro MALDI-TOF del péptido purificado.

6.3 Caracterización de Hev b 2 (β -1,3-glucanasa) presente en guantes

El alérgeno Hev b 2 es una enzima de 316 aminoácidos que presenta actividad de β -1,3-glucanasa. Esta enzima está glicosilada en los aminoácidos Asn27 y Asn314, lo cual se reportó previamente en nuestro laboratorio (Rodríguez-Romero et al., 2014). Como se mostró en la Figura 5, esta proteína se identificó en el extracto de guantes, por lo tanto decidimos estudiarla utilizando cromatografía de afinidad a ConA para aislarla a partir de la fracción APM. La fracción retenida en la columna se aplicó a un gel SDS-PAGE, en el cual se observan tres bandas, las tres fueron identificadas por LC/ESI-MS/MS como Hev b 2 (**Figura 7A** y **Tabla 4**). La masa molecular de Hev b 2 es de 38.1 kDa, que corresponde a la banda de mayor tamaño; por lo tanto, las otras dos bandas de menor peso molecular deben corresponder a fragmentos de la proteína producidos durante la fabricación de los guantes. Los fragmentos trípticos que se muestran en la

Tabla 4 cubren la mayor parte de la proteína en el caso de la banda 1, mientras que en las bandas 2 y 3 se pierden regiones del amino-terminal principalmente. La forma más abundante es el fragmento de 31 kDa (banda 2), y cabe destacar que estos fragmentos se mantienen glicosilados, ya que se unieron a la columna de afinidad de ConA. Esto es importante, ya que previamente nuestro grupo de trabajo reportó que los sitios de glicosilación son importantes para el reconocimiento por las IgE de suero de pacientes alérgicos a látex, ya que al ser removidos enzimáticamente disminuyó dicho reconocimiento (Rodríguez-Romero et al., 2014).

Las técnicas cromatográficas utilizadas no nos permitieron separar las tres formas de Hev b 2 aisladas del extracto, por lo que los experimentos de caracterización se llevaron a cabo utilizando esta muestra conteniendo mayoritariamente al fragmento de 31 kDa y se denominó gHev b 2. Para determinar el contenido de estructura secundaria de gHev b 2 se obtuvo un espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano, el cual no corresponde al de una proteína desplegada (**Figura 7B**). Asumimos que este espectro es el resultado de la aportación de señales del fragmento de 31 kDa principalmente; lo que indica que tras haber sido fragmentada mantiene estructura secundaria, lo que puede ser importante para ser reconocida por IgE de pacientes si mantiene epítomos conformacionales.

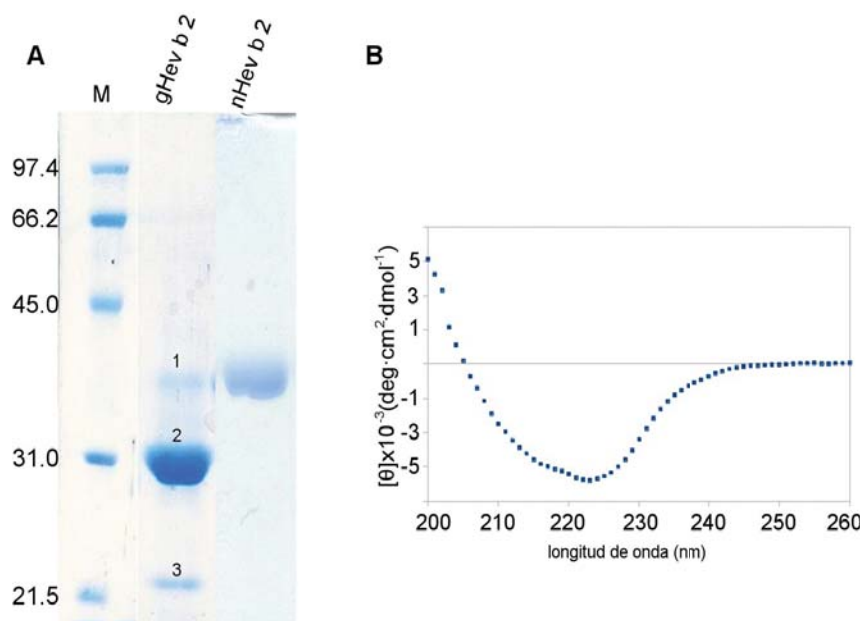


Figura 7. **A:** Gel SDS-PAGE mostrando la muestra con tres bandas identificadas como Hev b 2 (gHev b 2) y en forma comparativa la proteína no procesada como comparación (nHev b 2). Como marcador molecular (M) se utilizó el estándar Low Range (BioRad, CA, EUA). **B:** espectro de dicroísmo circular de gHev b 2.

Tabla 4

Péptidos trípticos de Hev b 2 identificados por LC/ESI-MS/MS a partir de las bandas mostradas en la imagen anterior. La numeración de los aminoácidos se muestra en negritas y está basada en la secuencia reportada por nuestro grupo (PDB: 4HPG).

Banda	Masa aparente	Covertura (%)	Secuencia peptídica MS/MS (<i>score</i> de los iones)
1	38 kDa	57	12 NLPPVSEVIALYK 24 (72), 33 IYDPNQAVLEALR 81 (24) 46 GSNIELILGVPNSDLQSLTNPSNAK 70 (112), 88 YIAVGNEISPVNR 100 (93), 101 GTAWLAQFVLPAMR 114 (72), 122 SAGLQDQIK 130 (58), 131 VSTAILDLTLVGNSYPPSAGAFR 152 (106), 157 SYLNPIIR 164 (53), 165 FLSSIRSPLLANIYPYFTYAGNPR 188 (18), 189 DISLPYALFTSPSVVVWDGQR 209 (88), 195 ALFTSPSVVVWDGQR 209 (94), 213 NLFDATLDALYSALER 228 (75), 258 TYLSNLIQHVK 304 (53), 278 AIETYL FAMFDENK 291 (76), 299 HFGLFFPNK 307 (59)
2	31 kDa	29	33 IYDPNQAVLEALR 81 (93), 88 YIAVGNEISPVNR 100 (93), 167 VSTAILDLTLVGNSYPPSAGAFR 188 (106), 157 SYLNPIIR 164 (53), 171 SPLLANIYPYFTYAGNPR 188 (78), 258 TYLSNLIQHVK 268 (53), 278 AIETYL FAMFDENK 292 (36), 299 HFGLFFPNK 307 (38)
3	23 kDa	20	88 YIAVGNEISPVNR 100 (29), 193 SYLNPIIR 200 (63), 171 SPLLANIYPYFTYAGNPR 188 (22), 195 ALFTSPSVVVWDGQR 209 (93), 258 TYLSNLIQHVK 268 (73)

6.4 Reconocimiento de gHev b 2 y nHev b 2 por IgE de suero de pacientes

Para comparar el reconocimiento de IgE de pacientes alérgicos a gHev b 2 y nHev b 2 se utilizó la técnica de ELISA. Para este experimento se utilizó un grupo de pacientes alérgicos a látex y además un grupo de pacientes alérgicos a frutas tales como manzana, kiwi, fresa entre otras. Esto debido a que la β -1,3-glucanasa es una proteína muy conservada en plantas, por lo que juega un papel importante en el síndrome de reactividad cruzada látex-polen-fruta (Barre et al., 2009; Palomares et al., 2005b). Como se aprecia en la **Figura 8**, los grupos de pacientes mostraron diferencias en el reconocimiento de gHev b 2 y nHev b 2. Aunque la mayoría de los pacientes reconocieron ambas formas del alérgeno, es interesante notar que los pacientes alérgicos a látex tuvieron un mayor reconocimiento a gHev b 2, mientras que los pacientes alérgicos a frutas mostraron mayor reconocimiento a nHev b 2. Las diferencias en el reconocimiento entre ambas formas del alérgeno resultaron significativas en la prueba estadística, siendo $p < 0.02$ para el grupo de pacientes alérgicos a látex y $p < 0.001$ para el grupo de pacientes alérgicos a frutas. Esto se puede deber a que los pacientes alérgicos a frutas no reconocen a los fragmentos de la proteína, mientras que los alérgicos al látex sí, lo que indica que reconocen epítomos distintos del alérgeno. Una posible explicación es que los pacientes que se sensibilizaron por alimentos pudieron estar en contacto con una glucanasa estructuralmente similar a Hev b 2 y que no sufrió cambios debido a que no fue procesada, por lo tanto reconocen a nHev b 2 pero no a gHev b 2, que fue procesada y está enriquecida con un fragmento de la proteína de 31 kDa. El hecho que los fragmentos de Hev b 2 mantengan al menos una de sus glicosilaciones es esencial para su reconocimiento por las IgE de pacientes alérgicos al látex, ya que sabemos que los oligosacáridos forman parte de un

epítipo conformacional en la superficie de la proteína, pero es posible que las IgE de pacientes alérgicos a frutas no reconozcan este epítipo. Cabe mencionar que Barre y cols. (2009) propusieron otros epítipos que sólo incluyen uno de los dos sitios de glicosilación reportados por nuestro grupo de trabajo.

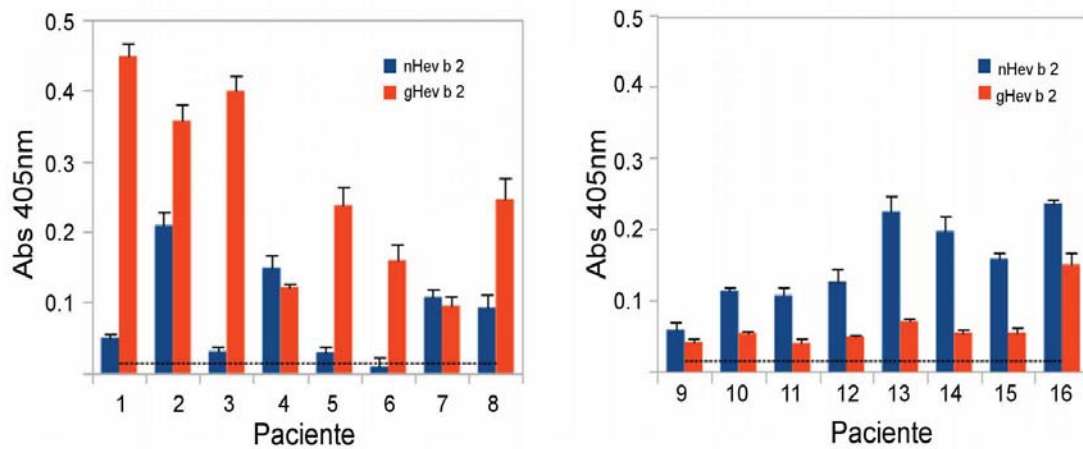


Figura. 8. Experimentos de ELISA con Hev b 2. Pacientes 1-8 alérgicos a látex, pacientes 9-16 alérgicos a frutas. La línea horizontal punteada indica el criterio de reacción positiva.

6.5 Purificación y caracterización de Hev b 6.02 (heveína) presente en guantes

En cuanto a las proteínas de la fracción BPM, se purificó a la proteína más abundante por cromatografía de fase reversa. Esta fracción mostró el mismo tiempo de retención que presenta nHev b 6.02 y se observa por electroforesis en geles de Tricina-SDS-PAGE que muestra el mismo peso molecular (**Figura 9**). La fracción fue recirculada en la misma columna para aumentar la pureza.

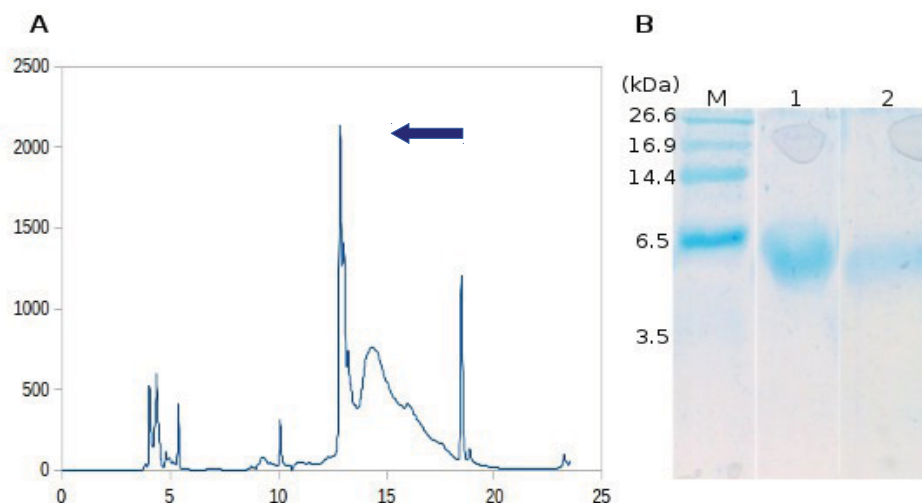


Figura 9. **A:** Perfil de elución de la fracción BPM por fase reversa C18. **B:** Gel Tricina-SDS-PAGE; en el carril 1, nHev b 6.02; en el carril 2, fracción del cromatograma marcada con una flecha. Como marcador molecular (M) se utilizó el estándar Polypeptide (BioRad, CA, EUA).

De acuerdo con los espectros de masas (MALDI-TOF) y de dicroísmo circular en el UV lejano, se corroboró que la proteína que se purificó es Hev b 6.02 (gHev b 6.02) (**Figura 10A y 10B**, respectivamente). La masa corresponde a la esperada para Hev b 6.02 con sus 8 cisteínas formando puentes disulfuro. Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular es el característico para esta proteína, que muestra una banda positiva centrada en 221 nm que se atribuye principalmente a contribuciones de las cisteínas formando puentes disulfuro en la proteína (Rodríguez-Romero, 1989). Estos resultados indican que la proteína resiste el proceso de manufactura sin fragmentarse y manteniendo su estructura secundaria original, así como los puentes disulfuro.

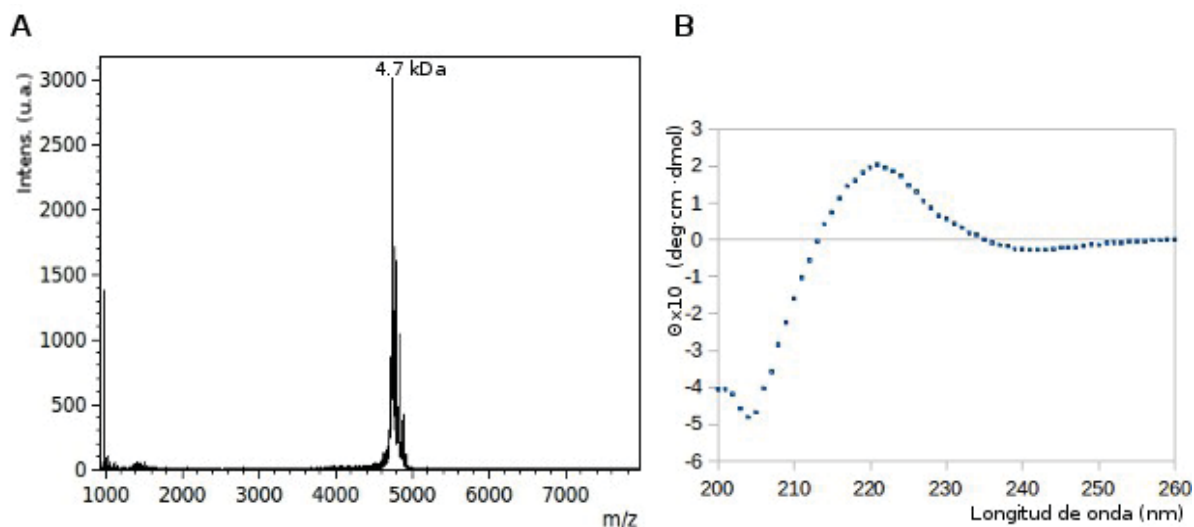


Figura 10. **A:** Espectro MALDI-TOF de gHev b 6.02. **B:** Espectro de DC de gHev b 6.02.

6.6 Reconocimiento de gHev b 6.02 y nHev b 6.02 por IgE

Para evaluar y comparar el reconocimiento de gHev b 6.02 y nHev b 6.02 por las IgE de suero de pacientes alérgicos se utilizó la técnica de ELISA. En la **Figura 11A** se muestra que de un grupo de 8 pacientes alérgicos a látex cuatro reconocieron de forma similar a las dos formas del alérgeno, mientras que tres mostraron mayor reconocimiento a gHev b 6.02, y un paciente no mostró reconocimiento por ninguna de las dos formas. Para confirmar estos resultados, se decidió analizar si las IgE de los sueros de los pacientes 2, 3, 4 y 7 realmente tienen el mismo reconocimiento a ambas formas del alérgeno mediante experimentos de ELISA de competencia, para los cuales se utilizó una mezcla de dichos sueros. La placa fue sensibilizada con nHev b 6.02 (8 $\mu\text{g/mL}$) y su reconocimiento por las IgE fue inhibido por gHev b 6.02, obteniendo la inhibición máxima cuando gHev b 6.02 se utilizó a una concentración de 100 ng/mL (**Figura 11B**). También se hizo el experimento opuesto, sensibilizando la placa con gHev b 6.02, en el que

además de la muestra anterior se utilizó otra conteniendo una mezcla de los sueros 1, 5 y 6 que sólo reconocieron gHev b 6.02. En este caso, nHev b 6.02 no fue capaz de inhibir el reconocimiento a gHev b 6.02 de ninguna de las dos muestras, incluso a concentraciones de hasta 16 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados indican que las IgE tienen mayor afinidad al alérgeno purificado de guantes que al obtenido de la fuente natural, a pesar de que los espectros de masas y difracción circular sugieren que la estructura de la proteína no fue afectada.

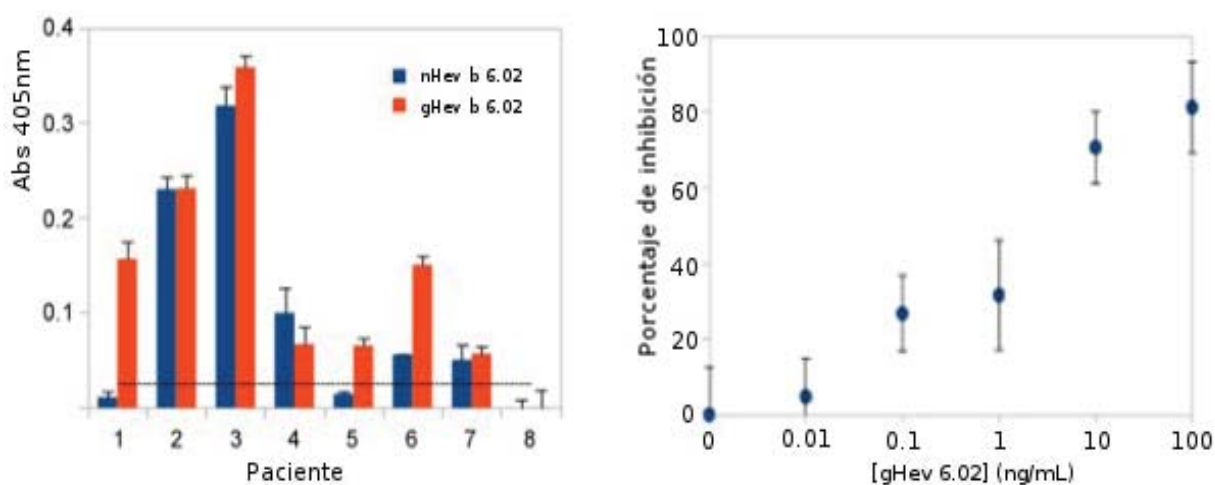


Figura 11. **A:** ELISA directa de IgE ante 8 pacientes alérgicos a látex, la línea punteada indica el criterio de reacción positiva. **B:** ELISA de competencia utilizando una mezcla de los sueros 2, 3, 4 y 7.

6.7 Ensayos de unión de Hev b 6.02 a $(\text{GlcNAc})_3$

Hev b 6.02 (heveína) es una proteína con actividad de lectina. En nuestro grupo de trabajo se reportó previamente que algunos aminoácidos, tales como los triptofanos 21 y 23 y la asparagina 14, involucrados en el reconocimiento de carbohidratos, también están involucrados en su

reconocimiento por anticuerpos, formando parte de un epítipo conformacional (Pedraza-Escalona et al., 2009; Reyes-López et al., 2006). Por lo tanto, analizar si su capacidad en el reconocimiento de carbohidratos se ve afectada tras las condiciones de la manufactura del guante, nos daría un indicio sobre si este epítipo es responsable de la diferencia en el reconocimiento por IgE mostrada en la sección anterior. Con este fin se realizaron experimentos de fluorescencia titulando a la proteína, ya sea gHev b 6.02 o nHev b 6.02 con concentraciones crecientes de quitotriosa. Los barridos de emisión de 300 a 450 nm mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de ligando, el máximo de emisión se produjo inicialmente a 350 nm con un leve corrimiento hacia el azul al adicionar el ligando; lo que generalmente indica un ambiente más hidrofóbico. El cambio de la intensidad de fluorescencia a 350 nm (ΔIF) se graficó en función de la concentración de quitotriosa y se calcularon K_d de 68.01 y 66.9 μM para la proteína natural y la de guante, respectivamente, lo que significa que no hay diferencias en la forma en la que unen el ligando las dos formas de la proteína (**Figura 12**). Por lo tanto, también asumimos que los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de azúcares no son responsables del cambio en el reconocimiento por IgE tras la fabricación de los guantes. Cabe mencionar que resultados previos de experimentos de unión de quitotriosa a heveína por otras técnicas han estimado valores similares de K_d : 86 μM por RMN y de 71 μM por calorimetría de titulación isotérmica (Asensio et al., 1998; García-Hernández, 1997).

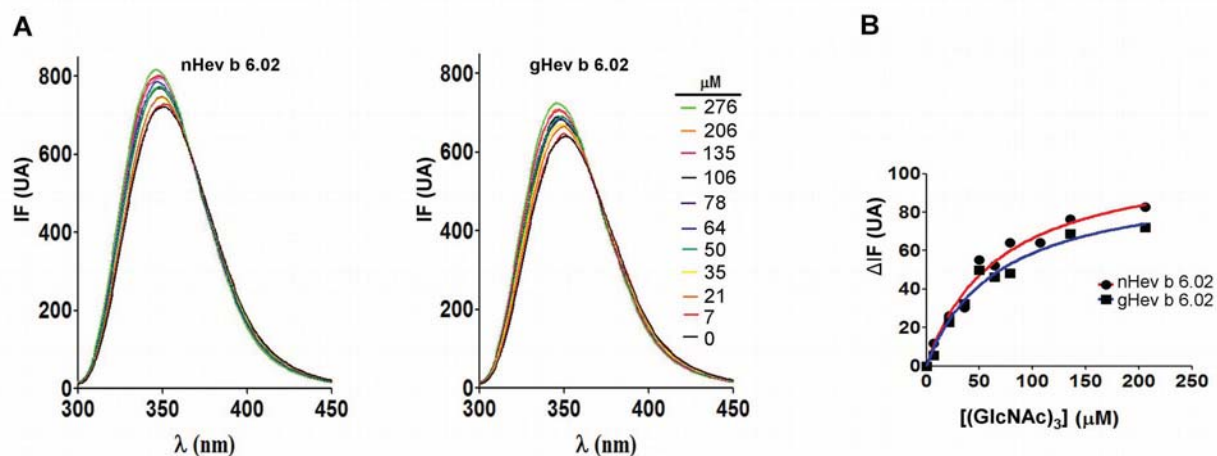


Figura 12. **A:** Curvas de emisión de fluorescencia de la proteína a diferentes concentraciones de ligando. **B:** Curvas de ΔIF a 350 nm a diferentes concentraciones de ligando.

6.8 Caracterización estructural de gHev b 6.02 por RMN

Considerando que pudiera existir algún cambio estructural en gHev b 2, que no se hiciera evidente en el análisis de estructura secundaria ni en los experimentos de fluorescencia, decidimos enfocarnos en el estudio de la estructura terciaria del alérgeno, para lo cual primero se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear. En primera instancia se obtuvo un espectro monodimensional en el que observaron señales bien distribuidas a lo largo del espectro, lo que indica que la proteína contiene estructura secundaria y terciaria. Por lo tanto, decidimos obtener los espectros bidimensionales TOCSY y NOESY, tanto de gHev b 6.02 como de nHev b 6.02, con fines comparativos. El espectro NOESY nos permite identificar todas las interacciones entre átomos a una distancia de 5 Å o menor, aunque no estén cercanos en la cadena polipeptídica; mientras que el TOCSY sólo muestra los sistemas de espín de los aminoácidos, esto nos permite discernir qué señales del NOESY corresponden a los sistemas de espín (empalmadas con TOCSY) y cuáles interacciones son producidas por el plegamiento de la

proteína (sin señal TOCSY). En la **Figura 13** se muestra una superposición de los espectros NOESY, pudiendo observarse que prácticamente todas las señales se superponen, indicando que la proteína mantiene la misma estructura terciaria tras el proceso de fabricación. Aproximadamente un 80% de las señales NOESY de gHev b 6.02 fueron asignadas, identificando algunas de las interacciones a larga distancia, cercanas por el plegamiento de la proteína, como son los puentes disulfuro.

6.9 Caracterización estructural de gHev b 6.02 por cristalografía

Una vez conociendo que la proteína mantiene su estructura terciaria, se decidió abordar el estudio estructural por cristalografía, ya que esta técnica nos permitiría observar a nivel atómico algún cambio sutil en la molécula. En primera instancia se montaron pruebas de cristalización en las condiciones reportadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo, no obstante gHev b 6.02 no cristalizó en dichas condiciones (Reyes-López et al., 2004). Por lo tanto se probaron todas las condiciones de los kits “Crystal Screen” y “Crystal Screen 2”, a partir de lo cual se observaron cristales en dos condiciones. Dichas condiciones fueron optimizadas, logrando obtener cristales adecuados para experimentos de difracción de rayos X en dos de ellas, la primera con sulfato de amonio 2 M como agente precipitante, con la proteína disuelta en amortiguador Tris pH 5.5, y la segunda con citrato de sodio 1.8 M como precipitante con la proteína disuelta en agua. En ambos casos, la proteína se preparó a una concentración de 10 mg/mL y el método de cristalización fue el de difusión en fase de vapor, modalidad de gota sedente (**Figura 14**).

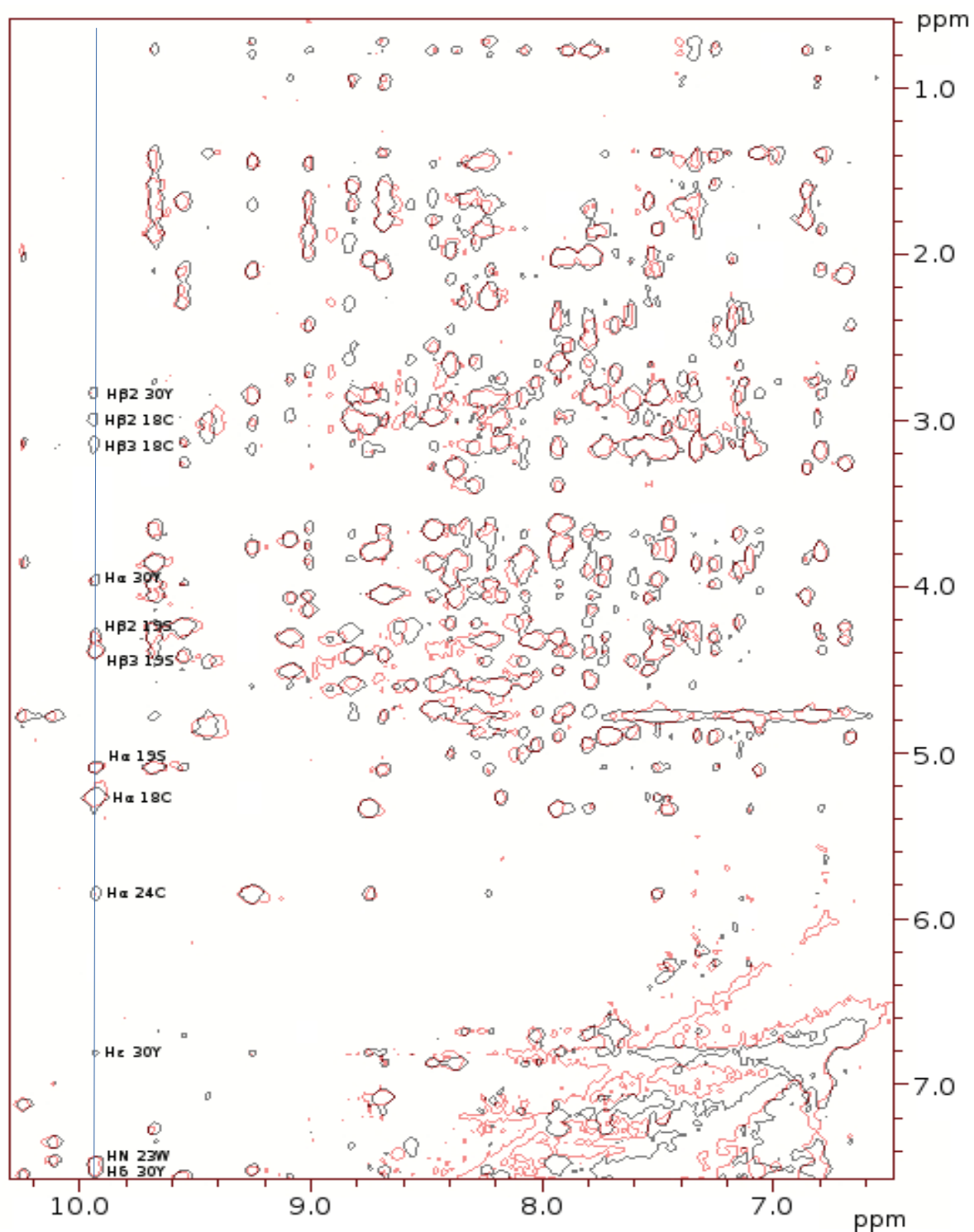


Figura 13. Superposición de una región de los espectros NOESY de nHev b 6.02 (negro) y gHev b 6.02 (rojo). Como ejemplo de la asignación se trazó una línea azul a 9.9 ppm, desplazamiento químico del HN de Ser19, y se indica a la derecha de cada señal el átomo con el que interactúa.

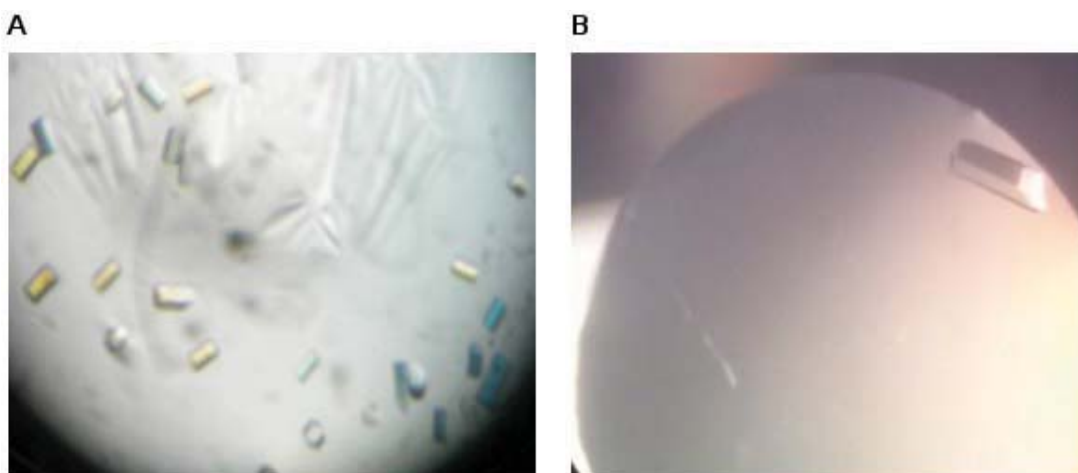


Figura 14. Cristales de gHev b 6.02. **A:** Citrato de sodio 1.8 M como agente precipitante. **B:** Sulfato de amonio 2 M como agente precipitante.

Los cristales obtenidos en ambas condiciones pertenecieron al grupo espacial $P 3_1 2_1$, con dimensiones de celda $a=37.33$, $b=37.33$ y $c=48.78$ Å. El coeficiente de Matthews (V_m) fue de 2.08 Å³/Da, lo que indica que el cristal contenía una molécula de gHev b 6.02 en la unidad asimétrica y presentó un contenido de solvente de 40.9%. Gracias a la alta redundancia de 11.8 con la que se colectaron los datos y dado que se querían determinar posibles modificaciones sutiles, se decidió resolver las fases por el método experimental de dispersión anómala simple (SAD). El mapa experimental se obtuvo a partir de los azufres contenidos en las ocho cisteínas de la proteína; sin embargo, este mapa presentó nueve picos que corresponden a los sitios de azufre, ocho formando puentes disulfuro y uno adicional. El cristal difractó a una resolución de 1.43 Å, lo que permitió obtener mapas de densidad electrónica de muy buena calidad (**Figura 15A**); no obstante, el I/σ fue de 65, lo que indica que el cristal difractó a una mejor resolución. Sin embargo, no fue posible obtener los datos de más alta resolución, debido a que en el equipo la distancia mínima entre el cristal y el detector es de 72 mm. Los mapas $2F_o - F_c$ y $F_o - F_c$ se interpretaron construyendo el modelo de la proteína con sus 43 aminoácidos, la única región que

no se pudo interpretar fue la cadena lateral del Asp43, probablemente debido a la flexibilidad de la cadena en la región carboxilo terminal. El modelo final tiene las mismas características estructurales que en el modelo obtenido previamente a 1.54 Å de resolución para nHev b 6.02 (PDB: 1Q9B). La proteína presenta los cuatro puentes disulfuro Cys3-Cys18, Cys12-Cys24, Cys17-Cys31 y Cys37-Cys41, una pequeña hoja β antiparalela que involucra los residuos Cys17-Ser19 y Trp23-Gly25 conectados por un giro β formado por los residuos Ser19 a Gly22, así como un segmento de hélice- α formado por los residuos Asp28-Cys31. Si se superpone este modelo con 1Q9B se obtiene un valor de RMSD (desviación de la media cuadrática) de cadena principal de 0.16 Å, confirmando que no hay diferencias en el plegamiento de ambas formas del alérgeno. Se analizó además el sitio de unión a carbohidratos, el cual sólo muestra diferencia en la conformación de la cadena lateral del Trp21, al igual que el Glu29 que está cercano al sitio (**Figura 15B**). La estadística de la colecta de datos y afinamiento del modelo se muestran en la **Tabla 5**.

A pesar de que el modelo parece ser idéntico al de la proteína no procesada, se encontró algo interesante. Cerca de la región carboxilo terminal se observó densidad electrónica adicional que no corresponde a la cadena peptídica. Además, es ahí donde se sitúa el noveno sitio de azufre determinado en el mapa experimental. Para explicar esta densidad se modeló una molécula de tiourea (TOU), que es un compuesto utilizado durante la fabricación de los guantes como acelerador de la vulcanización (Rose et al., 2009) y al parecer fue acarreado por la proteína tras la purificación. La molécula de tiourea muestra interacción con la proteína con un puente de hidrógeno entre N-Asp40 y N1-TOU a una distancia de 3 Å; además otras dos interacciones pueden ocurrir entre N-Asn40 y S-TOU (3.44 Å) así como entre N-Cys41 y S-TOU dependiendo de la forma tautomérica de TOU (tiol o tion). No se observan enlaces covalentes entre TOU y la

Tabla 5
Estadísticas de colecta de datos y afinamiento. Los valores en paréntesis son los de la capa de mayor resolución.

<i>Colecta de datos</i>	
Grupo espacial	P 3 ₁ 2 1
Resolución (Å)	26.95-1.43 (1.48-1.43)
Parámetros de celda unitaria a, b, c (Å)	37.33, 37.33, 48.78
Reflexiones únicas	13802 (1330)
Redundancia	11.8 (10.4)
Integridad	99 (96.7)
I/σ promedio	64.6 (24.4)
R_{merge} (%)	5.8 (18.6)
R_{pim} (%)	1.7 (5.9)
Factor-B del plot de Wilson (Å ²)	15.3
<i>Afinamiento</i>	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	15.1/16.6
Factor-B promedio (Å ²)	20.0
Átomos de proteína/agua	329/53
Átomos de ligando	4
RMSD:	
Longitudes de enlaces (Å)	0.014
Ángulos de enlaces(°)	1.45
Código PDB	4WP4

proteína. Después de varios ciclos de afinamiento con phenix.refine, el factor B de la molécula TOU fue de 30 Å², que es igual al de los residuos más cercanos que son Asn40 y Cys41; el factor B general de la proteína fue de 20.9 Å², mientras que el factor B de Wilson fue 15.3 Å². Además, el coeficiente de correlación de TOU fue de 0.9, estas estadísticas sugieren que la molécula es adecuada para explicar esa densidad electrónica. A pesar de esto, tras el afinamiento se observa

densidad electrónica que se extiende más allá de la tiourea modelada; es probable que la molécula que acarrea la proteína sea un derivado de tiourea de mayor número de átomos. En la **Figura 15C** se muestra un mapa de omisión en la región de la tiourea. El modelo final se muestra en la **Figura 15D**, éste se depositó en el “Protein Data Bank” y se le asignó el código PDB 4WP4.

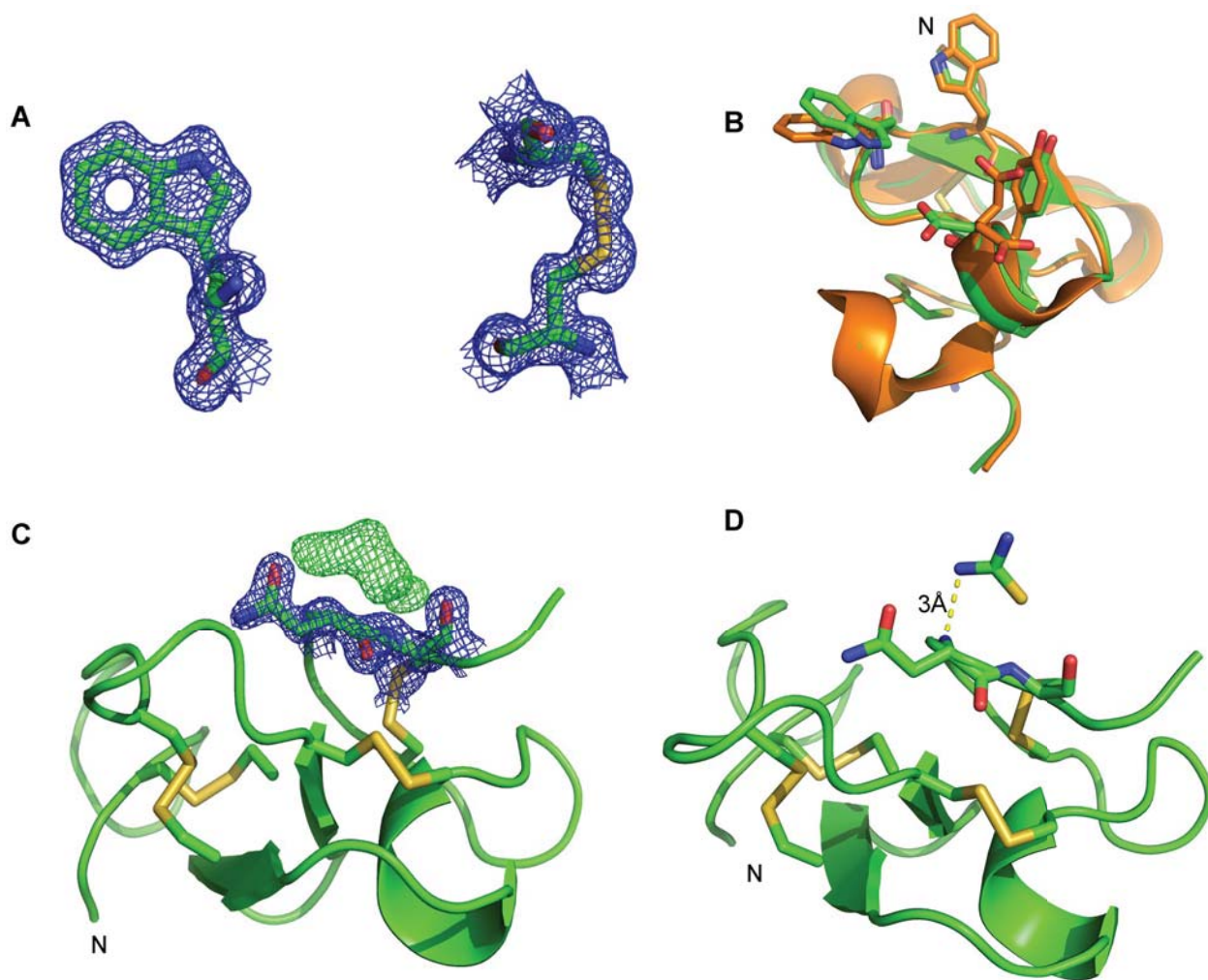


Figura 15. **A:** Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc ($\sigma=1$), la zona de la derecha corresponde a la Trp21 y la de la izquierda al puente disulfuro entre la Cys17 y Cys31. **B:** Alineamiento estructural entre gHev b 6.02 (4WP4) (verde) y nHev b 6.02 (1Q9B) (naranja). **C:** Modelo de gHev b 6.02 mostrando el mapa omisión (verde, $\sigma=3$) en la zona de la tiourea y la densidad electrónica (azul, $\sigma=1$) de los aminoácidos cercanos. **D:** Modelo final de gHev b 6.02 mostrando la tiourea.

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en este proyecto, se puede concluir que el proceso de manufactura de los guantes de látex genera cambios en el reconocimiento de los alérgenos por las IgE de pacientes alérgicos. En el caso de Hev b 2, la diferencia en el reconocimiento se explica por un cambio estructural evidente, debido a la fragmentación. Sin embargo, en el estudio de Hev b 6.02 se demuestra que la asociación no covalente de un compuesto al alérgeno es suficiente para aumentar la afinidad a las IgE, sin que exista ningún cambio estructural en la proteína. Por lo tanto, también se llega a la conclusión de que las pruebas de diagnóstico con alérgenos no procesados, como comúnmente se realizan en los hospitales, pueden dar lugar a falsos negativos.

PERSPECTIVAS

Caracterizar el contenido de alérgenos en otras marcas de guantes o productos de látex.

Es de interés saber si los mismos alérgenos están presentes en otros productos de látex y si presentan las mismas modificaciones. Uno o varios alérgenos modificados, que sean representativos en distintos productos, serían de mayor utilidad para su uso en diagnóstico.

Llevar a cabo la unión de tiourea a Hev b 6.02 en el laboratorio.

Si se modifica el alérgeno en laboratorio se podrían hacer experimentos de ELISA y comparar con los experimentos realizados con la proteína de guante. Ésta sería una prueba definitiva que el compuesto es el que modifica el reconocimiento de IgE a la proteína.

Determinar la alergenicidad de la tiorredoxina de *H. brasiliensis*.

Un resultado interesante fue detectar la presencia de la tiorredoxina en guantes, como se muestra en la sección 6.1. Determinar si la tiorredoxina contribuye a la alergenicidad del látex sería un aporte importante, sobre todo porque es potencialmente un alérgeno que puede generar reactividad cruzada. Con el fin de llevar a cabo este estudio se hicieron algunos avances; se decidió utilizar técnicas de biología molecular para expresarla y poder estudiarla. A partir de cADN de látex de la planta se amplificó el gen de la tiorredoxina h identificada en los guantes

(GenBank: FJ041113.2). La tiorredoxina se clonó, sobreexpresó y se purificó, en la **Figura 16** se muestran los pasos de purificación de la proteína.

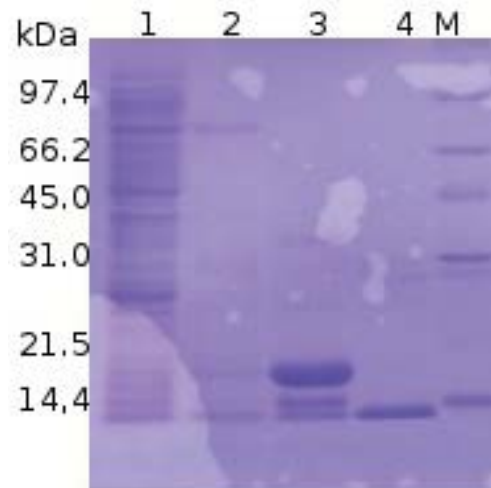


Figura 16. Gel SDS-PAGE mostrando los pasos de purificación de tiorredoxina. Carril 1: no afin a níquel. Carril 2: elución de columna de níquel con 50 mM de imidazol. Carril 3: elución de tiorredoxina de columna de níquel con 100 mM de imidazol. Carril 4: corte con TEV y recirculación por columna de níquel.

BIBLIOGRAFIA

- Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai, 2011. *Imunologia Celular e Molecular*, Rio de Janeiro: Elsevier.
- Adams, P.D., Afonine, P. V, Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 213–221. doi:10.1107/S0907444909052925
- Afonine, P. V, Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., Adams, P.D., 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 68, 352–67. doi:10.1107/S0907444912001308
- Akasawa, A., Hsieh, L.S., Lin, Y., 1996. Comparison of latex-specific IgE binding among nonammoniated latex, ammoniated latex, and latex glove allergenic extracts by ELISA and immunoblot inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 1116–20.
- Amarasekera, M., Rathnamalala, N., Samaraweera, S., Jinadasa, M., 2010. Prevalence of latex allergy among healthcare workers. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 23, 391–6. doi:10.2478/v10001-010-0040-5
- Andersen, N.H., Cao, B., Rodríguez-Romero, a, Arreguin, B., 1993. Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry* 32, 1407–22.
- Asensio, J.L., Cañada, F.J., Bruix, M., González, C., Khiar, N., Rodríguez-Romero, a, Jiménez-Barbero, J., 1998. NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: refined three-dimensional structure of the complex between hevein and methyl beta-chitobioside. *Glycobiology* 8, 569–77.
- Bannon, G.A., 2005. Hypersensitivity: Anaphylactic (Type I) 1–4. doi:10.1038/npg.els.0003999
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Bienvenu, F., Bienvenu, J., Rougé, P., 2009. Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3beta-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Mol. Immunol.* 46, 1595–604. doi:10.1016/j.molimm.2008.12.007
- Bartels, C., Xia, T. he, Billeter, M., Güntert, P., Wüthrich, K., 1995. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 6, 1–10. doi:10.1007/BF00417486
- Blanc, F., Vissers, Y.M., Adel-Patient, K., Rigby, N.M., Mackie, A.R., Gunning, a P., Wellner, N.K., Skov, P.S., Przybylski-Nicaise, L., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L.,

- Szépfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A.P.H., Bernard, H., Wal, J.-M., Savelkoul, H.F.J., Wichers, H.J., Mills, E.N.C., 2011. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1887–94. doi:10.1002/mnfr.201100251
- Blumenthal, M.N., 2004. New thoughts regarding the genetics of atopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 555–6. doi:10.1164/rccm.2401002
- Boettcher, M., Goettler, S., Eschenburg, G., Kracht, T., Kunkel, P., Von der Wense, A., Reinshagen, K., 2014. Prenatal latex sensitization in patients with spina bifida: a pilot study. *J. Neurosurg. Pediatr.* 13, 291–4. doi:10.3171/2013.12.PEDS13402
- Boye, J.I., Ma, C.Y., Ismail, A., Harwalkar, V.R., Kalab, M., 1997. Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins A and B. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1608–1618. doi:10.1021/jf960622x
- Chen, Z., Posch, a, Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M., Baur, X., 1998. Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 476–81.
- Cremer, R., Lorbacher, M., Hering, F., Engelskirchen, R., 2007. Natural rubber latex sensitisation and allergy in patients with spina bifida, urogenital disorders and oesophageal atresia compared with a normal paediatric population. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 17, 194–8. doi:10.1055/s-2007-965144
- Davis, P., Williams, S., 1998. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53, 102–105.
- Davis, P.J., Smales, C.M., James, D.C., 2001. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 56 Suppl 6, 56–60.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A., 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293. doi:10.1007/BF00197809
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. doi:10.1107/S0907444910007493
- García-Hernández, E., 1997. into the molecular basis of lectin-carbohydrate interactions: A calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of N-acetylglucosamine. *Proteins Struct. ...* 477, 467–477.
- Glaser, a G., Menz, G., Kirsch, a I., Zeller, S., Cramer, R., Rhyner, C., 2008. Auto- and cross-reactivity to thioredoxin allergens in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 63, 1617–23. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01777.x
- Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., 2003. Substructure search procedures for macromolecular structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1966–1973. doi:10.1107/S0907444903018043
- Hodge, E., Sayers, I., 2013. *Allergy* 1, 1–12. doi:10.1002/9780470015902.a0001887.pub3

- John D. Spengler, P.D., Jonathan M. Samet M.S., M.D., John F. McCarthy C.I.H., S.D., 2001. LATEX. *Indoor Air Qual. Handb.*
- Lee, M., Wang, N., Han, J., Lin, S., 2010. Estimating allergenicity of latex gloves using Hev b 1 and Hevamine. *J. Investig. ...* 20, 499–505.
- Lee, M.-F., Chen, Y.-H., Lin, H.-C., Wang, H.-L., Hwang, G.-Y., Wu, C.-H., 2006. Identification of hevamine and hev B 1 as major latex allergens in Taiwan. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 139, 38–44. doi:10.1159/000089521
- Long, O., 2001. RECENT ADVANCES IN THE MALAYSIA'S GLOVE INDUSTRY IN MEETING TODAY'S HEALTHCARE CHALLENGES, in: *Latex 2001.*
- Ma, X.-J., Gao, J.-Y., Chen, H.-B., 2013. Combined effect of glycation and sodium carbonate-bicarbonate buffer concentration on IgG binding, IgE binding and conformation of ovalbumin. *J. Sci. Food Agric.* doi:10.1002/jsfa.6157
- Mcglathlin, M.W., Schmid, E. V, 2001. Vulcanization of dip-molded rubber articles with molten media baths. WO2001077210 A2.
- Nettis, E., Delle Donne, P., Di Leo, E., Fantini, P., Passalacqua, G., Bernardini, R., Canonica, G.W., Ferrannini, A., Vacca, A., 2012. Latex immunotherapy: state of the art. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 109, 160–5. doi:10.1016/j.anai.2012.07.004
- Osterballe, M., Hansen, T., Mortz, C., 2005. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults - Osterballe - 2005 - *Pediatric Allergy and Immunology - Wiley Online Library. Pediatr. Allergy*
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* doi:10.1016/S0076-6879(97)76066-X
- Padovan, E., Mauri-Hellweg, D., Pichler, W.J., Weltzien, H.U., 1996. T cell recognition of penicillin G: structural features determining antigenic specificity. *Eur. J. Immunol.* 26, 42–8. doi:10.1002/eji.1830260107
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., Rodríguez, R., 2005a. 1,3-Beta-Glucanases As Candidates in Latex-Pollen-Vegetable Food Cross-Reactivity. *Clin. Exp. Allergy* 35, 345–51. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02186.x
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., Rodríguez, R., 2005b. 1,3-Beta-Glucanases As Candidates in Latex-Pollen-Vegetable Food Cross-Reactivity. *Clin. Exp. Allergy* 35, 345–51. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02186.x
- Palosuo, T., Antoniadou, I., Gottrup, F., Phillips, P., 2011. Latex Medical Gloves: Time for a Reappraisal. *Int. Arch. Allergy Immunol.* doi:10.1159/000323892
- Pedraza-Escalona, M., Becerril-Luján, B., Agundis, C., Domínguez-Ramírez, L., Pereyra, A., Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Romero, A., 2009. Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Mol. Immunol.* 46, 668–76. doi:10.1016/j.molimm.2008.08.282

- Peixinho, C.M., Gabriel, M.F., Caramelo-Nunes, C., Tavares-Ratado, P., Tomaz, C.T., 2013. Separation of the four most important latex allergens from latex gloves: A potential tool for diagnosis and immunotherapy purposes. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 20. doi:10.1016/j.aller.2013.03.003
- Peixinho, C.M., Tavares-Ratado, P., Gabriel, M.F., Romeira, a M., Lozoya-Ibanez, C., Taborda-Barata, L., Tomaz, C.T., 2012. Different in vivo reactivity profile in health care workers and patients with spina bifida to internal and external latex glove surface-derived allergen extracts. *Br. J. Dermatol.* 166, 518–24. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10656.x
- Reyes-López, C. a, Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A., Rodríguez-Romero, A., 2004. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 123–130. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.068
- Reyes-López, C. a, Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Santoyo, A., Rodríguez-Romero, A., 2006. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett.* 580, 2483–7. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.085
- Rodríguez-Romero, A., 1991. Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* 291, 307–309.
- Rodríguez-Romero, A., 1989. Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. ... *Biophys. Acta (BBA ...* 998, 21–24.
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Fuentes-Silva, D., Palomares, L. a, Muñoz-Cruz, S., Yépez-Mulia, L., Orozco-Martínez, S., 2014. Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo-β-1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 70, 329–41. doi:10.1107/S1399004713027673
- Roggen, E.L., 2006. Recent developments with B-cell epitope identification for predictive studies. *J. Immunotoxicol.* 3, 137–149. doi:10.1080/15476910600845690
- Rose, R.F., Lyons, P., Horne, H., Mark Wilkinson, S., 2009. A review of the materials and allergens in protective gloves. *Contact Dermatitis* 61, 129–37. doi:10.1111/j.1600-0536.2009.01580.x
- Sun, P., Ju, H., Liu, Z., Ning, Q., Zhang, J., Zhao, X., Huang, Y., Ma, Z., Li, Y., 2013. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. *Comput. Math. Methods Med.* doi:10.1155/2013/943636
- Terwilliger, T.C., 2003. SOLVE and RESOLVE: Automated Structure Solution and Density Modification. *Methods Enzymol.* doi:10.1016/S0076-6879(03)74002-6
- Terwilliger, T.C., Adams, P.D., Read, R.J., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P. V, Zwart, P.H., Hung, L.W., 2009. Decision-making in structure solution using

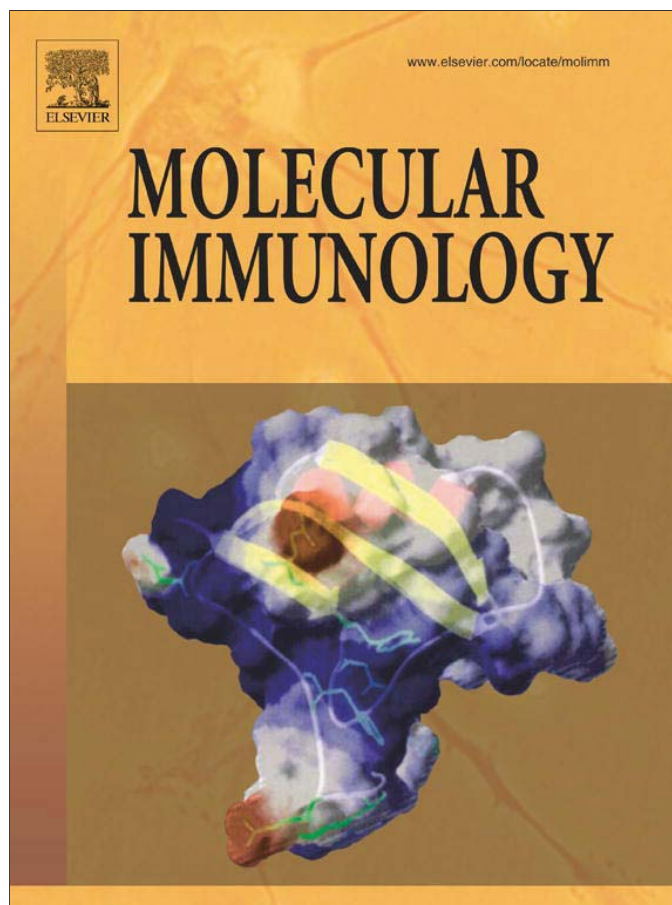
- Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65, 582–601. doi:10.1107/S0907444909012098
- Terwilliger, T.C., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P. V, Moriarty, N.W., Zwart, P.H., Hung, L.W., Read, R.J., Adams, P.D., 2008. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64, 61–69. doi:10.1107/S090744490705024X
- Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-003-0017-9
- Wagner, S., Breiteneder, H., 2002. The latex-fruit syndrome. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 935–940. doi:10.1042/BST0300935
- Weichel, M., Glaser, A.G., Ballmer-Weber, B.K., Schmid-Grendelmeier, P., Cramer, R., 2006. Wheat and maize thioredoxins: a novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 676–681. doi:10.1016/j.jaci.2005.11.040
- Yagami, A., Suzuki, K., Saito, H., Matsunaga, K., 2009. Hev B 6.02 is the most important allergen in health care workers sensitized occupationally by natural rubber latex gloves. *Allergol. Int.* 58, 347–55. doi:10.2332/allergolint.08-OA-0046
- Yagami, T., Haishima, Y., Tsuchiya, T., Tomitaka-Yagami, A., Kano, H., Matsunaga, K., 2004. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 3–11. doi:10.1159/000080036
- Yunginger, J., 2004. Mark C. Swanson, BA Charles E. Reed, MD Loren W. Hunt, MD. Capítulo 4 en: *Latex*. In *Indoor air quality handbook*. New York: McGraw-Hill.

ANEXO

Christian Galicia, Guillermo Mendoza-Hernández, Adela Rodríguez Romero

Impact of the vulcanization process on the structural characteristics and IgE recognition of two allergens, Hev b 2 and Hev b 6.02, extracted from latex surgical gloves

Molecular Immunology 65 (2015) 250–258



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

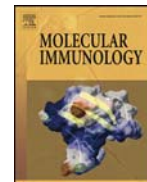
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Impact of the vulcanization process on the structural characteristics and IgE recognition of two allergens, Hev b 2 and Hev b 6.02, extracted from latex surgical gloves

Christian Galicia^a, Guillermo Mendoza-Hernández^b, Adela Rodríguez-Romero^{a,*}^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico^b Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2014

Received in revised form

17 December 2014

Accepted 18 January 2015

Keywords:

β-1,3-Glucanase

Hev b 2

Hev b 6.02

Hevein

Latex allergy

Surgical gloves

ABSTRACT

Latex allergy is a health problem that mainly affects medical environments, causing anaphylactic shocks in extreme cases. Sensitization and reactions to this material is closely linked to the use of latex gloves. The objective of this study was to purify two of the major allergens from latex surgical gloves to study the biochemical and structural changes that could be generated during the product manufacture and to compare their IgE recognition with the non-processed allergens. Glycosylated allergen Hev b 2 (β-1,3-glucanase) and Hev b 6.02 (hevein) were purified from glove extracts using affinity (Concanavalin A) and reversed-phase chromatographies, respectively. ELISA experiments were performed with both proteins and sera from allergic patients to assess the IgE recognition, which was heterogeneous. Crystallographic methods were used to obtain the 3D structure of Hev b 6.02 from surgical gloves, which did not show evident modification when compared with the protein from the natural non-processed form. Despite having the same crystallographic structure, the IgE from some patients showed different recognition when the glove and the natural allergen were used in ELISA. Furthermore, using electrophoretic techniques, we identified three forms of Hev b 2: one corresponding to the complete polypeptide chain with post-translational modifications, and two glycosylated fragments. The mixture of these three forms showed stronger recognition by IgE from latex-allergic patients than the pure non-processed allergen. In conclusion, IgE from subjects sensitized to latex products showed different recognition between the allergens obtained from a natural source and the processed material, even when the structure was maintained. This demonstrates the importance of using processed allergens in further investigations of diagnosis, prevalence, product allergenicity, and therapies.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Allergenic proteins are present in a wide variety of natural and processed products. During the manufacture of processed products, several harsh treatments such as heating or irradiation are used, which can modify the allergenic potential of such proteins. Examples of processed allergenic materials are those produced from different foods, such as egg (Golias et al., 2012), peanuts

(Blanc et al., 2011), fish, among other. Another important group of processed allergens are derived from natural rubber latex (NRL) of the *Hevea brasiliensis* tree, including surgical gloves, catheters, and dental dams, which are mainly employed in healthcare (Cabañes et al., 2012). Important progress in the management of latex allergy has been achieved by the use of non-powdered and low-protein gloves; however, these reports only refer to medical environments in developed countries (Palosuo et al., 2011; Wrangsjö et al., 2012). In general, the prevalence of IgE-mediated NRL allergy among healthcare workers has been estimated to be 3–17%, but it is higher (40–50%) in individuals who have undergone multiple surgeries, such as children with spina bifida (Amarasekera et al., 2010; Cremer et al., 2007).

The glove manufacturing process involves several steps after the harvesting of the latex from the *H. brasiliensis* tree, which is usually preserved in ammonia to prevent its coagulation (Spengler et al., 2001). A number of compounds such as aromatic amines, thiurams,

Abbreviations: HMWF, high molecular weight fraction; LMWF, low molecular weight fraction; ConA, concavaline A.

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, Mexico. Tel.: +52 5556224568; fax: +52 5556162217.

E-mail addresses: adela@unam.mx, aderod.rom@gmail.com (A. Rodríguez-Romero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.018>

0161-5890/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

and sulfur are added to the latex to obtain a final product with characteristics of elasticity, excellent tactility, and effectiveness as a barrier to pathogens. The vulcanization process includes a high temperature of usually 100 °C (Long, 2001; Spengler et al., 2001), but methods with higher temperatures of up to 200 °C have also been described (McGlothlin and Schmid, 2001). Nonetheless, even after these extreme procedures, allergenic proteins are present in NRL products that can affect the susceptible population. In NRL gloves, reports indicate the presence of Hev b 1 (rubber elongation factor), Hev b 2 (β -1,3-glucanase), Hev b 3 (small rubber particle protein), Hev b 5 (acid protein), Hev b 6.01 (hevein precursor), Hev b 6.02 (hevein), and Hev b 14 (hevamine) (Lee et al., 2010; Palosuo et al., 2011; Peixinho et al., 2012), with Hev b 6.02 being the most commonly found.

When a protein undergoes a thermal process, a partial or complete loss of its conformation is usually induced, which is initially reversible and eventually irreversible. After such treatments, some proteins could fold again, but not necessarily with the original conformation. For example, hydrophobic groups may become exposed, inducing aggregation by hydrophobic interactions. Also, disulfide bonds may rearrange either intra- or inter-molecule, which could produce protein multimers or aggregation as well (Boye et al., 1997). The effect of processed proteins in allergic reactions or sensitization has been studied extensively for food allergens. For instance, diminished allergic reaction to egg allergens in a mouse model was observed after allergen heating (Golias et al., 2012). Conversely, the immunogenicity can be enhanced if buried epitopes become exposed or if new epitopes are formed, which is the case for ovalbumin, one of the major allergens in egg (Ma et al., 2013). Also, a 90-fold rise in IgE binding to peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 was observed after roasting the product (Maleki and Chung, 2000). A different study revealed that different thermal treatments for peanuts produce different modifications: when Ara h 1 was boiled, its capability to bind specific IgE was diminished, while when it was extracted from roasted peanuts, it maintained its allergic capabilities (Blanc et al., 2011). The roasted protein also retained more of its secondary structure than the boiled one, suggesting that retaining the original folding after a thermal treatment is a determinant in maintaining allergenicity.

Even though thermal treatment is a constant among processed allergens, a very different treatment is suffered by latex allergens. Besides, these allergens act differently because in most cases they are not exposed to digestive enzymes, since the major routes of exposure are the skin and mucous membranes and therefore latex allergens will not necessarily have a similar behavior. Albeit there are reports on the presence of some allergens in latex gloves, very little is known about their integrity in these products. Therefore, the aim of this work was to investigate how latex allergens are structurally and immunologically affected after the manufacturing process. To assess this, we purified the major allergens Hev b 2 and Hev b 6.02 from latex surgical gloves (gHev b 2 and gHev b 6.02, respectively) to gain insight on how their structure and IgE recognition are affected after the process. We selected these two allergens based on their abundance and because their isolation and purification from the gloves was relatively easier. In addition, we identified the presence of some of the other allergenic proteins from *H. brasiliensis* in the gloves.

2. Materials and methods

2.1. Extraction of proteins from gloves

Protein extracts were obtained from surgical latex gloves used in medical institutions (Mexico City). The gloves were cut into approximately 1 cm² pieces and shaken for 48 h at 4 °C with 5 mL of phosphate buffer saline (PBS) per gram of material. Then, the

mixture was filtered to remove powder and pieces of glove, first through a Whatman no. 2 filter paper and then through a Millipore 0.45- μ m filter. The extract was concentrated using an ultrafiltration membrane with a molecular weight cut-off (MWCO) of 10 kDa on an Amicon stirred cell (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) to separate two fractions: one with proteins of molecular mass above 10 kDa and denominated as the high molecular weight fraction (HMWF), and the other with proteins below 10 kDa and denominated as the low molecular weight fraction (LMWF). The latter was then concentrated using a 3 kDa MWCO membrane. SDS-PAGE analysis of the extracted proteins was done under denaturing and reducing conditions.

2.2. Liquid chromatography/Electro spray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) analysis

After separation using SDS-PAGE electrophoresis, the bands of interest were cut out from the gel and treated for 5 min with 100 μ L of destaining solution (50% (v/v) methanol, 5% (v/v) acetic acid). After removing the solution, each gel band was incubated with 200 mM ammonium bicarbonate for 20 min, cut into small pieces, completely dehydrated with 100% acetonitrile, and vacuum-dried. The protein was hydrolyzed with 30 μ L of a porcine trypsin solution (20 ng μ L⁻¹; Promega, Madison, WI, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate, followed by incubation at room temperature for 12 h. Peptides were extracted with 50% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) formic acid for 30 min and separated using a nanoAcquity Ultra Performance LC System (Waters Corporations, Milford, MA, USA). Mass spectrometry (MS) analysis was carried out on a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a nanoelectrospray ion source (NanoSpray II) and a MicroIonSpray II head. Spectra were acquired in the automated mode using Information-Dependent Acquisition (IDA). Database searching and protein identification were performed with the MS/MS spectra datasets using the MASCOT search algorithm against the taxonomy of Viridiplantae (Green Plants) in the non-redundant NCBI (NCBIInr) database (version 1.6b9; Matrix Science, London, UK, available at <http://www.matrixscience.com>).

2.3. Chromatographic methods

Proteins from the two fractions (HMWF and LMWF) were purified using different chromatographic methods. To purify gHev b 6.02, the LMWF was loaded into a reversed-phase (RP) C18 column (Phenomenex® Jupiter 5 μ , 300 Å) using an HPLC system at a flow rate of 3.5 mL min⁻¹. A gradient of 0–60% acetonitrile/0.1% TFA was used to elute the protein. Acetonitrile was then eliminated using a SpeedVac™ system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

For Hev b 2, which is glycosylated, we used a 1-mL Concanavalin A (ConA)-Sepharose 4B affinity column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The column was equilibrated with 20 mM MES buffer and 0.5 M NaCl buffer, against which the HMWF was previously dialyzed. The retained proteins were eluted with 0.5 M α -D-mannopyranoside in the same buffer.

2.4. Purification of allergens from the natural source

To compare results from processed allergens with the natural ones, Hev b 2 and Hev b 6.02 were purified from fresh latex. Hev b 2 was purified as described previously with slight modifications (Fuentes-Silva et al., 2007). Latex luteoids were homogenized with a 0.3 M NaCl solution and the homogenate was dialyzed against distilled water for 48 h. The precipitate formed was separated by centrifugation and resuspended in 20 mL 50 mM MES buffer pH 6.5, 0.35 M NaCl. The sample was loaded onto a Con A-Sepharose

4B affinity column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and the protein was eluted with 0.5 M α -D-mannopyranoside in the same buffer. The protein was dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 8 containing 0.1 M NaCl and purified to homogeneity by cation-exchange chromatography using a 1 mL Resource S column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), a linear gradient from 0 to 1 M NaCl was used to elute the protein. Hev b 6.02 was purified following previous methodology (Reyes-López et al., 2006). Briefly, luteoids were homogenized with a 0.3 M NaCl solution, the homogenate was precipitated with ammonium sulfate to a 60% saturation. After centrifugation, the supernatant was precipitated at 100% ammonium sulfate saturation. The precipitate was separated by centrifugation and resuspended in distilled water, the sample was loaded onto a reversed-phase (RP) C18 column (Phenomenex® Jupiter 5 μ , 300 Å) using an HPLC system at a flow rate of 3.5 mL min⁻¹. A gradient of 0–60% acetonitrile/0.1% TFA was used to elute the protein. Acetonitrile was then eliminated using a SpeedVac™ system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

2.5. Protein quantification

Hev b 6.02 was quantified by absorption at 280 nm in a Shimadzu spectrophotometer with a 1 cm path length cuvette using the extinction coefficient for a 1% solution ($\epsilon^{1\%}$) of 25.4 (g/100 mL)⁻¹ cm⁻¹ of this protein. Quantification of other proteins, fractions, or extracts was estimated using the bicinonic acid protein assay following the manufacturer's recommendations (BCA™, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.6. Patients sera

Patients were identified as being allergic to latex through a history of allergic reactions, including anaphylaxis during surgery, allergic asthma and rhinitis, edema in eyelids and mouth labia, and hives in contact sites. Also, skin prick tests and latex-specific IgE in blood were used. The ethics committee of the Instituto Nacional de Pediatría, México approved this protocol. In addition, sera from eight allergic volunteers with a history of fruit allergy were used to test the recognition of Hev b 2. These patients showed positive skin prick test to maize, apple, peach, tomato, pear, carrot, melon, strawberry, and grape. The serum from one non-allergic individual was used as control for both allergens. The volunteers donated serum under informed consent.

2.7. IgE enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments

Each well of a 96-well Nunc MaxiSorp microliter plate was coated with 0.8 μ g of each protein for 12 h at 4 °C. After washing with 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS, the plates were blocked with 3.0% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS for 2.5 h at 37 °C. All patient sera were diluted to 1:10, and then 50 μ L were added to the wells. The plates were then incubated at 4 °C overnight. HRP-mouse anti-human IgE ϵ -chain specific (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) was diluted to 1:1000 with PBS containing 0.1% tween and 0.5% BSA and then applied to the wells. The plates were incubated for 1.5 h at 37 °C.

The color reaction was developed by adding 100 μ L of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) to the wells. After 15 min at room temperature, the plate was read at nm in a BioTek® plate spectrophotometer (Winooski, VT, USA). All absorbance values (Abs405) were calculated as the mean of three independent determinations. The mean Abs405 of the negative control was subtracted from all sample values. Cut-off values for positive reactions were considered by the Abs405 of the non-allergic individual plus three

times the standard deviation. A paired t-test was used to analyze the statistical differences in antigen recognition by IgE of the groups of patients.

For competitive ELISA, pools of three or four patients sera were used. The plates were coated with either nHev b 6.02 or gHev b 6.02 and blocked with 3.0% (w/v) BSA in PBS. The pools of sera were incubated with serial dilutions of the competing allergen (either gHev b 6.02 or nHev b 6.02) and with bovine serum albumin (BSA) as control, for 1 h at 37 °C and 50 μ L of the incubated sera samples were added to the wells. The plate was incubated for 1 h at 37 °C. The rest of the procedure was performed as described above for the direct ELISA. The result is presented as an inhibition curve where the absorbance of the sera incubated with BSA is considered a 0% inhibition and the absorbance of the control serum (from a non-allergic individual) is considered a 100% inhibition.

2.8. Fluorescence experiments of ligand binding to Hev b 6.02

Fluorescence spectroscopy experiments were carried out to record emission curves produced by the two tryptophanes (Trp21 and Trp23) at the carbohydrate-binding site of the gHev b 6.02 in the presence of N-acetyl-chitotriose (GlcNAc)₃. For comparison analysis, we performed the same experiments with nHev b 6.02. The binding affinities for (GlcNAc)₃ of both Hev b 6.02 samples were determined by monitoring the intrinsic tryptophan fluorescence change from 300 nm to 400 nm after addition of the ligand using an Olis® DM45 spectrofluorometer (Olis, Inc., Bogart, GA, USA). The excitation wavelength was set to 290 nm with a slit width of 3 nm, and the temperature was maintained at 25 °C using a Peltier system. Different amounts of the oligosaccharide prepared in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) with 1 mM EDTA were added to the protein solution (600 μ g/mL in the same buffer). Fluorescence was measured 2 min after mixing the solution with the ligand to allow for equilibrium. The changes in fluorescence intensities were used to calculate the dissociation constants for chitotriose by plotting the change in fluorescence at the wavelength of maximum emission (λ_{max} = 350 nm) against the ligand concentration. The resulting curve was fitted into the following equation:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max}[\text{ligand}]}{K_d + [\text{ligand}]}$$

2.9. Circular dichroism (CD) experiments of gHev b 2

CD measurements were performed at 20 °C using a Jasco-J700 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD, USA) equipped with a Peltier temperature control system. The gHev b 2 sample was dialyzed in 20 mM phosphate buffer at pH 7.5 and filtered through a 0.22 μ m membrane. Far-UV spectra were collected from 200 to 260 nm in a 0.1 cm path-length cell. Three scans were averaged to obtain the final spectra of the sample.

2.10. Protein crystallization and X-ray data collection of gHev b 6.02

Diffraction quality crystals were obtained in 0.1 M sodium citrate, 2 M ammonium sulfate, and a protein solution of 10 mg/mL in Tris buffer at pH 5.5, which was mixed in a 1:1 ratio with the reservoir solution using the vapor diffusion-sitting drop method. X-ray diffraction data were collected using the in-house Rigaku MicroMax007 with a rotating-anode generator (Cu, λ = 1.5416 Å) under cryogenic conditions (103 K) using 30% glycerol as a cryoprotectant. For sulfur-SAD phasing, we collected highly redundant data (940 frames of 0.5° oscillation) at 1.43 Å resolution with the crystal-to-detector distance set to the minimum possible value of

72 mm using a RAXIS IV++ image plate detector (Rigaku, The Woodlands, TX, USA). Diffraction data were processed and scaled using DENZO and SCALEPACK from the HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997), maintaining symmetry-related reflections separated during scaling.

2.11. Phasing and refinement of collected data

Structure determination and refinement were performed using the crystallographic suite of programs PHENIX (Adams et al., 2010). We used sulfur single-wavelength anomalous diffraction (S-SAD), considering the eight cysteine residues in the four-disulfide bonds present in the protein. Experimental phasing was performed with the AutoSol program (Terwilliger et al., 2009), which is a phasing algorithm that uses HySS (Hybrid Substructure Search) (Grosse-Kunstleve and Adams, 2003) for finding heavy-atom sites and SOLVE and RESOLVE (Terwilliger, 2003) for calculating experimental phases and for density modification. The polypeptide chain was partially built automatically with the AutoBuild program (from residue 6 to 39, 66% of the final structure) (Terwilliger et al., 2008) and completed manually in Coot (Emsley et al., 2010). The resulting model was iteratively refined with phenix.refine (Afonine et al., 2012). TLS refinement was performed in the final cycle at 1.43 Å resolution. In all rounds of refinement, the target function phased maximum-likelihood (MLHL) was used, as well as experimental phase restraints.

3. Results

3.1. Identification of allergens from surgical gloves

Fig. 1A shows the electrophoretic profiles of the HMWF and the proteins identified by the method described above. We detected the presence of the known allergens Hev b 2, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01 and Hev b 14, plus thioredoxin (Hev b Trx). Table 1 shows the identified allergens and their fragment scores obtained in the MASCOT database. Notably, more than one allergen was detected in some bands, and some allergens were detected in more than one band. For instance, Hev b 2 was identified in the band close to 38 kDa, which corresponds to its molecular weight, but also in some bands corresponding to lower molecular weights.

From the LMWF, we purified the most abundant peptide and identified it as Hev b 6.02 (gHev b 6.02). The electrophoretic profile of this allergen is compared with the non-processed nHev b 6.02 in Fig. 1B, showing the same migration in the gel for both proteins. Also, a MALDI-TOF spectrum for gHev b 6.02 showed m/z of 4728 Da expected for this protein (Supplementary Fig. S1).

3.2. Protein structure determination of gHev b 6.02 (hevein)

Crystals belonged to the trigonal space group P 31 2 1, as confirmed with POINTLESS (Evans, 2006), with cell unit dimensions of $a=37.33$, $b=37.33$, and $c=48.78$ Å. The crystal contained one molecule in the asymmetric unit, with a Matthews coefficient (VM) of 2.08 Å³/Da and 40.9% solvent content. The experimental map showed nine sulfur sites, eight of which corresponded to the four disulfide bonds. The crystal diffracted at 1.43 Å resolution, which lead to electron density maps of high quality, as shown in Fig. 2A.

Electron density maps 2Fo–Fc and Fo–Fc were interpreted with the 43 amino acids of the protein. The only region that we were not able to interpret was the side chain of the Asp43, probably due to the flexibility of the C-terminus. The overall structure is very similar to the one obtained for the nHev b 6.02 (PDB 1Q9B). The final model has the four disulfide bonds Cys3–Cys18, Cys12–Cys24, Cys17–Cys31, and Cys37–Cys41, a small antiparallel β -sheet including residues Cys17–Ser19 and Trp23–Gly25 connected by a β -turn

involving residues Ser19 to Gly22, and a small segment of α -helix comprising residues Asp28–Cys31. A C α superposition of the gHev b 6.02 with the nHev b 6.02 (PDB 1Q9B) (Reyes-López et al., 2004) gave an RMSD of 0.18 Å, indicating that no major changes were detected in the protein from gloves. The carbohydrate-binding site only showed minor differences in the conformation of Trp21. Other residues also exhibit different conformation such as Glu29, which is close to the binding site (Fig. 2B). Data collection and refinement statistics are summarized in Supplementary Table 1.

Interestingly, a high additional density peak was observed near the C-terminal region of the protein, which corresponded to the extra sulfur peak determined in the experimental map (Fig. 2C). We explain this density with a molecule of thiourea (TOU), which is used in the manufacture of latex products as an accelerator for the vulcanization process (Rose et al., 2009), suggesting that the protein carries this compound throughout the purification and crystallization processes. A hydrogen bond is formed between N-Asn40 and N1-TOU with a distance of 3.0 Å. In addition, the other two could be formed in atoms N-Asn40 with S-TOU (3.44 Å) and N-Cys4 with S-TOU (3.20), depending on whether the thiourea is in a thiol or thione form (tautomers). Also, the S-TOU is at a distance of 3.6 Å from the S γ -Cys41 in another probable interaction. No covalent bonds are observed in the electron density maps between the protein and the TOU molecule. After several cycles of phenix.refine, the B-factor for the thiourea molecule was 30 Å², which is the same than the value exhibited for residues Asn40 and Cys41 (the whole protein have an overall average B-factor of 20.9). Besides, its correlation coefficient was 0.9, suggesting that this molecule is very likely to be present in the crystal (Fig. 2D).

3.3. (GlcNAc)₃ (chitotriose) binding to gHev b 6.02 in comparison to nHev b 6.02

We analyzed the carbohydrate-binding site between both proteins using spectroscopic techniques. Hev b 6.02 has two Trp residues in this with a fluorescence emission spectrum centered at 350 nm, indicating an exposed localization in the native folded conformation. As observed in Fig. 3A, both samples produced an increased fluorescence intensity at $\lambda_{\text{max}}=350$ nm and a slight shift towards shorter wavelength (blue shift), meaning an environment of low polarity after chitotriose binding. The differences in the fluorescence intensity (Δ IF) after the addition of the different ligand concentrations produce similar curves with K_d values of 68.01 and 66.9 μ M for the natural protein and glove protein, respectively (Fig. 3B).

3.4. IgE binding to gHev b 6.02 in comparison to nHev b 6.02

In a direct ELISA assay, from eight latex allergic-patients, IgE from four recognized similarly gHev b 6.02 and nHev b 6.02, while three showed increased recognition to gHev b 6.02. The serum from one patient did not react to either one of the samples (Fig. 4A). A paired t-test indicates that this experiment does not show a significant difference in the recognition of the two forms of the allergen by this group of patients ($p=0.11$). Since three patients clearly showed an increased recognition for gHev b 6.02 we decided to further investigate the different recognition of the IgE from the patients, to achieve this competitive ELISA assays were performed. The allergen gHev b 6.02 inhibited the recognition of IgE from a pool of patients (2, 3, 4 and 7) sera to nHev b 6.02, the maximum inhibition was obtained when the pool was incubated with a 100 ng/mL solution of gHev b 6.02 (Fig. 4B). The allergen nHev b 6.02 was not able to inhibit the recognition to gHev b 6.02 neither by the IgE from the pool of patients 2, 3, 4 and 7 sera nor by the pool of sera from patients 1, 5 and 6, even at concentrations up to 16 μ g/mL.

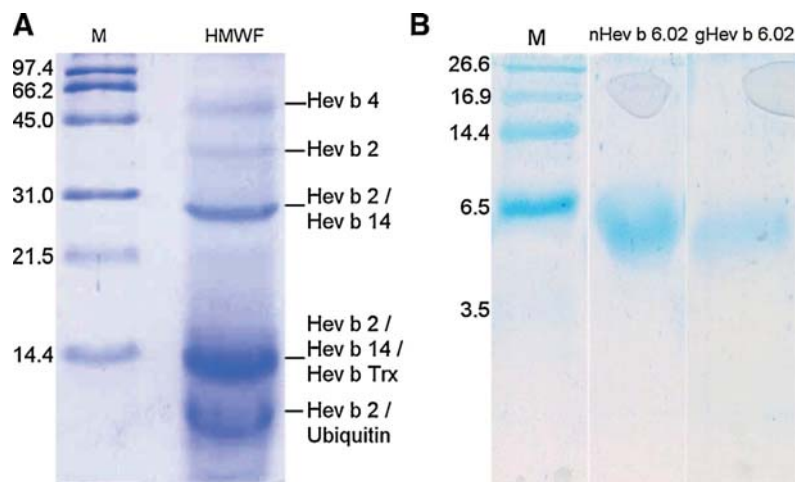


Fig. 1. SDS/PAGE gels showing the identified proteins in the surgical gloves. Lanes M show the molecular weight-size markers (kDa). (A) Proteins present in the HMWF. (B) Shows gHev b 6.02 which was present in the LMWF, and nHev b 6.02 for comparison.

Table 1
Proteins identified by LC/ESI-MS/MS in gloves extracts.

Protein	Molecular mass/pI	Accession number ^a	Coverage (%)	MS/MS peptide sequence (ion scores)
Hev b 4	41.1/4.6	Q5VLJ6	49	SELDEYLFSGDGLYDAGNAK (73), FIYPDKYLPYHHPYCTTFDDYPTGR (75) TVVDFVAENVSLPR (104), IPPFK (15), FASEGATASDSNPLIDFR (134), DFGELK (26), GADDYLNYEIPSEASR (52), EQLESIVDVVLGNISDR (102), ELYDFGAR (46), KPVVENVAPLGLIPFIK (67), LPQJLEK (48), EIIDAPGEHGFK (60), ESGFISPYGVK (61)
Hev b 2	41.5/9.5	ABN03966	22	NLPPVSEVIALYK (69), IYDPNQAVLEALR (90), GFWSSVR (30), YIAVGNEISPVNR (80), SPLLANIYPYFTYAGNPR (67), TYLSNLIQHVK (33), HFGLFFPNK (46)
Hev b 14	22.1/8.3	E7BQV3	63	YSYVNIAFLNK (91), FNGQTPQINLAGHCNPAAGGCTIVSNGIR (53), VMLSLGGGIGSYTLASQADAK (137), NVADYLWSNFLGGK (89), SSSRPLGDAVLGDIDIEHGSTLYWDDLAR (190), YLSAYSKQGK (53), VYLTAAPQCFFPDR (86)
Hev b 5	16.1/4	Q39967	19	TEEPAPEADQITPEEKPAEPEPVAEEEPK (70)
Hev b 6.01	22.1/5.4	Q6JYR0	27	CLSVTNTGTGAK (60), NGGLDLDVNVFR (67), QLDTDGKGYER (55), GHILTVNYQFVD (78)
Thioredoxin	13.8/4.8	Q9XF70	8	LVGANPEEIR (49)

^a UniprotKnowledge database.

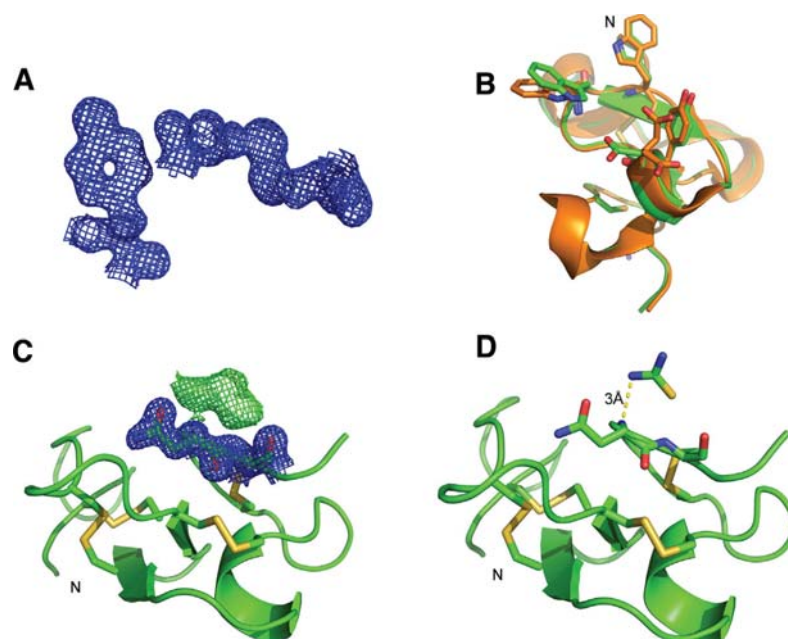


Fig. 2. (A) Two regions of the 2Fo-Fc map ($\sigma = 1$), in the left Tyr30 and in the right a disulfide bridge between residues Cys12 and Cys24. (B) Superposition of gHev b 6.02 (PDB 4WP4) (green) with nHev b 6.02 (PDB 1Q9B) (orange). (C) Model of gHev b 6.02 showing the omission map ($\sigma = 3$) in the region of the TOU molecule and the electron density ($\sigma = 1$) in the amino acids close to it. (D) gHev b 6.02 model showing the TOU molecule.

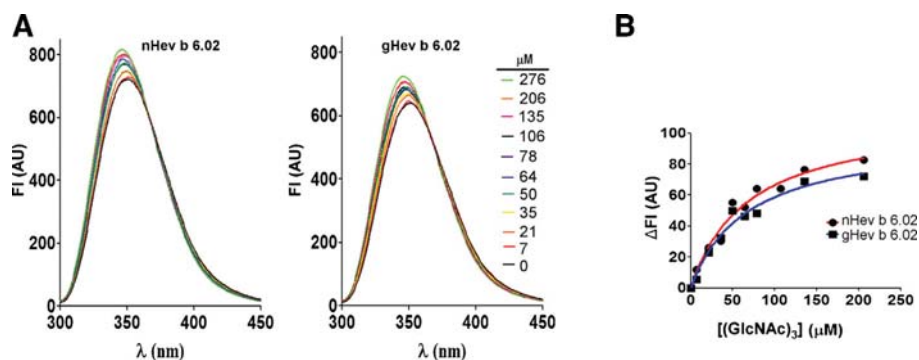


Fig. 3. (A) Fluorescence intensities of gHev b 6.02 and nHev b 6.02 at different ligand (GlcNAc)₃ concentrations. (B) Nonlinear regression analysis of the relative fluorescence intensity changes of the gHev b 6.02 and nHev b 6.02 samples in the presence of various concentrations of (GlcNAc)₃.

3.5. Characterization of Hev b 2 (β-1,3-glucanase) present in gloves

The glycosylated fraction with affinity to ConA showed three bands in SDS-PAGE electrophoresis, which were all identified as Hev b 2 after being excised and identified by the ESI-MS/MS method. The band with higher relative molecular mass (Mr) corresponded to the same electrophoretic profile as the non-processed Hev b 2 (nHev b 2; 38.1 kDa), while the other two had lower

Mr, indicating allergen fragmentation during gloves manufacture (Fig. 5A). The most prominent form of Hev b 2 in gloves has an apparent mass of about 31 kDa. All further experiments were performed using the sample containing these three forms of the allergen (gHev b 2).

The CD spectrum of gHev b 2 is not characteristic of a predominant α-helix structure, as expected for the non-processed protein, considering the 38% α-helix and 17% β-sheet content in its crystal structure (PDB 4HPG) (Rodríguez-Romero et al., 2014). However, the spectrum does not correspond to that of an unstructured protein, indicating that the glove allergen retains some of its secondary structure (Fig. 5B).

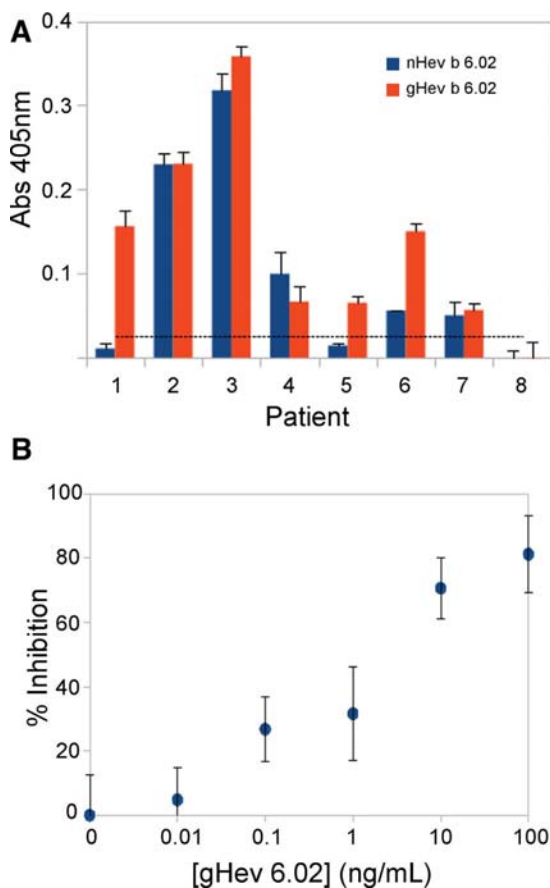


Fig. 4. (A) IgE-ELISA experiments showing recognition of sera from eight latex-allergic patients to gHev b 6.02 and nHev b 6.02. The dotted line indicates the cut-off criteria for a positive reaction. (B) Competitive ELISA experiment. The plate was coated with nHev b 6.02 and the competing allergen was gHev b 6.02.

3.6. IgE binding to gHev b 2 in comparison to nHev b 2

Sera from all eight latex-allergic patients recognized gHev b 2, and only seven of them recognized nHev b 2. All sera from the fruit-allergic patients (n = 8) were able to recognize both samples. However, six of the latex-allergic patients exhibited increased binding for gHev b 2 (Fig. 6A), while seven of the fruit-allergic patients showed decreased binding to gHev b 2 in comparison to nHev b 2 (Fig. 6B). The statistical analysis shows a significant difference in how these two forms of the allergen were recognized by IgE from the latex-allergic group (p < 0.02) and the fruit-allergic group (p < 0.001). The experiments showed that different groups of allergic individuals have IgEs with different specificities.

4. Discussion

We analyzed some structural and biochemical aspects of the major allergens Hev b 6.02 and Hev b 2 present in latex surgical gloves after the vulcanization process and the other treatments involved in their manufacture; such as latex collection and preservation, lubrication, etc. Thermal stability has been recognized as a common characteristic for many allergens (Montserrat et al., 2013; Sharp et al., 2014; Usui et al., 2013). In agreement with these reports, it is remarkable that proteins detected in the studied gloves were almost exclusively known allergenic proteins. In addition to the latex allergens classified by the International Union of Immunological Societies (IUIS), we detected thioredoxin (Hev b Trx) in this material. This protein has been included in the Allergome Database (<http://www.allergome.org>), since it was identified as an IgE-interactive protein in a proteomic report of *H. brasiliensis* (Yagami et al., 2004). Thioredoxin has also been recognized as an allergen in other plants such as corn and wheat, and it has been demonstrated that IgE from allergic individuals cross-react in the presence of thioredoxins from these two sources (Weichel et al., 2006).

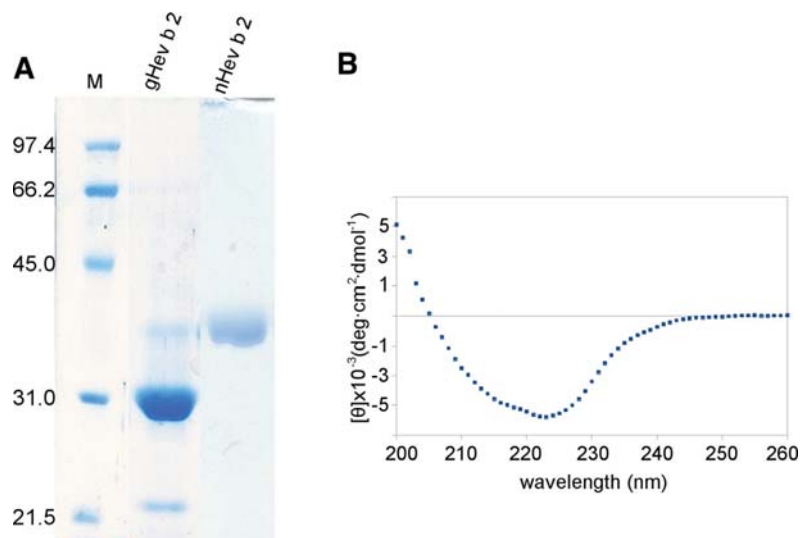


Fig. 5. (A) SDS/PAGE gel: Lane M, molecular weight-size markers (kDa); lane gHev b 2 shows the obtained fraction after purification with ConA, the three bands were identified as Hev b 2; the electrophoretic profile of nHev b 2 is shown for comparison. (B). CD spectrum of gHev b 2 in the far-UV region.

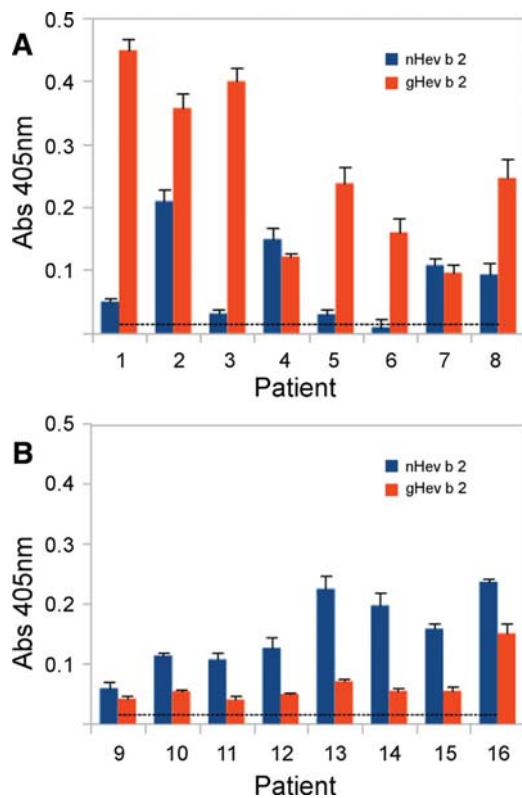


Fig. 6. IgE-ELISA experiments. (A). Recognition of sera from eight latex-allergic patients to gHev b 2 and nHev b 2. (B). Recognition of sera from eight fruit-allergic patients to gHev b 2 and nHev b 2. The dotted line indicates the cut-off criteria for a positive reaction.

Therefore, it is possible that Hev b Trx plays a role in cross-reactivity in people that are sensitized to thioredoxin from other sources.

The high-yield purification of gHev b 6.02 in its complete, properly folded form demonstrates the stability and resistance of the protein due to its compact structure stabilized by four disulfide bonds (Rodríguez-Romero, 1991). Likewise, other allergenic

proteins such as some plant lipid transfer proteins exhibit high thermal stability, which is often conferred by disulfide bonds (Ivanciuc et al., 2009). An example is the resistance to thermal treatment and maintained IgE recognition of the cherry allergen Pru av 3 (Scheurer et al., 2004). In the NRL surgical gloves that we examined, Hev b 6.02 was by far the most abundant protein, with an average yield of 118–196 μg per gram of material, depending on the product batch examined. The resistance of this allergen to high temperatures is consistent with a previous study, where a T_m value of 90 °C at pH 3.7 was reported for this protein (Hernández-Arana et al., 1995). The crystal structure of gHev b 6.02 (PDB entry 4WP4) clearly shows that there are no modifications in the polypeptide chain when compared with the structure of the natural one (PDB 1Q9B).

Interestingly, extra electron density appeared near the C-terminal region in the electron density maps (Fig. 2C), which we interpreted as a thiourea molecule, considering that this organic compound could have been carried by the protein from the manufacture process. Furthermore, we could determine that the protein conserved its biological activity as a lectin, since the K_d values for the ligand $(\text{GlcNAc})_3$ were very similar between the two proteins. These values are also similar to previously reported results calculated by NMR techniques (86.5 μM) (Asensio et al., 1998). In accordance with the crystallographic structure, these results indicate that the arrangement of the amino acids involved in the carbohydrate-binding site is intact. It is important to mention that some residues of the site are also part of a conformational epitope (Pedraza-Escalona et al., 2009).

Notably, even with highly similar structures, the competitive ELISA experiments showed that gHev b 6.02 is capable of completely inhibit the recognition of nHev b 6.02. Since the only difference appreciated in the crystallographic structure was a molecule interacting with the protein, presumably thiourea bound during manufacture, we suggest that this compound might be the responsible of the different affinity to IgE when compared to nHev b 6.02.

Glycosylation moieties have been reported to play an essential role in the recognition of some allergens by IgE of allergic patients, such as the egg allergen ovomucoid (Benedé et al., 2013) and a variety of allergens from red meat containing galactose- α -1,3-galactose (Apostolovic et al., 2014). This is also the case for Hev b 2 (β -1,3-glucanase), for which two main isoforms have been described (Chungchow et al., 1995); however, the purification

method used allowed us to isolate isoform II from gloves extracts. We have previously demonstrated that the allergenic capability of this isoform of Hev b 2 is diminished when the N-glycosylation moieties are enzymatically removed. We also found that there are three posttranslational modifications (two N-glycosylations and a N-terminal pyroglutamate) that form a patch on the surface of this isoform that are coalescent on the molecular surface with the N and C terminal regions (epitopes 1 and 8 identified by Barre et al., 2009); which we proposed as a conformational epitope (Rodríguez-Romero et al., 2014). These carbohydrates include α -1,3-fucose bound to N-acetylglucosamine that is a common configuration in glycosylated proteins from plants and insects. Considering the possibility that this protein could still be glycosylated in the gloves, we purified it from this material using a ConA affinity column. Interestingly, not only the complete polypeptide chain of Hev b 2 retained the glycan moieties, but also fragments of the allergen, suggesting that these fragments also play a role in the allergenic potential of surgical gloves for Hev b 2-sensitized patients.

β -1,3-glucanase is a very conserved plant defense-related protein that is involved in cross-reactivity reactions with pollen and fruit allergens, sharing epitopes with other allergenic glucanases such as the one from banana (*Musa acuminata*) (Barre et al., 2009; Palomares et al., 2005). Hence, we decided to test the IgE reactivity from fruit-allergic individuals to gHev b 2, in addition to the sera from latex-allergic patients. Both groups of patients were able to recognize gHev b 2. Remarkably, IgE from latex-allergic patients showed increased binding to gHev b 2 in comparison to nHev b 2, while IgE from fruit-allergic patients showed the contrary. These results suggest that these two groups of patients are sensitized to different epitopes, probably the glycosylated epitope is the main recognition site for the latex-allergic patients, while the fruit-allergic group mainly recognize a different epitope; as one of those previously proposed for this allergen (Barre et al., 2009). If the fruit-allergic group recognizes an epitope that was lost after the manufacture process, this group would only react to the complete form of Hev b 2, which is not abundant in the gloves sample.

In summary, our results provide the first structural evidence that some allergens such as Hev b 6.02 maintain their three-dimensional structure, even after harsh procedures such as vulcanization. Others such as Hev b 2 maintain their IgE-binding capacity even after protein fragmentation. This study demonstrates the importance of testing the ultimate conformation of an allergen that undergoes a manufacturing process from the initial raw material. The unprocessed allergen might not always be the most adequate material for diagnosis or even for a therapy design, since we demonstrated here that IgE recognition is different, even when the allergen apparently does not suffer any structural modifications.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant PAPIIT-1N207613 to A.R.-R.) and CONACYT (Grant 82947 to A.R.-R. and scholarship 376038 to C.G.). We thank Dr. Socorro Orozco-Martínez from Instituto Nacional de Pediatría for providing patients' sera and M. en C. Georgina Espinosa-Perez, Quím. Eréndira García-Ríos, and Q.F.B. Rocio Patiño-Maya for technical support. We also thank the Laboratorio de Estructura de Proteínas LANEM-UNAM. This work is part of the PhD thesis (C.G.) of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.018>.

References

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 213–221, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., Adams, P.D., 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 68, 352–367, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444912001308>.
- Amarasekera, M., Rathnamalala, N., Samaraweera, S., Jinadasa, M., 2010. Prevalence of latex allergy among healthcare workers. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 23, 391–396, <http://dx.doi.org/10.2478/v10001-010-0040-5>.
- Apostolovic, D., Tran, T.A., Hamsten, C., Starkhammar, M., Cirkovic Velickovic, T., van Hage, M., 2014. Immunoproteomics of processed beef proteins reveal novel galactose- α -1,3-galactose-containing allergens. *Allergy* 69, 1308–1315, <http://dx.doi.org/10.1111/all.12462>.
- Asensio, J.L., Cañada, F.J., Bruix, M., González, C., Khair, N., Rodríguez-Romero, A., Jiménez-Barbero, J., 1998. NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: refined three-dimensional structure of the complex between hevein and methyl beta-chitobioside. *Glycobiology* 8, 569–577.
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Bienvenu, F., Bienvenu, J., Rougé, P., 2009. Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3beta-D-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Mol. Immunol.* 46, 1595–1604, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.007>.
- Benedé, S., López-Fandiño, R., Reche, M., Molina, E., López-Expósito, I., 2013. Influence of the carbohydrate moieties on the immunoreactivity and digestibility of the egg allergen ovomucoid. *PLoS One* 8, e80810, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080810>.
- Blanc, F., Vissers, Y.M., Adel-Patient, K., Rigby, N.M., Mackie, A.R., Gunning, A.P., Wellner, N.K., Skov, P.S., Przybylski-Nicaise, L., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szépfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A.P.H., Bernard, H., Wal, J.-M., Savelkoul, H.F.J., Wichers, H.J., Mills, E.N.C., 2011. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1887–1894, <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100251>.
- Boye, J.I., Ma, C.Y., Ismail, A., Harwalkar, V.R., Kalab, M., 1997. Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins A and B. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1608–1618, <http://dx.doi.org/10.1021/jf960622x>.
- Cabañes, N., Igea, J.M., de la Hoz, B., Agustín, P., Blanco, C., Domínguez, J., Lázaro, M., Leonart, R., Méndez, J., Nieto, A., Rodríguez, A., Rubia, N., Tabar, A., Beitia, J.M., Dieguez, M.C., Martínez-Cóccera, C., Quirce, S., 2012. Latex allergy: position paper. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 22, 313–330.
- Chungchow, N., Suntaro, A., Wittsuwannakul, R., 1995. β -1, 3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 39 (3), 505–509, [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00974-C](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00974-C).
- Cremer, R., Lorbacher, M., Hering, F., Engelskirchen, R., 2007. Natural rubber latex sensitization and allergy in patients with spina bifida, urogenital disorders and oesophageal atresia compared with a normal paediatric population. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 17, 194–198, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-965144>.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coat. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- Evans, P., 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 72–82, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444905036693>.
- Fuentes-Silva, D., Mendoza-Hernández, G., Stojanoff, V., Palomares, L.A., Zenteno, E., Torres-Larios, A., Rodríguez-Romero, A., 2007. Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63 (Pt 9), 787–791, <http://dx.doi.org/10.1107/S1744309107039838>.
- Golias, J., Schwarzer, M., Wallner, M., Kverka, M., Kozakova, H., Srutkova, D., Klimesova, K., Sotkovsky, P., Palova-Jelinkova, L., Ferreira, F., Tuckova, L., 2012. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One* 7, e37156, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037156>.
- Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., 2003. Substructure search procedures for macromolecular structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1966–1973, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444903018043>.
- Hernández-Arana, A., Rojo-Domínguez, A., Soriano-García, M., Rodríguez-Romero, A., 1995. The thermal unfolding of hevein, a small disulfide-rich protein. *Eur. J. Biochem.* 228, 649–652.
- Ivanciu, O., Garcia, T., Torres, M., Schein, C.H., Braun, W., 2009. Characteristic motifs for families of allergenic proteins. *Mol. Immunol.* 46, 559–568, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.034>.

- Lee, M., Wang, N., Han, J., Lin, S., 2010. Estimating allergenicity of latex gloves using Hev b 1 and Hevamine. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 20, 499–505.
- Long, O., 2001. Recent advances in the Malaysia's glove industry in meeting today's healthcare challenges. In: *Latex Conference, Munich Germany 4-5 Dec 2001*.
- Ma, X.-J., Gao, J.-Y., Chen, H.-B., 2013. Combined effect of glycation and sodium carbonate-bicarbonate buffer concentration on IgG binding, IgE binding and conformation of ovalbumin. *J. Sci. Food Agric.*, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6157>.
- Maleki, S., Chung, S., 2000. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 763–768, <http://dx.doi.org/10.1067/mai.2000.109620>.
- Mcglothlin, M.W., Schmid, E.V., 2001. Vulcanization of Dip-Molded Rubber Articles with Molten Media Baths. WO2001077210 A2.
- Montserrat, M., Mayayo, C., Sánchez, L., Calvo, M., Pérez, M.D., 2013. Study of the thermoresistance of the allergenic Ara h1 protein from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Agric. Food Chem.* 61, 3335–3340, <http://dx.doi.org/10.1021/jf305450s>.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76066-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76066-X).
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., Rodríguez, R., 2005. 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin. Exp. Allergy* 35, 345–351, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02186.x>.
- Palosuo, T., Antoniadou, I., Gottrup, F., Phillips, P., 2011. Latex medical gloves: time for a reappraisal. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, <http://dx.doi.org/10.1159/000323892>.
- Pedraza-Escalona, M., Becerril-Luján, B., Agundis, C., Domínguez-Ramírez, L., Pereyra, A., Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Romero, A., 2009. Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Mol. Immunol.* 46, 668–676, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.282>.
- Peixinho, C.M., Tavares-Ratado, P., Gabriel, M.F., Romeira, A.M., Lozoya-Ibanez, C., Taborada-Barata, L., Tomaz, C.T., 2012. Different in vivo reactivity profile in health care workers and patients with spina bifida to internal and external latex glove surface-derived allergen extracts. *Br. J. Dermatol.* 166, 518–524, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10656.x>.
- Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A., Rodríguez-Romero, A., 2004. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 123–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.068>.
- Reyes-López, C.A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Santoyo, A., Rodríguez-Romero, A., 2006. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett.* 580 (10), 2483–2487, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.085>.
- Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K.G., Soriano-García, M., 1991. Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* 291, 307–309.
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Fuentes-Silva, D., Palomares, L.A., Muñoz-Cruz, S., Yépez-Mulia, L., Orozco-Martínez, S., 2014. Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo-β-1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 70, 329–341, <http://dx.doi.org/10.1107/S1399004713027673>.
- Rose, R.F., Lyons, P., Horne, H., Mark Wilkinson, S., 2009. A review of the materials and allergens in protective gloves. *Contact Dermatitis* 61, 129–137, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01580.x>.
- Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., San Miguel Moncin, M., Retzek, M., Hartz, C., Enrique, E., Lidholm, J., Cistero-Bahima, A., Vieths, S., 2004. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 900–907, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.06.017>.
- Sharp, M.F., Kamath, S.D., Koeberl, M., Jerry, D.R., O'Hehir, R.E., Campbell, D.E., Lopata, A.L., 2014. Differential IgE binding to isoallergens from Asian seabass (*Lates calcarifer*) in children and adults. *Mol. Immunol.* 62, 77–85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.010>.
- Spengler, J.D., Samet, J.M., McCarthy, J.F., 2001. *Latex*. In: *Indoor Air Quality Handbook*. McGraw-Hill, New York.
- Terwilliger, T.C., 2003. SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Methods Enzymol.* 374, 22–37, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74002-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74002-6).
- Terwilliger, T.C., Adams, P.D., Read, R.J., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Zwart, P.H., Hung, L.W., 2009. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65, 582–601, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909012098>.
- Terwilliger, T.C., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Moriarty, N.W., Zwart, P.H., Hung, L.W., Read, R.J., Adams, P.D., 2008. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64, 61–69, <http://dx.doi.org/10.1107/S090744490705024X>.
- Usui, M., Harada, A., Ishimaru, T., Sakumichi, E., Saratani, F., Sato-Minami, C., Azakami, H., Miyasaki, T., Hanaoka, K., 2013. Contribution of structural reversibility to the heat stability of the tropomyosin shrimp allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 948–953, <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120887>.
- Weichel, M., Glaser, A.G., Ballmer-Weber, B.K., Schmid-Grendelmeier, P., Cramer, R., 2006. Wheat and maize thioredoxins: a novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 676–681, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.040>.
- Wrangsjö, K., Boman, A., Lidén, C., Meding, B., 2012. Primary prevention of latex allergy in healthcare-spectrum of strategies including the European glove standardization. *Contact Dermatitis* 66, 165–171, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2012.02057.x>.
- Yagami, T., Haishima, Y., Tsuchiya, T., Tomitaka-Yagami, A., Kano, H., Matsunaga, K., 2004. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 3–11, <http://dx.doi.org/10.1159/000080036>.

Appendix A. Supplementary data

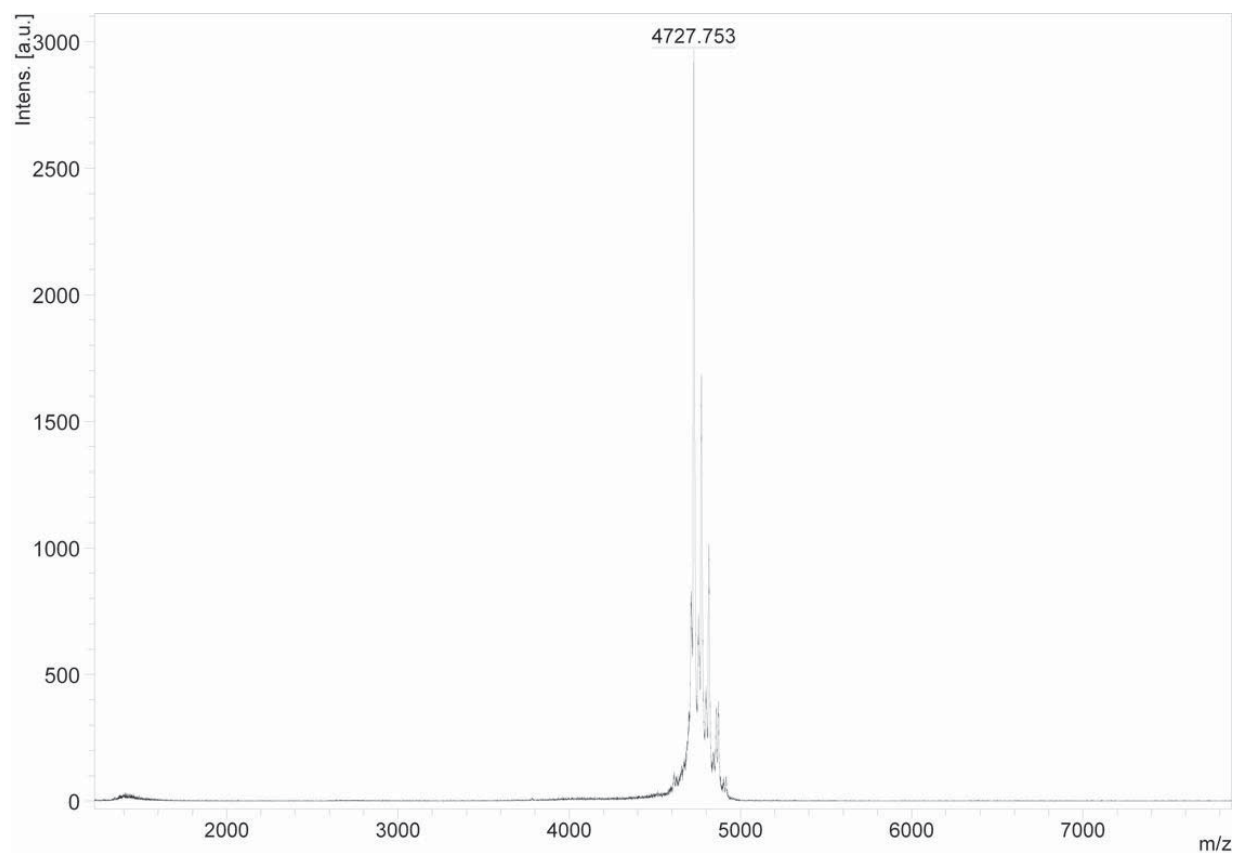


Figure S1. Positive ion MALDI-TOF mass spectra in the linear mode obtained for Hev b 6.02 from gloves showing the expected mass of the complete protein of 4727 Da. The matrix used was α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid.

Table S1. Data collection and refinement statistics. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

<i>Data collection</i>	
Space group	P 3 ₁ 2 1
Resolution (Å)	26.95-1.43 (1.48-1.43)
Unit cell parameters a, b, c (Å)	37.33, 37.33, 48.78
No. of unique reflections	13802 (1330)
Redundancy	11.8 (10.4)
Completeness (%)	99 (96.7)
Average I/σ	64.6 (24.4)
R_{merge} (%)	5.8 (18.6)
R_{pim} (%)	1.7 (5.9)
<i>Refinement</i>	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%) ^a	15.1/16.6
No. of non-hydrogen atoms	386
Average B-factors (Å ²)	20.0
Protein/water atoms	329/53
Ligand atoms	4
Rms deviations:	
Bond lengths (Å)	0.014
Bond angles (°)	1.45
PDB code	4WP4

^a R_{free} test set comprises 9.9% of the randomly selected reflections omitted from a model refinement.