



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación de la reactividad cruzada entre antígenos alergénicos del polen de *Amaranthus palmeri* y de *Chenopodium album*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CIBELES ANAYANTZI JERÓNIMO LÓPEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado Asignado

PRESIDENTE:	Profesor: Enrique Ortega Soto
VOCAL:	Profesor: Gibrán Pérez Montesinos
SECRETARIO:	Profesor: César Augusto Sandino Reyes López
1er. SUPLENTE:	Profesor: Luis Ángel Flores Mejía
2º SUPLENTE:	Profesor: Octavio Castro Escamilla

El presente trabajo de tesis de licenciatura se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica Estructural de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Asesor del tema

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

Sustentante

Cibeles Anayantzi Jerónimo López

Agradecimiento

Al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE- CONACYT por el apoyo recibido para la realización de este proyecto bajo el No. de registro SALUD-14-01-233729-01-041.

Índice

Portada

Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	3
2.1 Respuesta inmune: innata y adaptativa	3
2.2 Inmunoglobulinas.....	4
2.3 Hipersensibilidad.....	7
2.4 Rinitis alérgica y asma	11
2.5 Respuesta Th2.....	12
2.6 Aeroalergenos: polen.....	15
2.7 Tratamientos para la rinitis alérgica y asma.....	17
2.8 Inmunoterapia de alérgenos específicos	19
3. Antecedentes	21
3.1 Inmunoterapia a polinosis	21
3.2 Identificación de especies alérgicas.....	23
3.3 Identificación y caracterización de antígenos	24
3.4 Especies alérgicas en México.....	27

3.4.1 <i>Amaranthaceae</i>	30
3.4.2. <i>Chenopodiaceae</i>	32
4. Hipótesis	36
5. Objetivo	36
5.1 Objetivos específicos.....	36
6. Materiales.....	37
6.1 Material Biológico	37
6.2 Soluciones preparadas.....	39
6.3 Productos Comerciales	41
6.4 Columnas de Cromatografía	41
6.5 Equipos	42
7. Métodos	43
7.1 Elaboración de la curva patrón determinación de concentración proteica: Técnica de Bradford	43
7.2 Evaluación de la presencia de IgE específicas para alérgenos del polen de <i>Chenopodium album</i> por ELISA.....	44
7.3 Análisis electroforético del extracto alergénico de <i>Chenopodium album</i>	46
7.4 Ensayos de inmunodetección por <i>Western blot</i>	47
7.5 Métodos de purificación.....	49
7.5.1 Diálisis	49

7.5.2 Aislamiento de antígenos alergénicos por técnicas cromatográficas.	50
7.6 Identificación de antígenos alergénicos por espectrometría de masas.	54
7.7 Evaluación de reactividad cruzada de antígenos alergénicos con proteínas del polen de por inhibición por ELISA.	56
8. Resultados y Análisis.	58
8.1 Concentración de proteínas totales del extracto alergénico del polen de <i>Chenopodium album</i>	58
8.2 Determinación de la presencia de IgE en el suero de pacientes alérgicos a través de ensayos de ELISA.	59
8.3 Perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto alergénico del polen de <i>Chenopodium album</i>	62
8.4 Identificación de las fracciones alergénicas reconocidas con mayor frecuencia en el suero de diferentes pacientes alérgicos.	65
8.5 Aislamiento de Antígenos reconocidos por IgE de pacientes alérgicos.	67
8.5.1 Aislamiento inicial: Cromatografía de Exclusión Molecular.	67
8.5.2 Purificación por cromatografía de Intercambio Iónico.	70
8.5.3 Purificación por cromatografía de fase reversa.	72
8.6 Identificación de proteínas alergénicas por espectrometría de masas.	76
8.7 Inhibición de la unión a IgE de pacientes alérgicos al polen de <i>Amaranthus palmeri</i>	78
9. Conclusiones.	81

10. Perspectiva del trabajo a futuro.....	81
11. Anexo	82
12. Bibliografía	83

Abreviaturas

A450	Absorbancia a 450 nm
aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
Acs	Anticuerpos
Ag	Antígeno
Ags	Antígenos
Agua mili-Q	Agua tipo 1, grado reactivo obtenida del sistema <i>Millipore Simplicity UV</i>
APC	Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenter Cell)
HS	Hipersensibilidad
Ig	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
Lin T	Linfocito T
Lin B	Linfocito B
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Toda la noche (<i>over night</i>)
MWM	Marcadores de peso molecular (<i>molecular weight marker</i>)
PBS-Tween 0.05%	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1x con 0.05% de Tween 20
PC	Pruebas cutáneas
Sup 75	Columna Superdex 75

Resumen

Se llevó cabo el proceso de purificación de antígenos alergénicos de relevancia clínica presentes en polen de *Chenopodium album* a partir de un extracto de polen comercial mediante técnicas de cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico y de fase reversa. Se identificaron 4 principales proteínas alergénicas correspondientes a: calmodulina 1, cinasa tipo 4 de un posible receptor de polen, proteína paróloga a proteínas de reconocimiento de polen y receptor S de lectina tipo G con actividad de serina/treonina cinasa. Como antígenos alergénicos 3 de estas proteínas no habían sido anteriormente descritas como partícipes en procesos de sensibilización a polen. Tanto la calmodulina 1, como la cinasa tipo 4 de un posible receptor de polen y la proteína paróloga a proteínas de reconocimiento de polen presentaron un grado importante de inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de *Amaranthus palmeri*, definiendo antígenos de *Chenopodium album* que presentan reactividad cruzada con antígenos de *Amaranthus palmeri*.

1. Introducción

El polen ha sido caracterizado como uno de los principales alérgenos que desencadena el desarrollo de Inmunoglobulinas tipo E (IgE) presentes en las patologías de rinitis alérgica y asma, enfermedades de carácter crónico que afectan de manera importante a la población infantil y que presentan un alto impacto negativo en la calidad de vida del paciente y economía familiar.

A través del tiempo se han realizado numerosos estudios que identifican las especies vegetales alergénicas y los determinantes bioquímicos que determinan la alergenicidad de las proteínas polínicas. En la práctica clínica se ha visto que pacientes con rinitis alérgica o asma constantemente presentan una sensibilidad múltiplea diferentes tipos de polenes, lo cual dificulta el diagnóstico y limita los resultados del régimen terapéutico. Esta polisensibilidad se ha relacionado con una potencial reactividad cruzada de los antígenos polínicos, especialmente entre especies vegetales taxonómicamente relacionadas. En México, los estudios demográficos han identificado a los géneros *Amaranthus* y *Chenopodium* como plantas, principalmente malezas, con altos índices de sensibilidad en la población mexicana en zonas urbanas a través de varias décadas.

En la evaluación de pacientes atópicos tanto investigadores en estudios clínicos como profesionales en la práctica clínica han coincidido en que los extractos alergénicos utilizados en la actualidad para el diagnóstico y tratamiento de la rinitis alérgica y asma poseen fuertes deficiencias asociadas principalmente a la variabilidad en la composición del extracto de polen y a la baja concentración de los antígenos relevantes respecto a la cantidad de proteínas totales. A través del mundo, los estudios inmunológicos en tópicos de alergia se han focalizado a la identificación y caracterización de los antígenos alergénicos presentes en polen para el desarrollo de extractos alergénicos de polen estandarizados, obtenidos

mediante procesos específicos de purificación o preferentemente por la expresión de proteínas recombinantes. La perspectiva de los estudios estructurales también incluye evaluaciones moleculares de los antígenos para la identificación de determinantes proteicas responsables de la polisensibilidad en pacientes atópicos.

Con la finalidad de contribuir a la caracterización de antígenos alergénicos y el proceso de estandarización de los extractos alergénicos en el grupo de trabajo del laboratorio se han llevado a cabo diversas investigaciones en extractos polínicos de especies de relevancia alergénica en la población mexicana. El presente trabajo se centra en el aislamiento y caracterización de antígenos alergénicos de polen de *Chenopodium album* y su posterior evaluación de reactividad cruzada frente las proteínas polínicas de *Amaranthus palmeri*.

2. Marco teórico

2.1 Respuesta inmune: innata y adaptativa

Los organismos pluricelulares más desarrollados han generado mecanismos especializados de detección y defensa contra agentes infecciosos patógenos así como a sustancias tanto ajenas como propias que bajo ciertas condiciones tienen un potencial dañino para el organismo. El conjunto de tejidos, células efectoras y moléculas responsables de llevar a cabo esta labor se denominan sistema inmunitario. Aunque su nombre es analogía de su papel, el sistema inmune refiere su función a un conjunto de reacciones coordinadas (respuesta inmunitaria) que se presentan frente a una sustancia extraña, microorganismo o macromoléculas de diversas composiciones bioquímicas, con el fin de eliminarlos del organismo, por lo que la protección que brinda es limitada y no exime al propio organismo de presentar patologías asociadas a la infección o a las repercusiones fisiológicas de la reacción (Abbas, Lichtman, & Pober, 2002). La inmunología, en su contexto más amplio, se describe como la ciencia experimental que busca explicar los mecanismos que se desarrollan en la respuesta inmune a través de la observación de fenómenos inmunológicos.

Aunque la respuesta inmunitaria es en general un proceso global que involucra a todo el sistema inmunitario, de acuerdo al tipo de mecanismos que se desarrollan, el tiempo en el que lo hacen y la participación prioritaria de células específicas, el proceso se puede clasificar en dos tipos principales: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata, también llamada inmunidad nativa o natural, se refiere a mecanismos de respuesta rápida o de contención generados por barreras físicas o químicas, células fagocíticas y proteínas sanguíneas, así como las proteínas que las regulan llamadas citocinas.

Por otra parte la inmunidad adaptativa es un proceso consecutivo y complementario a la inmunidad innata generada con el fin de proporcionar una respuesta mejorada, de mayor eficacia y en un menor tiempo. Esta inmunidad es un proceso especializado característico de los vertebrados y es también llamada inmunidad adquirida, ya que se desarrolla posterior a una primera infección, o inmunidad específica, porque entre las características que presenta están la especificidad, diversidad, memoria, especialización, autolimitación y ausencia de autorreactividad. El tipo de reconocimiento que llevan a cabo estos componentes es altamente específica identificando a una molécula particular denominada antígeno (Ag) (Abbas et al., 2002; Toche P., 2012).

Los componentes que participan en la inmunidad adaptativa son los Linfocitos B y T (Lin B, Lin T) y los anticuerpos productos de los Lin B. De acuerdo a la participación de Lin o Ac la inmunidad adquirida se puede subdividir en dos tipos llamados *inmunidad celular* e *inmunidad humoral*, respectivamente. En la inmunidad humoral participan proteínas sanguíneas producidas por los Linfocitos B llamadas anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Igs). La naturaleza que desarrolle la inmunidad adaptativa y el tipo de componentes generados está en función directa del tipo de estímulo que se presente de la inmunidad innata.

2.2 Inmunoglobulinas

En los humanos las inmunoglobulinas son un complejo proteico que se ubica en la porción gamma de la electroforesis de las glucoproteínas séricas humanas respecto a la albúmina, por lo que también se mencionan como gammaglobulinas, o anticuerpos (Ac). Bioquímicamente las Igs pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, esta súper familia incluye a las Igs y a otras moléculas, que pese a no pertenecer al sistema inmunitario, presentan al menos un 15% de homología estructural y pueden realizar funciones variadas en otros ámbitos. De

manera general todas las Igs humanas consisten en dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L). Tanto las cadenas pesadas como las ligeras presentan dominios denominados de Ig, dispuestos en *tándem* y que funcionalmente son diferentes. Estructuralmente, se subdividen en dominios de carácter variable (V) o constante (C) ubicados en la en la región N-terminal o C-terminal de la cadena, respectivamente, siendo la región variable la principal responsable del reconocimiento antigénico. La región V contiene 3 segmentos hipervariables de alrededor de 10 aa llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementary- determining regions*) definidos como CDR 1, 2 y 3 (Berlot, Rossini, & Turchet, 2015). Estos fragmentos son regulados por mecanismos genéticos de recombinación; la yuxtaposición pareada de un dominio V_H con uno V_L , con sus correspondientes CDRs genera una estructura tridimensional que define el sitio de unión al Ag, cada monómero estructural de un Ac posee dos sitios de unión a Ag. Los dominios ubicados en el extremo C-terminal definen la región constante (C), ambas cadenas ligeras poseen un solo dominio C, mientras que en la pesada pueden ser 3 o 4 (Schroeder & Cavacini, 2010). Esta región constante define la interacción y afinidad a células o mecanismo de respuesta endógenos como es la unión al complemento o la interacción celular con fagocitos.

Los Acs se pueden encontrar en el organismo expresados como proteínas integrales de membrana en Lin B o en formas secretadas presentes en líquidos fisiológicos o asociados a receptores celulares específicos, brindándoles una amplia distribución en el cuerpo. Cada clona productora de anticuerpos produce Acs de especificidad única y se estima que la capacidad de una persona de producir moléculas de Ac diferentes es de al menos 10^8 . En el humano se han identificado 5 tipos de gammaglobulinas, y acuerdo a su tipo, estas desempeñan diferentes funciones biológicas que incluyen reconocimiento y neutralización de toxinas, activación del complemento, opsonización, neutralización de microorganismos, activación de rutas de citotoxicidad, entre otras.

Respecto a otros mecanismos de la inmunidad adaptativa, los Acs destacan en la medida de que son moléculas que con su gran diversidad y número, son capaces de reconocer una gama más amplia de antígenos, con un reconocimiento más fino y uniéndose con interacciones intermoleculares no covalentes más fuertes, respecto a los mecanismo de la inmunidad innata. El tipo de Ac que se producen por parte de las células plasmáticas en respuesta a un estímulo está en función del tipo de señalización que le presente una célula T activada y las citocinas características secretadas por el linaje celular de dicho linfocito. El mecanismo por el cual se activan los Lin T incluyen la presentación de un Ag diana a los linfocitos mediante dos estructuras de superficie especializadas pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) (Martínez Sánchez, 2011).

El complejo principal de histocompatibilidad hace alusión a una región genética que contiene genes estrechamente ligados entre sí y que controlan de manera directa el reconocimiento y respuesta inmunológica de un individuo. Las regiones de clase I y II codifican para proteínas homólogas que constituyen un complejo molecular de expresión antigénica dominados MHC de clase I (MHC I) y MHC de clase II (MHC II). Ambas clases de MHC presentan dominios del tipo inmunoglobulina en la región próxima a la membrana, estos dominios determinan el reconocimiento selectivo a determinados cúmulos de diferenciación presentes en Lin T. Estudios experimentales han demostrado que el MHC se une de manera selectiva a dos linajes de Lin T: MHC de clase I se une al Receptor de Células de T (TCR) acoplado al CD8 presente en Lin T CD8+, mientras que el MHC II lo hace a TCR-CD4 en Lin T CD4+ (Abbas et al., 2002).

Dentro de las Igs humanas, las IgEs tienen una gran importancia dentro de los procesos de hipersensibilidad y trastornos alérgicos (Vennera & Picado, 2012). La IgE es una inmunoglobulina monomérica con un peso aproximado de 190 kDa y la concentración sérica más baja dentro de las Igs. Aunque su vida

media es relativamente muy corta, está identificada como una inmunoglobulina funcionalmente muy potente. La IgE se une con una afinidad extremadamente alta al FcεRI que se expresa en mastocitos, basófilos, células de Langerhans y eosinófilos. La unión Ag-IgE libera a los mediadores responsables de inflamación y alergia, sin embargo desempeña un papel fundamental durante las invasiones parasitarias (Vega Robledo, 2009). La IgE circulante regula por incremento la expresión de FcεR en estas células. La combinación de unión fuerte y regulación positiva de la expresión de FcεR contribuye a la notable potencia de esta inmunoglobulina. La IgE tiene una afinidad mucho menor por FcεRII o CD23, que se expresa tanto en las mismas células que FcεRI como en células B, células NK y plaquetas.

2.3 Hipersensibilidad

Dentro de las patologías asociadas a reacciones inmunológicas anormales se encuentran las reacciones de hipersensibilidad (HS), las cuales se describen como una respuesta exacerbada a un estímulo inocuo o no necesariamente patológico, cuyo desarrollo genera un daño tisular local o generalizado, e inclusive la muerte del individuo que la padece. La susceptibilidad de una persona a padecer una HS está en función de sus patrones de expresión génica, la naturaleza y complejidad del estímulo (alergénico), la fuerza y frecuencia con la éste se presentó, así como la vía de contacto, entre algunas otras variantes.

De acuerdo a la clasificación práctica de Gell y Coombs, basada en los mediadores y mecanismos efectores que participan en la respuesta inmune, las respuestas de HS se clasifican de manera general en 4 grupos, o si se considera la propuesta de Rajan T.V., serían 5 tipos (Rajan, 2003). Las alergias se clasifican dentro de las respuestas de HS del Tipo I, también conocidas como HS inmediatas, y son aquellas en las cuales los mediadores inmunitarios patológicos

característicos son las Inmunoglobulinas del isotipo E (IgE), las cuales se encuentran asociadas a receptores específicos en mastocitos y basófilos. En este tipo de HS se genera una respuesta exacerbada frente a antígenos comunes, provocada por la polarización de los linfocitos T (Lin T) durante la respuesta inmune hacia la variedad T_{h2} , observada durante la etapa de *sensibilización*, promoviendo la producción de IgE, algo distintivo en personas atópicas, sin embargo no es la única patología asociada a este desorden (Martínez Sánchez, 2011).

Es el caso de la HS Tipo I, el señalamiento en Lin T por parte de la células presentadoras de antígenos (APC), especialmente por células dendríticas (CD) especializadas, induce la diferenciación de los Lin T $CD4+$ (*virgen*) hacia Lin T_{h2} (J. A. Walker & McKenzie, 2018). Este linaje secreta citocinas específicas que determinan el tipo de respuesta que se orquestará hacia el estímulo recibido. Entre las citocinas características de la respuesta T_{h2} se encuentran las interleucinas (IL) IL-5, IL-10, IL-4, IL-13 y la citocina GM-CSF. Mientras que la IL-10 posee un efecto inhibitorio de la respuesta T_{h1} , la interleucina 4 (IL-4) se ha identificado como la responsable principal de la señalización que determina el cambio de isotipo a IgE en Lin B activados, entre otros efectos proalérgicos (Steinke & Borish, 2001). La IgE es un anticuerpo que es reconocido con muy alta afinidad, a través de su fracción Fc, por el *receptor de alta afinidad épsilon para Fc* ($Fc\epsilon RI$) presente en mastocitos, basófilos y eosinófilos principalmente. La unión IgE- $Fc\epsilon RI$ protege la región Fc del Ac frente a proteasas séricas, permitiéndole sensibilizar a los mastocitos durante semanas e incluso meses (Roitt, 1993). Cuando la fracción de reconocimiento al antígeno (Fab) de IgEs contiguas, fijadas al receptor $Fc\epsilon RI$, entra en contacto con su antígeno diana se promueve el entrecruzamiento de estos complejos, desencadenando una respuesta que induce la degranulación y liberación de mediadores proinflamatorios preformados (histamina, quimocinas, citocinas), desarrollando una reacción de inflamación aguda (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007; Roitt, 1993). Las modificaciones

membranales de la degranulación también promueven la síntesis *de novo* de otros mediadores de carácter lipídico derivados del ácido araquidónico (e. g. prostaglandinas y leucotrienos) (Zambrano Villa, 2007). Algunos de los factores liberados pueden tener efectos autócrinos en el mastocito. Cabe señalar que una vez liberado el contenido granular del mastocito, éste vuelve a comenzar la síntesis de nuevos mediadores proinflamatorios degranulables dando como resultado la fase tardía de la alergia en caso de que el antígeno aún se encuentre en el sistema.

Pese a que la IgE se encuentra en una concentración circulante relativamente baja, respecto a las otras inmunoglobulinas (menor de 100 UI/ml), su gran afinidad al receptor FcεRI presente en mastocitos, aunado a la gran expresión del receptor por parte de estos (40-90mil receptores/célula) (Kindt et al., 2007) genera una predisposición innata de los mastocitos a ser sensibilizados, sobre todo en pacientes atópicos que pueden estar presentando concentraciones del anticuerpo reagínico de hasta 10 veces los valores normales. Aunque existe una relación estadística de la incidencia de HS Tipo I y niveles circulantes altos de IgE totales, ésta característica no es determinante para identificar a una persona como atópica ya que existen otras patologías que modifican los niveles de IgE como son las infecciones parasitarias e hipergammaglobulinemias (Roitt, 1993). En personas con diagnóstico de HS tipo I y valores séricos de IgE elevados tampoco se ha determinado una relación de proporcionalidad entre la concentración de la inmunoglobulina y la intensidad de los síntomas.

Aunque tanto los basófilos como mastocitos son muy afines a la IgE, los primeros requieren que el alérgeno llegue a circulación sanguínea para desarrollar su mecanismo de acción, como sucede en los casos de anafilaxia por picadura de abeja. Por otra parte, los mastocitos se encuentran distribuidos próximos a vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, es decir, casi en todo los tejidos periféricos vascularizados, encontrándose en altas concentraciones en piel y mucosas

(10,000 células/mm² de piel) por lo cual el efecto de su activación se presenta como vasodilatación, reclutamiento de leucocitos, contracción del músculo liso y exudación de plasma en el tejido. De acuerdo a la zona afectada dicha activación se puede observar como rubor, prurito, rinitis, urticaria, eritema, asma e incluso anafilaxia de acuerdo a la intensidad del estímulo. Se sabe que la mayor parte de las reacciones alérgicas mediadas por IgE se producen sobre las superficies mucosas de las vías aéreas y la zona gastrointestinal ya que son zonas de alta exposición y por lo tanto de constante estímulo por parte de alérgenos que ingresan al organismo mediante inhalación o ingestión (Janeway, Jr, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001).

Pese a que previamente se han identificado los mediadores y mecanismos que determinan la producción de IgEs y el desarrollo de los procesos alérgicos, las terapias preventivas al desarrollo de alergias se consideran inviables debido a que, previo a la detección de síntomas clínicos, no es posible identificar personas atópicas dentro de la población, ni determinar una etapa temporal de la pérdida de tolerancia al estímulo. Además, varias de las citocinas involucradas en los procesos alérgicos participan en diferentes vías de señalización y diferenciación celular, limitando el uso de citocinas que bloqueen la producción de IgEs. Recientemente se han desarrollado nuevas terapias orientadas a la eliminación de las IgEs mediante anticuerpos anti-IgE como terapia para la alergia y el asma; sin embargo esta terapia posee una restricción de detección a IgE libre pero no IgE unida a FcεR, ya que en este último caso se estimularía la desgranulación y la liberación de mediadores inflamatorios (Schroeder & Cavacini, 2010). Por lo tanto en la clínica actual los principales enfoques terapéuticos se asocian a la identificación de los alérgenos relevantes en la población, el tratamiento farmacológico que mejore la calidad de vida de los pacientes y el desarrollo de terapias específicas de grado farmacéutico que promuevan la inmunomodulación de la respuesta alérgica hacia la producción de IgG.

2.4 Rinitis alérgica y asma

La rinitis alérgica y el asma son dos conjuntos de sintomatologías de alta prevalencia clínica que suelen presentarse al padecer una HS Tipo 1. La rinitis alérgica engloba los síntomas de rinorrea, estornudos, prurito y obstrucción de vías aéreas que además puede cursar con rinoconjuntivitis, es de carácter crónico y tiene desarrollo potencial a un cuadro asmático, definido por la OMG como ataques recurrentes de disnea y sibilancias, de severidad y frecuencia variable (OMS, 2017). Aunque la mortalidad actual de éstas enfermedades es relativamente muy baja, su repercusión negativa en la calidad de vida del paciente (fatiga, disminución de la actividad, ausentismo), detección, tratamiento (antihistamínicos, antileucotrienos, corticosteroides) e impacto económico en los servicios de salud (en los países industrializados oscila entre el 1 y el 2% del gasto total sanitario (Serra Batlles, n.d.), aunado a su alta prevalencia, han convertido a estas enfermedades en un problema de salud relevante para las grandes naciones y un *hotspot* en el estudio de la inmunología con el desarrollo de nuevas técnicas y aumento en los grupos de trabajo en investigación internacional y nacional (INER, 2015). Adicionalmente se ha descrito previamente una estrecha relación entre la rinitis alérgica y el asma alérgica y la comorbilidad de las enfermedades de las vías respiratorias superiores e inferiores (Jacobsen, Wahn, & Bilo, 2012).

Alrededor del mundo diversas asociaciones internaciones monitorean la prevalencia de estas enfermedades. Datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud, *WHO*) aproximan que en el mundo 235 millones de personas padecen asma, tal que en 2015 hubo 383 000 muertes de personas por dicha patología; la mayoría de las muertes por asma se registran en los países de ingresos bajos y medianamente bajos (OMS, n.d.). El *Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Niñez* (ISAAC) demostró que hay países en los que existe una prevalencia de hasta 27% de asma en niños, considerada una de las poblaciones más afectadas. Un análisis focalizado del ISAAC respecto a la rinitis alérgica estimó la

incidencia mundial entre 0.8% y 14.9% para niños de 6 a 7 años, y de 1.4% a 39.7% en adolescentes de 13 a 14 años de edad (Strachan et al., 1997).

En México, la sintomatología de asma y rinitis alérgica se representaron como dos de las principales causas de solicitud de ingreso al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) siendo el asma el principal motivo de ingreso en la Unidad de Urgencias Respiratorias. Además, ambas enfermedades se consideran dentro de las 10 líneas de investigación más importantes por parte de la institución (INER, 2015) con una incidencia anual de asma en México entre 2.78 y 3.6 por cada 1,000 habitantes de acuerdo a fuentes variadas (Vargas-Becerra, 2009). Dentro de los principales factores que llevan al desarrollo del cuadro alérgico de asma o rinitis se encuentran la exposición a aero-alérgenos, dentro de los que podemos destacar a los estacionales, como el polen, y los perennes que provienen de ácaros, y caspa de animales domésticos como perros o gatos, y con menor frecuencia a los provenientes de cucarachas y otros insectos (Bañuelos Arias et al., 2003). El paso inicial del diagnóstico de rinitis alérgica y asma involucra la necesidad de extractos alérgicos estandarizados que permitan una correlación de positividad homogénea entre determinaciones e instituciones.

2.5 Respuesta Th2

La respuesta inmunológica identificada en la rinitis alérgica y asma es la respuesta Th2, la cual está caracterizada por la presencia del linaje celular linfocítico Th2 GATA3+ STAT6+. Este tipo de células únicamente se pueden generar partir de la exposición del antígeno ligado al MHC de clase II por parte de una célula presentadora de antígeno (CPA) hacia una célula T *naive* (CD4+/CD3+). Esta restricción se debe a que el receptor de células T (TCR) presente en células CD4+ presenta un reconocimiento selectivo a moléculas del MCH II y exclusivamente al

del propio individuo, descartando la posibilidad de una diferenciación de células T *naive* por parte de las CPA ajenas al individuo. Las células T citotóxicas presentan una restricción homóloga del complejo principal de histocompatibilidad específica para el MHC de clase I.

Aunque la interacción que caracteriza la formación del linaje Th2 es la sinapsis inmunológica entre los receptores TCR (acoplado al CD3) y el MHC-II, de forma simultánea la CPA expresa los ligandos de coestimulación B7-1/2 e ICOSL e ICAM-1, que son reconocidos por los receptores CD28 e ICOS presentes en el linfocito. Es importante señalar que mientras los Lin B pueden reconocer epítomos en péptidos, proteínas, ácidos nucleídos, lípidos, etc.; los Lin T primordialmente reconocen antígenos péptidicos. De acuerdo a la interacción y coestimulación que se lleva a cabo entre las CPA y los Linfocitos T, la CPA libera citocinas específicas que definen a qué linaje celular se diferenciará el Lin T *naive*. En el caso de la respuesta Th2, la principal citocina involucrada es la IL-4, y recientemente se ha identificado a la IL-33 como de relevancia en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria mediada por Th2; se ha identificado que la presencia de IFN- γ en este punto inhibe esta diferenciación y polariza la respuesta hacia Th1 (Teixeira et al., 2005). Si la concentración de citocinas liberadas por coestimulación generan un entorno que favorece la polarización, el Lin T *naive* CD4+ adquiere el linaje Th2 STAT6+ y GATA3+, siendo STAT6 y GATA3 factores de transcripción cruciales de la respuesta citocínica Th2 (Zhou & Ouyang, 2003), y se comienza una serie de señalizaciones tanto en la respuesta inmune humoral como en la innata.

El Lin Th2 STAT6+ GATA3+ activado comienza a producir las moléculas señalizadoras IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y GM-CSF. Las citocinas producidas por el Lin Th2 ejercen efectos específicos tanto en células de la inmunidad innata, como en las determinantes de la inmunidad adaptativa. Cuando el Lin Th2 se encuentra con un Lin B activado, en presencia de las interleucinas

mencionadas, induce la proliferación de la célula B hacia una célula plasmática productora de Ac. La IL-4, en conjunto con la IL-13, promueve un cambio de clase de Ig que determina que la célula plasmática genere Ac del tipo E, mediadores característicos de la HS tipo I. En eosinófilos, la estimulación con IL-5 induce su diferenciación, crecimiento y aumenta su vida media (Brito Galeana et al., 2003). IL-10 e IL-4 actúan como antagonistas en la polarización a Th1, inhibiéndola y en conjunto con IL-13, IL-25 e IL-27, inhiben la diferenciación del Lin T *naive* al linaje Th17 (STAT 3+, ROR- γ t+, IRF 4+, c-Maf+).

Aunque varias de las diferenciaciones (Th1, Th2, Th17, etc.) pueden estarse presentando de manera simultánea en respuesta un estímulo externo de composición variada, la predominancia de un tipo de respuesta define una gran mayoría de los efectos clínicos observados al estímulo, sin descartar la yuxtaposición de respuestas. Se ha descrito, por ejemplo, que durante la patogénesis de la dermatitis atópica las células de Langerhans pueden inicialmente polarizar una respuesta Th2, mientras también promueven la quimiotaxis de precursores de CD adicionales, que maduran en CD inflamatorias mieloides que pueden ser responsables de la aparición eventual de una respuesta Th1 (Seo Jeon Jun, n.d.). Aunque los efectos de la respuesta Th2 contrarrestan la acción microbicida de la respuesta Th1, y viceversa, el escenario óptimo de respuesta inmune en humanos es una respuesta Th1 y Th2 adecuadamente equilibrada para el desafío inmunitario (Berger, 2000).

Existe una relación previamente estudiada entre los factores ambientales de las zonas conurbanas y el incremento en la respuesta inmunológica polarizada hacia Th2 frente a alérgenos comunes, la cual además se ha duplicado en las últimas décadas. La incidencia de rinitis alérgica en zonas urbanas duplica a la correspondiente a la zona rural (Gaspar-López et al., 2014), mientras que en una escala temporal la morbilidad se ha duplicado en las últimas dos décadas; éstas cifras son asociadas al aumento de las actividades socio-económicas de la

población en zonas conurbanas, principalmente relacionadas al transporte (Secretaría del Medio Ambiente, 2012), que generan un incremento drástico de las emisiones de diferentes contaminantes a la atmósfera, tales como: óxidos de nitrógeno, compuestos aromáticos policíclicos, contaminantes tóxicos (benceno, plomo, xileno, fósforo, bario), metano, CO₂, partículas y otros compuestos orgánicos volátiles (SEDEMA, n.d.). Los efectos de estos factores contaminantes en las barreras físicas primarias incluyen el aclaramiento mucocilar, aumento en la permeabilidad de células epiteliales y la alteración de la afinidad de moléculas de adhesión, generando una modificación a la composición o respuesta de algunos de los elementos principales de la inmunidad innata. Un estudio específico respecto al Diésel, por ejemplo, ha demostrado que potencia el efecto antigénico del polen (Gaspar-López et al., 2014). , los esfuerzos de investigación en alergias están centrados en mecanismo de redireccionamiento de la repuesta Th2 hacia Th1 con fines de reducir la incidencia de la respuesta alérgica atópica

2.6 Aeroalergenos: polen

La profilaxis básica para los efectos clínicos de la HS Tipo I consiste en evitar la exposición de la persona al alérgeno desencadenante. Sin embargo, existen numerosos casos en los que por características de los alérgenos o zona y ritmo de vida de las personas atópicas, es imposible controlar todas las variables que determinan el contacto del mediador inmunológico con su antígeno diana, como sucede en el caso de muchos de los denominados aeroalergenos.

Los aeroalergenos representan un grupo heterogéneo de partículas relativamente grandes y complejas transportadas por el efecto mecánico de viento común y que son capaces de inducir cuadros alérgicos en personas atópicas. Como ejemplo de aeroalergenos se encuentran las esporas de hongos, pólenes, ácaros, polvo, epitelios de animales, etc. Con un tamaño que varía entre una y 60

micras, su relevancia inmunológica radica en la complejidad de su composición rica en proteínas (o sustancias unidas a estas) e hidratos de carbono, con características antigénicas y masa atómica entre 3000 y 40000 U (Hernández Chávez et al., 1999). Debido a su compleja composición bioquímica y su amplia distribución, el polen resalta dentro de los aeroalergenos como uno de los agentes de mayor relevancia clínica, especialmente como factor en la rinitis alérgica estacional y el asma (Asam et al., 2015).

El polen se define como las células sexuales masculinas producidas por plantas con flores. Aunque cada polen tiene características particulares determinadas por la especie, se pueden clasificar de forma burda pero funcional en dos grandes grupos: los que son grandes, pesados y cerosos, que requieren de polinizadores como los insectos (entomofilia); y aquellos que son secos, livianos y de tamaños pequeños, fácilmente transportados por el aire para polinizar otras plantas (anemofilia) (Celio Murillo et al., 2014). Esta clasificación también aplica a grandes rasgos en la prevalencia de polen antigénico, siendo el tipo de polen pequeño y liviano los que mayoritariamente desencadenan los síntomas de alergia.

Debido a que entre el proceso de liberación del polen a partir de los estambres y la fecundación puede pasar mucho tiempo o presentarse condiciones adversas que modifiquen su viabilidad, las células polínicas han desarrollado estructuras de resistencia altamente especializadas (exina y la intina) que le brindan alta resistencia a procesos de degradación y desecación. Al entrar en contacto con las mucosas, los granos de polen absorben agua a través de sus aperturas (activación) liberando las proteínas hidrosolubles al exterior (Anero Bartolomé & et al., 2008; Guidos F & Almeida A, 2005). Estas características desatacan la participación del polen en procesos alérgicos en espacios temporales más amplios respecto a otros aeroalergenos.

Aunque que existe el término médico denominado polinosis (generalizado para referir alergia o sensibilización a los pólenes en diferentes grados) ésta patología es específica a determinados antígenos presentes en el polen (Okubo et al., 2017), por lo que puede presentarse reactividad cruzada con el polen de diferentes especies e incluso con algunos alimentos o medicamentos. Por lo tanto la identificación y actualización de las especies vegetales generadoras de polen alergénico y la caracterización de reactividad cruzada entre antígenos de dos o más especies tienen un alto valor clínico en el diagnóstico y tratamiento.

2.7 Tratamientos para la rinitis alérgica y asma

En la actualidad existe una gran variedad de medicamentos para tratar de manera efectiva la rinitis alérgica y asma y la mayoría de los pacientes pueden llegar a lograr un buen control sintomático de la rinitis alérgica y asma. Las terapias farmacológicas y no farmacológicas van orientadas a evitar síntomas molestos durante el día y durante la noche, necesitar poca o ninguna medicación sintomática, tener una función pulmonar normal o casi normal y la reducción de todos los factores que pueden generar exacerbaciones (crisis o ataques) asmáticas graves ya que estas situaciones, en caso de no ser tratados adecuadamente, pueden poner en riesgo la vida la persona. De manera análoga se busca que dicho control sintomatológico se encuentre en un equilibrio positivo respecto a los efectos adversos o secundarios del tratamiento (Larenas-Linnemann et al., 2017). Aunque el control continuo de la rinitis alérgica y asma permiten que un paciente que las padezca pueda desarrollar su vida de manera normal se ha evaluado que la mayoría de los pacientes no posee el diagnóstico y tratamiento adecuado; en aquellos pacientes con acceso al tratamiento se ha evidenciado que hasta el 80% no utilizan los inhaladores correctamente y en torno al 50% de los adultos y niños no toman los medicamentos de control según lo

prescrito (Global Initiative For Asthma, 2016). Al ser la rinitis alérgica y asma enfermedades crónicas que requieren medicación y evaluación continua, existe una alta tasa de abandono terapéutico por costos de tratamiento y efectos indeseados al uso de medicamentos como corticosteroides inhalados, broncodilatador agonistas β_2 , modificadores de los leucotrienos, cromonas, anticolinérgico de acción prolongada, entre muchos otros (Larenas-Linnemann et al., 2014). Desde el punto de vista económico se ha estimado que alrededor del 70% del costo total de la enfermedad asmática está determinado por su mal control y manejo (Serra Batlles, n.d.). Adicionalmente en la clínica se ha observado que una pequeña proporción de pacientes no responden a la farmacoterapia.

Una terapia con fines de cura para la rinitis alérgica y asma es la inmunoterapia con alérgenos. Desde sus primeros usos hacia la primera década del siglo XX su aplicación es un tema que ha sido ampliamente debatido por los alergólogos durante muchas décadas e instituciones de salud por su seguridad y eficacia variables (Warner, 2011); no obstante hoy en día se han desarrollado nuevas técnicas (sublingual) y formulaciones que han generado que actualmente se considere a la inmunoterapia una alternativa eficaz y segura, en diferentes tipos de alergia (ej. sensibilización a alimentos, dermatitis atópica (Pajno, 2007)). Esta terapia se basa en la modulación de la respuesta inmunitaria por administración clínica controlada de alérgenos específicos para recuperar la tolerancia, esto conduce a una disminución en los síntomas y en la necesidad de medicación, sin embargo la terapia también tiene la capacidad de producir efectos clínicos no deseados a largo plazo y la formación de nuevas alergias y síntomas, siendo un punto crítico dentro de su desarrollo la estandarización adecuada de un perfil de seguridad en los alérgenos utilizados (Jacobsen et al., 2012; Stephen J., James N., Nouri-Aria, & Stephen R., 2004).

2.8 Inmunoterapia de alérgenos específicos

La inmunoterapia de alérgenos específicos (IAE) es un tratamiento antiinflamatorio, causa-específico y preventivo para las enfermedades respiratorias alérgicas; actúa influyendo en los mecanismos inmunológicos básicos, que resulta en la supresión del aumento estacional de la eosinofilia, aumento de IgG específica y la reducción de la reactividad de fase tardía e inducción a un cambio de una respuesta de tipo Th2 a Th1, de forma inicial y mantenida (Jacobsen et al., 2012; Stephen J., James N., Nouri-Aria, & Stephen R., 2004).

La inmunoterapia genera una mejoría sintomática que se correlaciona con reducciones de eosinófilos e IL-5 en la mucosa nasal (Wilson et al., 2001) durante la temporada de polinización, así como con una mayor producción de interferón-gamma (INF- γ). Se ha descrito que la inmunoterapia induce una respuesta mediada por IL-12, que se muestra inversamente relacionada con la producción de IL-4 y promueve una respuesta de Th1, caracterizada por la producción de INF- γ , que promueve la producción de IgG (Hamid et al., 1997), así como una nueva respuesta reguladora de células T caracterizada por la inducción de IL-10 que precede a la actividad inhibitoria de anticuerpos IgG4. El TGF- β es también un mediador de células reguladoras T inducido por inmunoterapia (Jutel et al., 2003) que es responsable de la regulación a la baja de la respuesta Th2, la reducción de la producción de IL-5 y la prevención de eosinofilia e inflamación inducidas por la exposición al alérgeno. Esto conduce a una modulación de los síntomas reflejado en una menor respuesta clínica inflamatoria al alérgeno desencadenante y menor utilización de terapia farmacológica. La reducción en la medicación sintomática temprana lograda después del inicio del tratamiento con IAE se ha demostrado para el polen y para los alérgenos perennes (Jacobsen et al., 2012; Velarde-Domínguez, Talavera-Hernández, Sánchez-Santa Ana, & Madrigal-Mendoza, 2002; Warner, 2011).

Aunque el tratamiento con IAE tiene un amplio valor clínico, se ha descrito que su eficacia y seguridad están íntimamente ligadas a las características de los extractos alérgicos empleados. La investigación inmunológica básica, el conocimiento específico sobre enfermedades alérgicas y la investigación intensiva relacionada con las moléculas alérgicas y los extractos utilizados para el diagnóstico y la terapia se han estado desarrollando constantemente durante décadas con el fin de mejorar las oportunidades para el tratamiento específico de enfermedades respiratorias alérgicas (Jacobsen et al., 2012). Tanto para la terapia localizada de enfermedades alérgicas como su diagnóstico, el paso fundamental consiste en la identificación y caracterización de las moléculas alérgicas desencadenantes.

3. Antecedentes

3.1 Inmunoterapia a polinosis

El tratamiento actual para los procesos de HS tipo I consisten de manera global y no excluyente en: a) evitar la exposición, b) administrar anti-inflamatorios para contrarrestar o disminuir los efectos fisiológicos de la HS c) administración de medicamentos moduladores de la respuesta inflamatoria y d) administración de inmunoterapia. En el caso de personas donde no es posible eliminar el componente que desencadena la reacción alérgica del entorno inmediato de la persona atópica, es necesaria la administración frecuente de fármacos anti-inflamatorios cada vez que se presente un cuadro alérgico, así como otras terapias preventivas a la exposición.

Una alternativa farmacológica orientada a la cura más allá del tratamiento de los síntomas es la inmunoterapia. Este tipo de tratamiento tiene su enfoque en el *redireccionamiento* de la respuesta inmunológica a un alérgeno mediante la administración gradual y controlada de extractos concentrados que posean los alérgenos naturales diana, generando una paulatina disminución de los síntomas de la alergia y una consecuentemente reducción del uso de medicamentos. La terapia inmunogénica subcutánea es un tratamiento bien documentado para tratar la rinitis alérgica y el asma, sin embargo, se ha observado que la tasa de respuesta y el nivel de ésta se encuentran íntimamente relacionadas a la calidad del extracto alérgico, ya que estos, de manera natural, pueden contener cantidades variables de alérgenos individuales, incluidos alérgenos a los que el paciente puede no estar sensibilizado. Las terapias más comunes utilizadas en la práctica de alergia clínica ahora están disponibles como productos estandarizados, pero esta estandarización actualmente no es homogénea (Pajno, 2007). Aunque tanto en la industria como en la investigación básica se utilizan procesos normalizados de operación para la obtención de extractos referencia de polen, estos son obtenidos de especímenes con variabilidad biológica intrínseca

entre laboratorios e incluso lotes, aunado a bajas concentraciones de alérgenos de interés clínicos respecto a la composición neta del extracto. Los alérgenos se extraen comúnmente a 4°C con una solución de bicarbonato de amonio y el extracto de proteína resultante se ultrafiltra para eliminar moléculas pequeñas (<1 kDa). El extracto final contiene todos los alérgenos y proteínas solubles de la materia prima en una solución preservadora; estos incluyen los componentes biológicos activos (alérgenos mayores o menores) así como componentes no bioactivos en las reacciones alérgicas, como otras proteínas, glicoproteínas y carbohidratos. Cada fabricante tiene su preparación de referencia interna para determinar la actividad inmunológica de una preparación de extracto alérgico. Para evaluar la composición de los extractos alérgicos entre lotes se emplean diversos métodos bioquímicos e inmunológicos tales como análisis electroforéticos (SDS-PAGE), análisis de espectros de dicroísmo circular, análisis inmunoquímicos, análisis de espectrometría de masas y enfoques proteómicos, entre otros, para controlar la composición constantes del producto alérgico respecto al de referencia (Jeong, Hong, Lee, & Park, 2011). La preparación de referencia interna se utiliza posteriormente como ejemplo para ajustar la actividad alérgica de cada lote comercial *in vitro*. En algunos casos los alérgenos se modifican previamente para producir alérgoides con el fin de aumentar su inmunogenicidad y/o brindar una menor capacidad para unirse a IgE específicas, disminuyendo el efecto inflamatorio de su administración (Pajno, 2007).

A pesar de los esfuerzos de obtener condiciones normalizadas de extracción y contracción de alérgenos de interés entre los diferentes extractos, en la práctica se presenta una muy alta variabilidad entre los extractos así como déficits en los procesos de purificación que se reflejan en la clínica como falta de eficacia dentro de la inmunoterapia y baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico; la calidad de los extractos polínicos es crítica para ambos procesos, se ha descrito que la concentración de alérgenos principales individuales se correlaciona con la potencia biológica y la actividad-IgE de extractos de alérgenos (Jeong et al., 2011). Los alérgenos recombinantes ofrecen la posibilidad de utilizar

moléculas bien definidas con una calidad farmacéutica consistente definida en unidades de masa, además permiten identificar dominios relevantes en las reacciones cruzadas frente a otras plantas. La importancia en la obtención de extractos alergénicos adecuadamente estandarizados es uno de los objetivos principales en países desarrollados, por tal motivo, la Unión Europea ha estado financiando un gran proyecto multidisciplinario para mejorar la estandarización de alérgenos en Europa (Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification) (Jeong et al., 2011). El objetivo final del proyecto es desarrollar materiales de referencia candidatos que consistan en los alérgenos principales purificados naturales o preferentemente recombinantes. Dado que la población meta de la inmunoterapia es aquella que sufre de rinitis alérgica y asma por polinosis en un espacio y tiempo determinado, el primer paso para llevar a cabo una adecuada estandarización de los antígenos polínicos de relevancia clínica es determinar cuáles, de entre las especies vegetales endémicas o recurrentes de una zona geográfica, conllevan a una reacción alérgica de mayor intensidad y en un cantidad de individuos significativa respecto a la población total con rinitis alérgica y asma en la región o población delimitada.

3.2 Identificación de especies alergénicas

La identificación habitual de pacientes sensibilizados a un alérgeno específico se lleva a cabo mediante pruebas cutáneas tipo *Prick test* o de estimulación rino-nasal. En la práctica clínica la metodología preferida es la utilización de la prueba cutánea tipo *Prick Test*; esta se realiza seleccionando diferentes extractos de polen de relevancia alergénica, que se aplican en micropunciones realizadas en la zona del antebrazo o en la espalda. Esta técnica tiene las cualidades de que permite evaluar la actividad de diferentes extractos de manera simultánea, con pocas molestias a las pacientes, de forma no invasiva y que además permite una valoración semicuantitativa del grado de respuesta al estímulo con base al

diámetro de la reacción desarrollada, adicionalmente esta técnica permite el uso de controles tanto positivos (ej. histamina) como negativos (ej. solución salina, solución de glicerina, o preferentemente la solución base del extracto de los extractos evaluados) que sirven para identificar que el tratamiento farmacológico del paciente no esté interfiriendo con la identificación del agente causal, así como para descartar la contaminación con alérgenos en los utensilios empleados. Numerosos autores seleccionan esta técnica en la identificación de antígenos alergénicos para identificar a los pacientes que presentan sensibilización a las especies de interés (Becerril et al., 2008; Rodríguez et al., 2011; Tehrani et al., 2010). Los criterios pueden ser variables pero de acuerdo a las principales guías y metodologías se considera una prueba *prick test* positiva cuando se presenta una roncha de al menos 3 mm de diámetro más grande que el control negativo, rodeada por un eritema (Bousquet et al., 2012; Heinzerling et al., 2013). Se debe considerar que previo a la prueba se les solicita a los pacientes suspender el tratamiento con antihistamínicos al menos durante tres días antes de la prueba.

3.3 Identificación y caracterización de antígenos

Anteriormente se han descrito diferentes metodologías para llevar a cabo la identificación de antígenos de polen de relevancia clínica. Chakraborty y colaboradores realizaron un estudio en la India sobre la identificación de alérgenos en una población de 448 sujetos alérgicos sensibles a diferentes tipos de polen de palma identificados mediante pruebas *prick test*. La metodología para determinar el nivel de IgE específica en cada uno de los sueros para cada extracto de polen describe el uso de un ensayo tipo ELISA específico para el extracto alergénico de palma, usando conjugado de un anticuerpo anti-IgE humana acoplado a peroxidasa. La clasificación de sueros positivos se definió en una relación >3.5 veces mayor de la relación de la densidad óptica del paciente frente al suero control (no atópico). Posterior a la identificación realizaron un inmunoensayo tipo *Western blot* para identificar los componentes alergénicos

significativos. Cabe destacar que adicionalmente realizaron una comparación microscópica de los granos polínicos colectados para comparación morfológica y que los extractos que utilizaron en todas sus determinaciones fueron obtenidos por extracción experimental en el laboratorio. Su investigación cobra una gran relevancia en la identificación de antígenos alergénicos específicos para su población respecto a otros ya descritos, distinguiendo que los antígenos de relevancia pueden presentarse con amplia gama de tamaños (100 a 16 kDa) poniendo en evidencia la necesidad de evaluar todas las proteínas presentes en el extracto. Adicionalmente destacan que los granos de polen alergénicos con reactividad cruzada no necesariamente presentan una similitud morfológica (Chakraborty et al., 2004).

Aunque la metodología de *Western blot* permite una separación y diferenciación selectiva, la concentración relativa de las proteínas de interés o la superposición del espectro de masas de proteínas no adecuadamente purificadas puede generar problemas interpretativos, especialmente en muestras con proteínas de composición y tamaño similares, además de otras sustancias. Debido a estas condiciones, en la gran mayoría de las investigaciones bioquímicas que utilizan extractos biológicos es necesario llevar a cabo procesos previos de purificación. En estos puntos es crítico realizar determinaciones experimentales que permitan obtener las proteínas de interés de una forma eficiente, en buena concentración y manteniendo sus propiedades biológicas de interés (Chávez Rojo, 2017).

Caracterizaciones previas en antígenos alergénicos en *Chenopodium album*, utilizando extracto de polen comercial refieren la necesidad de múltiples pasos de cromatográficos para obtención de antígenos adecuados para caracterización. Barderas y colaboradores refieren los primeros pasos de purificación a través de una columna de filtración en gel (Sephadex G-75) y posteriormente una cromatografía en una columna de afinidad de poli-L-prolina. Cabe señalar que en todos los procesos donde se busca la purificación de antígenos se utilizan eluyentes compatibles que preserven los dominios

alergénicos reconocidos por las IgEs de pacientes sensibilizados. De acuerdo a la descripción metodológica de los investigadores adicionalmente se requirió la utilización de otros métodos de intermedios como la diálisis y la liofilización en casos de necesidad de cambio de medio. En la fase final del aislamiento de los antígenos y con el fin de realizar una purificación más fina, se menciona la utilización de una cromatografía de fase reversa a través de columnas C₁₈ acopladas a un HPLC. Durante la caracterización, Barderas y colaboradores recalcan la importancia de realizar análisis en los diferentes pasos de cromatografía mediante SDS-PAGE y inmunodetecciones para la identificación de fracciones de alta importancia, estos pasos además permiten ir realizando una caracterización molecular (Barderas y Villalba). La separación por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras utilizando una concentración de 12% a 15% de acrilamida muestra excelentes resultados en la separación de extracto polínico (Tehrani et al., 2010). La estandarización de concentración en las electroforesis SDS-PAGE se pueden realizar mediante tinciones reversibles del gel como en la tinción con Azul de Coomassie brillante (Hasnain et al., 2016) o de mayor sensibilidad como en la tinción de plata (Steinberg, 2009), mientras que el revelado con quimioluminiscencia para detectar los inmunocomplejos en el *Western blot* ha sido una de las técnicas en muchos laboratorios por su alta sensibilidad y estabilidad de la reacción, que además permite tener una evaluación que puede ser dependiente del tiempo de exposición (Tao & He, 2005).

Variaciones en las metodologías de identificación de proteínas con actividad alérgica también incluyen la utilización electroforesis de una y 2 dimensiones (Mousavi et al., 2017), y con pasos finales de identificación completa utilizando un análisis de espectrometría de masas (Tiotiu et al., 2016). En todas y cada una de las caracterizaciones es constante la utilización de IgE procedente de pacientes atópicos sensibilizados al extracto polínico de especie vegetal, identificados mediante una preselección de candidatos mediante pruebas *prick test* y confirmado por métodos de inmunodetección de mayor sensibilidad. El

análisis estructural de las proteínas alergénicas relevantes en la clínica permite la identificación de homología secuencial o estructural que caracterizan un potencial alergénico y que pueden determinar la reactividad cruzada entre alérgenos de pólenes de distintas especies (Offermann et al., 2016), en el análisis a este nivel se han identificado a las profilinas como algunas de las principales proteínas alergénicas en especies vegetales (Landa-Pineda et al., 2013; Valenta et al., 1993).

Cuando los alérgenos ya han sido aislados, caracterizados molecular y estructuralmente, se pueden llevar a cabo de técnicas recombinantes para la producción en masa de antígenos con relevancia tanto en la clínica como en la investigación. Los antígenos purificados se utilizan ampliamente en la caracterización fundamental del mecanismo de activación de la respuesta alérgica utilizando una gran gama de modelos animales, celulares y moleculares como son los modelos murinos de sensibilización (Groeme 2016) así como ensayos de proliferación en células humanas (Groeme et al., 2016; Rosas Alvarado, Montes Montes, & Garcia Latorre, 2008).

3.4 Especies alergénicas en México

En México, numerosos artículos basados en datos clínicos de la Ciudad de México ha corroborado la participación del polen como agente causal de rinitis alérgica y asma, donde se ha evidenciado que en ciertas zonas de la Ciudad de México, hasta un 56% de pacientes deben sus sintomatología a la sensibilización a malezas y un 33% y 11% a sensibilización a árboles y gramíneas, respectivamente (Gaspar-López et al., 2014). Los estudios cronológicos en la identificación de pólenes de relevancia clínica en la CDMX mencionan a los géneros *Chenopodium* y *Amaranthus* a través de las décadas y en la actualidad. En la Tabla 3.4.1 se muestra una comparación de origen de pólenes alergénicos de malezas relevantes en México a través del tiempo con base a los artículos de

Terán (2014) y Gaspár (2014). En ambas evaluaciones destaca de manera constante la familia *Amaranthaceae* con la subfamilia *Chenopodioideae*, antes *Chenopodiaceae*.

Tabla 3.4.1. Identificación de las malezas alergénicas en la CDMX en las últimas décadas.

Origen	Década				Periodo de tiempo
	1940	1970	1980	1990	2007-2014
Malezas	<i>Ambrosia</i>	<i>Artemisa</i>	<i>Ambrosia</i>	Cheno-Am	Amaranthus
	Cheno-Am	<i>Cosmos</i>	Chenopodium	<i>Compositae</i>	Chenopodium
	<i>Helianthus</i>	<i>Helianthus</i>	<i>Compositae</i>	<i>Cruciferae</i>	<i>Artemisa</i>
	<i>Reseda luteola</i>	<i>Rumex</i>	Cheno-Am	<i>Daucus</i>	<i>Heliantus</i>
	<i>Rumex</i>				<i>Ambrosia</i>

Aunque los estudios se realizan comparando la respuesta de los pacientes diagnosticados con rinitis alérgica o asma a pólenes, pocos de ellos consideran un estudio profundo que considere polisensibilidad a polen u otros aeroantígenos. Este es un factor muy relevante que puede generar sesgos estadísticos poblacionales y de impacto socioeconómico al no considerar fuentes variadas como origen de la patología, por lo tanto, un factor determinante a considerar durante los estudios de prevalencia de polinosis en una región específica, es identificar la actividad alérgica cruzada entre dos o más especies de las regiones aledañas. La reactividad cruzada se en alergias se define como el

desarrollo de sintomatología de manera consecuente a la interacción de IgE específica a una fuente proteica sin que haya existido contacto previo con la misma; esto implica que aunque la respuesta inmunológica fue generada contra un antígeno específico, la alta similitud estructural con otro antígeno, permite un reconocimiento previo a la sensibilización. Las condiciones que permiten el desarrollo de esta condición varía mucho de acuerdo a la respuesta inmune individual así como a el tipo e intensidad de la exposición al alérgeno, sin embargo se ha identificado que la principal característica es la naturaleza del antígeno (Nieto et al., 2004). La reactividad cruzada frecuentemente se presenta en especies relacionadas taxonómicamente, sobre en todo en proteínas específicas de familias o subfamilias, aunque no se descarta que la reactividad cruzada se pueda presentar en especies sin relación estructural o taxonómica, e incluso con algunos alimentos o materiales, como es el caso de la alergia al látex y el plátano (Delbourg et al., 1996).

En el artículo original de Rosas-Alvarado *et al.* (2011), *Atlas de los pólenes alergénicos de mayor relevancia en México* se llevó a cabo una evaluación y comparación morfológica de los pólenes más utilizados en pruebas cutáneas (PC), donde se puede observar que respecto a las malezas tanto el género *Amaranthus* como *Chenopodium*, ambos derivados del Orden las *Caryophyllales*, comparten semejanzas relevantes en la morfología y dimensión de sus granos de polen: tamaño pequeño a mediano (23-28 μm), de forma esferoidal, superficie escábrida y numerosos poros con membrana granulada (Figura 3.4.1). Estas similitudes estructurales se pueden asociar a que dichos géneros comparten determinantes bioquímicos en su exina e intina que podrían estar caracterizando la estructura del grano de polen así como su actividad alérgica.

Por otra parte, un estudio realizado en México para identificar los principales alérgenos utilizados en la práctica clínica de pruebas cutáneas identifica a los extractos de *Amaranthus* y *Chenopodium* dentro de los 5 extractos de pólenes de maleza de mayor frecuencia de uso en las pruebas cutáneas de rutina, de acuerdo a una encuesta realizada a miembros activos del Colegio

Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia y del Colegio Mexicano de Pediatras Especialistas en Inmunología Clínica y Alergia. De acuerdo al análisis, la selección de extractos de *Amaranthaceae* (*Chenopodium*, *Atriplex*, *Salsola*, *Amaranthus*) destaca junto a otras dos familias (*Asteraceae* y *Urticaceae*.) por sus características de aerobiología local, la alergenicidad del polen descrita en la literatura y la potencial reactividad cruzada con otros pólenes (Larenas et al., 2009).

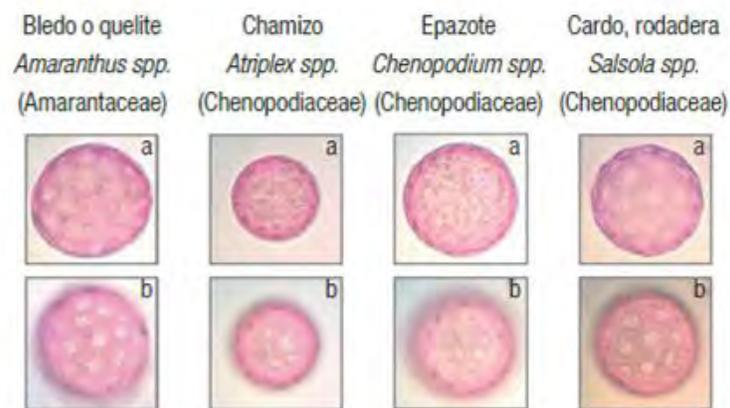


Figura 3.4.1. Comparación morfológica de polen de las familias *Amaranthaceae* y *Chenopodiaceae*. a) Sección óptica. b) Detalle de las aperturas. Tomada de: Atlas de los pólenes alérgicos de mayor relevancia en México (Rosas-Alvarado et al., 2011).

3.4.1 *Amaranthaceae*

La *Amaranthaceae* es una familia taxonómica que describe las características homólogas de 180 géneros con alrededor de 2500 especies, incluyendo a los géneros de *Amaranthus* y recientemente a *Chenopodium*, ambos identificados como dos de los principales agentes causales de polinosis en la CDMX y otras zonas urbanas. Anteriormente, *Amaranthaceae* era una familia considerada independiente de *Chenopodiaceae*, sin embargo diversos estudios ubican a *Chenopodiaceae* como una familia estrechamente relacionada con *Amaranthaceae*, sugiriendo que ambos taxones pueden pertenecer a grupos

hermanos o que bien, una de las familias podría estar derivada de la otra, por lo que recientemente se ha reconocido a *Amaranthaceae* como el taxón principal, del que se desprenden las subfamilias equivalentes de *Chenopodioideae* y *Amaranthoideae*. Publicaciones anteriores a 2013 aún consideran los taxones anteriores sin perjudicar las correctas descripciones o estudios de campo, la denominación de las especies permanece constante.

La subfamilia *Amaranthoideae* corresponde a un conjunto de plantas herbáceas anuales o perennes de tallos rojizos, con inflorescencias de apariencia racimosa, definidas, cimosas y axilares. Aunque algunas de las especies del género *Amaranthus* poseen un alto valor alimenticio, una gran mayoría son consideradas malezas debido a que poseen una gran capacidad invasiva que afecta el crecimiento de las plantas endémicas o aledañas. La distribución geográfica de la familia *Amaranthaceae* se ubica principalmente en suelos salinos y áridos, pero su gran capacidad adaptativa y resistencia a adversidades les permite encontrarse en casi cualquier variedad de suelo, inclusive aquellos contaminados con sustancias tóxicas, como el arsénico. Como malezas tienen una alta distribución en suelos urbanos (Villalba et al., 2014).



Amaranthus palmeri, Phoenix, Arizona 2006- Michael J. Plagens

En *Amaranthaceae* la mayor parte de los géneros son nectaríferas y de perianto rojo o rosa, aparentemente entomófilas, con la notable excepción del género *Amaranthus*, que posee flores carentes de nectarios y de características anemófilas por la producción de granos de polen relativamente pequeños y no ornamentados, con ciclos de polinización ubicados entre Junio y Octubre, fuera de la temporada de polinización de otras especies (Espinosa & Sarukhán, 1997).

La caracterización de antígenos dentro de *Amaranthaceae* ha sido un tema de estudio muy amplio debido a su amplia distribución en muy diversos tipos de suelo y su potencial antigénico. Las especies de *Amaranthaceae* juegan un papel cada vez más importante en la respuesta alérgica. En consecuencia, se espera que las amarantáceas se conviertan en una de las principales causas de sensibilización al polen en diferentes áreas (Villalba et al., 2014).

Dentro de esta familia se han caracterizado y/o expresado como proteínas recombinantes 9 alérgenos, incluyendo 3 de la especie *Chenopodium album* (*Che a 1*, *Che a 2*, *Che a 3*, se describirán a detalle más adelante), 5 de *Salsola kali* (*Sal k 1 a Sal k 5*) y uno de *Amaranthus retroflexus* (*Ama r 2*). En nuestro grupo de investigación, Landa Pineda y colaboradores en 2016 describieron un alérgeno mayor para *Amaranthus palmeri* utilizando una metodología similar a la descrita en las secciones 3.2 (Pruebas cutáneas prick test) y la secciones 8.5 y 8.6 Caracterización de antígenos alérgicos (ensayo ELISA, electroforesis SDS-PAGE, espectrometría de masas); las características de este alérgeno lo definen como una profilina de un peso molecular de 14 kDa (Landa-Pineda et al., 2016).

3.4.2. *Chenopodiaceae*

La subfamilia *Chenopodiaceae*, también llamada familia de la acelga o el quelite, en una rama taxonómica caracterizada por plantas herbáceas más o menos carnosas, anuales o perennes (a veces arbustos) que crecen en hábitats alterados, salinos o xéricos (medio seco); flores pequeñas ubicadas en densas inflorescencia cimosas, con ovario unilocular con un único óvulo solitario y basal. Aunque taxonómicamente hoy en día corresponde a una subfamilia de *Amaranthaceae*, en gran parte de la literatura descriptiva previa a esta clasificación de *Chenopodiaceae* se refieren a ella como familia (Rosas-Alvarado et al., 2011).

Chenopodiaceae engloba 104 géneros y 1510 especies, incluyendo plantas alimenticias como *Beta vulgaris* (acelga), *Spinacia oleracea* (espinaca) y diversas

especies de *Chenopodium* (quelites y quinoa), así como otras ornamentales, como *Atriplex* (armuelle) y *Salicornia* (salicornia) y diversas malas hierbas de los géneros *Chenopodium* (bledo) y *Salsola* (barrilla) (Espinosa & Sarukhán, 1997).

En México las especies del orden de los *Chenopodiales* (*Caryophyllales*) han tenido una gran importancia en la alimentación Mexicana por su alto valor nutricional y gran distribución geográfica. En la dieta indígena se considera como “quelite” (*Chenopodiaceae*) a cualquier planta de la que pueden comer hojas y tallos tiernos y que, generalmente se recolectan en las milpas o sus alrededores.



Chenopodium album- Max Licher, <http://swbiodiversity.org>

El sustantivo quelite deriva del vocablo náhuatl *quilitl* que significa hierba comestible y engloba diferentes especies con nombres comunes como hoja santa (*Piper auritum*), chivitos (*Calandrinia micrantha* Schldl.), pápalo (*Porophyllum ruderale*), las lenguas de vacas (*Sansevieria trifasciata*) y los quelites cenizos (*Chenopodium berlandieri*/ *Chenopodium álbum*) (Mera Ovando, n.d.).

El género *Chenopodium* se caracteriza por distribuirse en suelos ricos en sales alrededor de lugares habitados o alterados, sus flores son inconspicuas y rara vez reciben la visita de insectos, lo que supone una distribución anemófila del polen. Sus hojas a menudo presentan indumentación de pelos con ápices tabicados que contienen agua y oxalatos, los pelos secos sobre las partes maduras generan una apariencia harinosa o ceniza.

Para el género *Chenopodium* se han identificado y aislado 3 antígenos de relevancia clínica encontrados de forma natural en la especie *Chenopodium album* también llamada Lamb's Quarter (Kuntze O. et al., n.d.). Dichos antígenos se caracterizaron y fueron expresados como proteínas recombinantes en bacterias y levaduras. El primer antígeno descrito fue el antígeno de polen **Che a 1**, caracterizado en 2002 por Barderas y su equipo de trabajo. Se trata de un glicoproteína de 143 aminoácidos (aa) y 17 kDa, miembro de la *Ole e 1-like protein family*, de la que presenta identidad entre 27 y 45% con algunos de sus miembros (Villalba et al., 2014). Su secuencia proteica se encuentra en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot bajo el número de acceso Q8LGR0 (NCBI, n.d.-a). La cadena total de aa es de 186, de los cuales la región 1 a 25 constituyen la sección de señalización, mientras que la región del aa 32 a 114 define su identidad a la familia *Pollen proteins Ole e I like*.

Che a 2, el segundo antígeno de mayor relevancia presente en *Chenopodium album* fue también descrito por Bardera *et al*, obteniendo el cDNA codificante para una cadena de aminoácidos de 133 aa perteneciente a un pan-alérgeno de la familia de las profilinas. Ésta familia engloba proteínas de entre 12 y 15 kDa asociadas a la regulación de la dinámica del citoesqueleto y la transmisión de señales intracelulares; se encuentran presentes en todas las células nucleadas, principalmente en derivados vegetales como pólenes y látex, siendo sensibles a cambios de pH y enzimas digestivas. La actividad de Che a 2 se relaciona a la polimerización de la actina, a la cual se asocia en el citoesqueleto. Concentraciones altas de la profilina inhiben la polimerización de la actina, mientras que al unirse a PIP2, inhibe la formación de IP3 y DG (Barderas, Villalba, Y, Batanero, & Rodríguez, 2004; NCBI, n.d.-b).

Che a 3 es un pan-alérgeno al que se caracterizó y obtuvo clona recombinante que genera un polipéptido de 86 aa y una masa de 9.5 kDa y actualmente ya se cuenta con su estructura tridimensional obtenida a partir de cristalografía de rayos X. *Che a 3* pertenece a la familia de las polcalcinas, es decir, una proteína de unión a calcio. Las polcalcinas son proteínas con

secuencias de aa altamente conservadas, el Che a 3 presenta una similitud de secuencia de aa del 90% con Bet v 4 y 89% a Ole e 3 y Aln g4, variando en su comportamiento oligomérico. Además se les relaciona con la germinación y el crecimiento de las plantas, por lo que se encuentran muy presentes en polen de árboles y malezas (Barderas et al., 2004).

4. Hipótesis

Dada la estrecha relación taxonómica de las especies alergénicas *Amaranthus palmeri* y *Chenopodium album*, es posible que ambas especies posean antígenos de relevancia clínica que presentan epítomos que generan una sensibilidad cruzada en la población mexicana de la CDMX

5. Objetivo

Aislar y caracterizar antígenos alergénicos de relevancia clínica presentes en polen de *Chenopodium album* y evaluar la posible reactividad cruzada con antígenos alergénicos de *Amaranthus palmeri*.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de IgE específicas en suero contra antígenos alergénicos del polen de *Chenopodium album* en el suero de pacientes alérgicos a pólenes.
- Evaluar el grado de reconocimiento, la frecuencia de reconocimiento en la población evaluada y el peso molecular aproximado de los antígenos relevantes presentes en el extracto completo de polen de *Chenopodium album*.
- Aislar y purificar algunos de los antígenos alergénicos del extracto alergénico del polen de *Chenopodium album*.
- Determinar si los Ag aislados de *Chenopodium album* son reconocidos por IgE presente en sueros de pacientes alérgicos a *Amaranthus palmeri*.
- Caracterizar a los antígenos aislados mediante espectrometría de masas.

6. Materiales

6.1 Material Biológico

Sueros

Las muestras séricas que se utilizaron durante el desarrollo experimental pertenecen al *Banco de sueros local* del laboratorio de Bioquímica Estructural de la Escuela Nacional de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la responsabilidad del Dr. César Augusto Sandino Reyes López.

Los sueros proceden de diferentes instituciones de salud, obtenidos de pacientes atópicos con diagnóstico con rinitis alérgica, asma o ambos, con pruebas cutáneas positivas a diferentes pólenes. Las muestras se obtuvieron mediante flebotomía de la zona anterior del brazo, utilizando técnicas apegadas a las *Prácticas de Seguridad Generales* y las *Prácticas Óptimas en Flebotomía y Extracción Sanguínea* (OMS/SIGN, 2010). La muestra se recibió en tubos de colección al vacío sin anticoagulante (tubos Vacutainer de tapón rojo); el suero obtenido se alícuotó en tubos de PCR a un volumen entre 50 y 100µl, el número de alícuotas está en función de la abundancia del suero.

Las muestras fueron rotuladas de acuerdo a un código que referencia su origen (Tabla 6.1) y número de paciente. En los casos donde las muestras pertenecen a personas no asociadas a alguna de las instituciones de salud referidas las muestras se rotularon con el nombre del donante o sus siglas correspondientes.

Tabla 6.1 Nomenclatura del código de procedencia de las muestra

Institución de Salud	Clave experimental
Hospital Centro Médico	CM
INER (positivos a polen de árboles)	T
INER (positivos a polen de árbol-maleza)	X
Hospital Juárez (positivos a pólenes)	Jz
Hospital General de México (positivos a pólenes)	SPA
Pacientes ENMyH, IPN (Positivos a pólenes)	Px
INER (negativos a pólenes, ácaros a alimentos)	C

Muestras serológicas de personas sanas sin diagnóstico de rinitis alérgica, asma o alguna patología infecciosa en curso o de carácter inmunológico fueron utilizadas como control negativo (C-).

Extracto alergénico de *Chenopodium album* y *Amaranthus palmeri*.

El extracto alergénico de *Chenopodium album* de obtuvo de la casa comercial ALK-Abello (DIN 00299987) preparado 1:20 w/v preservado en solución glicerinada al 50%. El extracto alergénico de *Amaranthus palmeri* se obtuvo de la misma casa comercial, preparado 1:40 w/v y preservado en solución glicerinada al 50%.

Anticuerpos Comerciales

- HRP Goat anti-mouse IgG (minimal x-reactivity),
Biologend Clone: poly4053 Lot b228777
- Monoclonal Anti-human IgE (antibody produced in mouse),
Sigma Aldrich Clone: GE-1 Lot 066M4869V.

6.2 Soluciones preparadas

Se presentan la cantidad de cada reactivo requerida para preparar un litro de la solución (Tabla 6.2). Para todas las soluciones se utilizó agua ultra-pura (Milli-Q, Tipo 1, grado reactivo) obtenida en un sistema *Millipore Simplicity UV* acoplado a un filtro termial Biopack (Millipore, Co).

Tabla 6.2 Descripción de soluciones empleada en el proyecto

Solución	Descripción	Sustancia/ Compuesto	Cantidad
PBS 10x (Buffer de diálisis)	Amortiguador de fosfatos. Buffer de diálisis. Ésta solución se diluye en proporción 1:10 con agua Milli-Q para obtener PBS 1x.	NaCl	80 g
		KH ₂ PO ₄	2 g
		Na ₂ HPO ₄	12 g
		KCl	2 g
PBS 1x –Tween 0.05% (PBS-Tween)	Solución de lavado en ensayos de ELISA.	PBS 10x	100 mL
		Tween 20	0.500 mL
Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6	Solución para fijar el antígeno en los ensayos de ELISA.	Na ₂ CO ₃	1.6 g
		NaHCO ₃	2.9 g
Solución de Bloqueo	Solución de leche en polvo al 2% para los ensayos de ELISA	Leche en polvo	20.0 g
		PBS-Tween	c.b.p. 1 L
TRIS-HCl 10x	Solución amortiguadora de TRIS pH7.6. Ésta solución se diluye en proporción 1:10 con agua Milli-Q para obtener TRIS-HCl 1x.	Trizma base	61 g
		HCl	c.b.p. ajustar el pH de la solución a 7.6
Solución Blue-Silver	Tinción de proteínas en gel	Coomasie G-250	1.2 g
		(NH ₂) ₂ PO ₄	100 g
		H ₂ PO ₄	100 ml
		Metanol	200 ml
Buffer de Corrida	Buffer iónico utilizado durante la electroforesis proteica, realizada en la técnica de <i>Western blot</i> .	Trizma base	3.0 g
		Glicina	14.4 g
		SDS	1.0 g
Buffer de Transferencia	Buffer de la transferencia proteica membrana gel, realizada durante la técnica de Western Blot.	Glicina	14.262 g
		TRIS (HCl)	3.84 g
		Metanol	200 ml

6.3 Productos Comerciales

Tabla 6.3 Descripción de productos comerciales utilizados

Producto	Marca
TMB- Single Solution	Thermo Fisher Scientific
TMB- Solution for Blotting	Thermo Fisher Scientific
Bradford Reagent	Sigma Aldrich
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
<i>Membrana de diálisis SpectralPore</i>	Spectrum Laboratories Inc
Membrana de transferencia de PVDF	Millipore
Gel de poliacrilamida prefabricado	Bio-Rad
High Sensitivity Silver Staining of SDS-PAGE Gels	Thermo Fisher Scientific

6.4 Columnas de Cromatografía

Se nombran las columnas de cromatografía utilizadas durante el proyecto, con sus respectivas características.

Columna de exclusión molecular: *Superdex 75*

Marca	GE Healthcare Lote 10061257
Límites de exclusión	10-75 kDa
Volumen total	24 mL
Presión máx.	5 MPa
Vol. máx. de inyección	1.25 mL (5% de vol. Total)

Columna de intercambio iónico: *Hitrap CaptoQ*

Marca	GE Healthcare
Tamaño de partícula	90 µm
Volumen total	1 ml
Presión máx.	0.5 MPa

Columna de fase reversa C18

Marca	Agilent Technologies
Tamaño de partícula	5 μm
Volumen total	1 ml
Presión máx.	400 bar

6.5 Equipos

- Espectrofotómetro
- FPLC: ÄKTA Pure Chromatography System. GE Healthcare
- HPLC Agilent technologies
- Lector de placa de ELISA: Microplate Reader (ELISA)
- Equipo de liofilización
- Centrífuga de tubos eppendorf
- Centrífuga de tubos falcon

7. Métodos

7.1 Elaboración de la curva patrón determinación de concentración proteica: Técnica de Bradford

Existen numerosos métodos para determinar la concentración de proteínas que se adaptan a los diferentes requerimientos de sensibilidad y selectividad de acuerdo a las características de una muestra, los equipos y reactivos disponibles, así como a los tiempos de experimentación. La técnica de Bradford es ampliamente utilizada debido a que presenta una metodología sencilla, reproducible y rápida, que utiliza pocos reactivos, permite generar un proceso automatizado gracias a sus tiempos de incubación breves y estabilidad de lectura, presentando una sensibilidad relativamente alta respecto a técnicas espectrofotométricas simples en un intervalo de concentración de 1µg/mL a 1.5 mg/mL. Entre sus desventajas se encuentran el presentar una significativa variación entre las proteínas de referencia y la proteína de interés de acuerdo a su proporción de aminoácidos aromáticos, requiere la realización de una curva patrón y tiene una relativa incompatibilidad al uso de detergentes.

La técnica se basa en la propiedad del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 de presentar dos formas coloreadas, la disolución acuosa con ácido fosfórico genera una solución catiónica de coloración rojiza pardo. La estructura química del azul de Coomassie G-250 posee una gran cantidad de grupos aromáticos que al interactuar con entorno hidrofóbico de las proteínas genera un cambio de su coloración de rojo pardo a azul intenso, el complejo colorante-proteína presenta un alto coeficiente de extinción y una absorción máxima en un rango de 465 a 595 nm. Esta metodología depende en gran medida de la unión inespecífica entre el colorante y las regiones hidrofóbicas de la proteína, por lo que su exactitud se ve afectada por la proporción de aminoácidos hidrofóbicos y la presencia de contaminantes que modifiquen la interacción entre ellos (García-Arellano & Vázquez-Duhalt, 1998; Kruger, n.d.).

Descripción de la técnica experimental

La cuantificación de proteínas totales del extracto se realizó por el método de Bradford utilizando un estándar de albúmina de suero bovino con una concentración de formulación de 2 mg/mL, a partir de la cual se efectuaron las diluciones respectivas para obtener soluciones independientes con concentraciones de 0, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL de proteína en Buffer PBS. Todas las lecturas a 595 nm de las muestras o estándares se realizaron por duplicado. Las muestras se diluyeron 1:10 en PBS y a 33 µL de esta solución o de los estándares, se le agregaron 1 mL del reactivo de Bradford, se incubó por 15 minutos y se registraron las absorbancias a 595 nm de cada muestra o estándar.

7.2 Evaluación de la presencia de IgE específicas para alérgenos del polen de *Chenopodium album* por ELISA.

El ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzima (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es un método inmunoenzimático en fase sólida que se utiliza en la detección de Ag o Ac presentes en una muestra con la ventaja de no usar marcadores radioactivos, manteniendo una alta sensibilidad y especificidad comparables al método de Radioinmunoensayo (Zambrano Villa, 2007).

El ELISA se desarrolla incubando, ya sea un Ag o Ac, sobre una superficie inmunoabsorbente, minimizando el efecto de la unión inespecífica en la sensibilidad del ensayo mediante el uso de agentes bloqueadores, para que ocupen las zonas del pocillo no recubiertas en la incubación inicial y de acuerdo al tipo de ELISA (directo, indirecto, sándwich), se añade la muestra de reconocimiento, la cual posee una fracción de marcaje con actividad enzimática (ELISA directo); en caso de que no la posea se requerirá el uso de anticuerpos secundarios marcados para generar los conjugados con actividad enzimática.

Descripción de la técnica experimental

Se adsorbieron por duplicado 5 µg de proteínas totales del extracto total del polen de polen de *Chenopodium album* en una placa para ELISA (Corning Costar® de 96 pozos) diluidos en 50 µL amortiguador de carbonatos pH 9.6. La placa se incubó durante toda la noche (ON) a 4 °C. Los pozos se lavaron tres veces con un amortiguador de PBS pH 7.4 con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween 0.05%). Los pozos se bloquearon por 2 horas a temperatura ambiente (TA), con una suspensión de leche descremada (Svelty®) al 2% en PBS adicionado con 0.05% Tween 20. Posteriormente, los pozos se incubaron por duplicado con 50 µL de sueros de pacientes alérgicos diluidos 1:10 en solución de bloqueo, se incubó la placa por 1 hora a TA y ON a 4 °C.

El exceso de anticuerpos se eliminó lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y los pozos se incubaron 2 horas a TA con 50 µL de un anticuerpo monoclonal de ratón contra IgE humana diluido 1:5000 en solución de bloqueo (Sigma-Aldrich®). Después de lavar los pozos 5 veces con PBS-Tween 0.05%, los pozos se incubaron durante 2 horas a TA con 50 µL de un anticuerpo policlonal de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) contra IgG de ratón, diluido 1:1500 en solución de bloqueo (BioLegend®). Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y finalmente para evidenciar la presencia de complejos, se agregaron 50 µL de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB; Sigma-Aldrich®) permitiendo el desarrollo de la reacción en ausencia de luz durante 25 minutos a TA. La reacción se paró con 50 µL de una solución 1N de HCl. Las absorbancias de cada pozo de la placa se registraron en un lector de placas ELISA a 450 nm (Shenzen Emperor Electronic Technology Co., LTD).

7.3 Análisis electroforético del extracto alergénico de *Chenopodium album*.

La electroforesis en gel es una técnica de laboratorio ampliamente versátil que permite la separación de los componentes cargados de una mezcla compleja a través de un semisólido por acción de un campo eléctrico. Dicho movimiento se efectúa, de acuerdo a la estandarización del método, las moléculas cargadas se desplazarán hacia el electrodo de carga contraria de manera unidireccional. Las características del sistema que determinan la velocidad del desplazamiento incluyen factores como la temperatura del sistema, la densidad o grado de entrecruzamiento del gel, el pH, la concentración iónica del medio y la fuerza del campo eléctrico, principalmente (Bio-Rad, n.d.). Cuando se realiza una estandarización de dichas condiciones el factor determinante dependerá de las características de las moléculas. En la variedad de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) las moléculas son sometidas a una electroforesis en condiciones fisicoquímicas desnaturizantes y enmascaramiento de carga eléctrica constantes durante el proceso, por lo que la separación que se lleva a cabo depende a la masa molecular de los compuestos presentes en la muestra, generándose un patrón de separación con una relación distancia-masa molecular.

Descripción de la técnica experimental

El perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto total del polen de *Chenopodium album* se obtuvo en geles de poliacrilamida de gradiente (4-20%) o al 16%.

Las muestras (30 µg por carril) se desnaturizaron en un buffer de carga y se colocaron a ebullición por 3 minutos. A los geles de gradiente se les aplicó un voltaje constante de 150 V, mientras que a los geles al 16% se les aplicó un voltaje de 80 V hasta que el frente llegara al gel separador y posteriormente 120 V. Como referencia de masa molecular se utilizaron marcadores de 10 a 170 KDa (Bio-Rad®) Al término de la corrida los geles

se tiñeron con azul de Coomassie (Georgiou et al., 2008) y se destiñeron con agua hasta que ya no se observara colorante en las zonas del gel que no tuvieran proteínas. En algunos experimentos electroforéticos se realizaron tinciones con nitrato de plata para aumentar la sensibilidad de detección [en el orden de ng en lugar de los μg que detecta el azul de Coomassie (Chevallet, Luche, & Rabilloud, 2006)], para lo cual se empleó un kit de tinción SilverQuest™ Silver Staining (Thermo Fisher Scientific).

7.4 Ensayos de inmunodetección por *Western blot*.

Western blot es una técnica desarrollada en la Universidad de Stanford que permite efectuar un análisis cuantitativo de la abundancia relativa de proteínas específicas a partir de mezclas complejas, con una amplia gama de variantes que se adaptan a las necesidades experimentales dadas por las características de la proteína de interés. En esta técnica, una mezcla de proteínas se separa en función del peso molecular a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta separación genera una banda para cada conjunto de proteínas con determinada masa molecular. Las proteínas separadas se electrotransfieren a una membrana, que puede ser de nitrocelulosa o de cloruro de polivinilo (PVDF), conservando el patrón de separación. La membrana posteriormente se incuba con anticuerpos específicos para las proteínas de interés. Los anticuerpos unidos pueden estar acoplados a enzimas o ser detectados por anticuerpos secundarios acoplados a enzimas como HRP. Para evidenciar los complejos se suelen usar sustratos que se precipitan sobre la membrana y que generen luminiscencia para ser detectados a través de placas radiográficas (Mahmood & Yang, 2012).

Descripción de la técnica experimental.

Para identificar las fracciones proteicas que se reconocen por las IgE del suero de pacientes identificados como alérgicos al polen de *Chenopodium*

album se estandarizó un ensayo de inmunodetección por *Western blot*. Se fraccionaron las proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en las mismas condiciones descritas anteriormente (sección 7.2.2), pero sin teñir con el azul de Coomassie. Las proteínas separadas se electrotransfirieron del gel a una membrana de PVDF, previamente hidratada con metanol y equilibrada en buffer de transferencia (Tris-glicina pH 8.5 con 20% de metanol) por el método de transferencia semi-húmeda a 300 mA por 1.5 horas. Se cortaron los carriles conteniendo proteína y para bloquear las zonas de la membrana que no contenían proteínas, la membrana se dejó secar completamente a TA. Posteriormente, se incubó de forma individual cada tira con suero de pacientes (los que resultaron positivos a IgE específicas para alérgenos del polen de *Chenopodium album* en los ensayos de ELISA) diluidos 1:10 en solución de bloqueo, durante 1 hora a TA y ON a 4 °C. Las tiras se lavaron dos veces con PBS-Tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpos IgE, provenientes de pacientes, que no se unieron a las proteínas transferidas a la membrana. Las tiras se incubaron 2 horas a TA con un anticuerpo monoclonal de ratón contra IgE humana (1:4000), después de lavar los pozos 5 veces con PBS-Tween 0.05%, se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a HRP (1:1500) durante 2 horas a TA.

Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y finalmente los complejos se revelaron por quimioluminiscencia (ECL, GE®) y placas radiográficas (Kodak®) y/o con una solución de TMB para blot (Biosciences®).

7.5 Métodos de purificación

7.5.1 Diálisis

El proceso de diálisis es una técnica de filtración basada en el tamaño de partícula. Consta de una membrana permeable a través de la cual, mediante difusión simple y de acuerdo a su tamaño, pasan los solutos del interior hacia el medio (buffer de diálisis) y viceversa. El éxito de la técnica radica en dos parámetros fisicoquímicos modulables: el tamaño de apertura de la membrana y la concentración del medio que la rodea. La selección del tamaño de apertura de la membrana está en función del tamaño molecular de la proteína a dializar: las impurezas o medio a retirar deben ser de menor tamaño al del poro de la membrana, mientras que la proteína a purificar debe de ser de mayor tamaño al poro de la membrana. El buffer de diálisis consiste en un medio acuoso con compatibilidad bioquímica con la proteína a purificar, el cual debe poseer una concentración de solutos menor a la de la mezcla inicial; un gran volumen de buffer y su agitación constante evita que se sature el medio cercano a la membrana y optimiza el proceso, sin embargo, la saturación a largo plazo es inevitable y se requiere el cambio completo del buffer de diálisis cada cierto tiempo para continuar favoreciendo el proceso.

Descripción de la técnica experimental

En la técnica desarrollada se utilizó membrana de diálisis de celulosa regenerada con un de tamaño de apertura de poro que retiene moléculas mayores a de 3.5 kDa y una capacidad volumétrica de 1.1mL/cm o 6.4mL/cm.

- De acuerdo a la cantidad a dializar la membrana se corta dejando un exceso de 1.5 cm de cada lado para sellarla. La muestra se introdujo en la membrana permitiendo que quede un espacio con aire en una proporción 3:1 y se selló (con hilo de algodón o pinzas) corroborando que la bolsa no presentara fugas y que hubiera suficiente aire para flotar en el medio.

- Posteriormente, la membrana con la muestra se introdujo en un contenedor con buffer de diálisis a una temperatura de 4 °C con agitación constante durante un mínimo de 18 horas, renovando el medio completamente cada 8 horas.

7.5.2 Aislamiento de antígenos alergénicos por técnicas cromatográficas.

La cromatografía se describe como una técnica para separar y/o identificar los componentes en una mezcla. Aunque existen una muy amplia gama de tipos de cromatografía el principio básico global en ellas es que los componentes en una mezcla tienen diferentes características que generan diferentes tendencias para adsorberse en una superficie o disolverse en un solvente, por lo tanto en todos los métodos cromatográficos se requiere un medio estático (fase estacionaria) y un medio móvil (fase móvil). Aunque existen muchas variables y adecuaciones específicas de las cromatografías, por sus características de manera general se identifican la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida en columna y cromatografía líquida de alta resolución. De estas últimas existen las variantes; cromatografía de intercambio iónico, permeación en gel o cromatografía de filtración en gel y cromatografía de fase reversa. Estas técnicas se basan en uno de los siguientes fenómenos: adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión molecular o interacción hidrofóbica (Levinson, 2001).

7.5.2.1 Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también llamada de filtración en gel, es un método versátil que permite la separación efectiva de moléculas biológicas con alto rendimiento. Esta técnica utiliza el principio de exclusión para separar moléculas de diferentes tamaños moleculares: las moléculas se separan entre

una fase móvil y una fase estacionaria (que comprende una matriz de porosidad definida) en función de sus tamaños relativos. En la cromatografía de exclusión el tamaño de poro está diseñado para permitir que las partículas de solutos grandes pasen sin retenciones importantes, sin embargo, las partículas pequeñas permean en el gel y se ralentiza su flujo, de modo que cuanto más pequeñas son las partículas, más tiempo tardan en atravesar la columna y por lo tanto, la separación depende del tamaño de partícula (Levinson, 2001; Walls & Loughran Editors, n.d.).

Dentro de la ventajas que hacen esta una de las principales técnicas de cromatografía utilizadas es permite una separación inicial óptima en mezclas complejas en donde se desconocen las principales características de la proteína de interés tales como punto isoeléctrico, tamaño molecular, afinidad a algún ligando, etc. Además, la separación puede realizarse en condiciones específicamente diseñadas para mantener la estabilidad y la actividad de la molécula de interés sin comprometer la resolución. La ausencia de una etapa de unión a matriz molecular también evita el daño innecesario a las moléculas frágiles, asegurando que las separaciones de filtración en gel generalmente dan altas recuperaciones de actividad.

Superdex es una serie de columnas cromatográficas de exclusión por tamaño que consisten en una matriz base compuesta de dextrano unido covalentemente a agarosa altamente reticulada. Su interacción no específica es relativamente baja y generalmente permite una alta recuperación de material biológico (Walls & Loughran Editors, n.d.).

Descripción de la técnica experimental.

En la técnica experimental realizada en el laboratorio se utilizó la columna de exclusión molecular Superdex 75 (Sup 75) 10/300 debido a que en evaluaciones experimentales en otros extractos polínicos ha demostrado una alta eficacia de

separación como separación inicial y alta recuperación de antígenos con baja afectación de su actividad.

La columna de exclusión molecular Sup 75 se acopló al cromatógrafo tipo FPLC (sección 6.5). Previo a la aplicación de la muestra, la columna se lavó con agua Milli-Q (24 mL a 0.2 mL/min) para eliminar el medio de almacenamiento de la columna (etanol al 20%). Posteriormente al lavado la columna se equilibró con PBS (24 mL a 0.9 mL/min) y la muestra previamente filtrada se aplicó a través de un inyector tipo *loop* en un volumen máximo de 0.9 mL. La elusión se realizó empleando 40 mL PBS y se colectaron fracciones de 1 mL c/u en un colector automático. Para determinar la presencia de proteínas en las fracciones, se registró la absorción a 280 nm de forma automatizada y simultánea a la elusión. Las fracciones obtenidas posteriormente fueron analizadas a través de ensayos de ELISA para evaluar el reconocimiento por IgE del suero de pacientes alérgicos.

7.5.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico

La cromatografía de intercambio iónico es una variación de cromatografía que permite la separación de moléculas ionizables en función de las diferencias en las propiedades de carga (Walls & Loughran Editors, n.d.). De manera similar a la cromatografía de exclusión molecular, este tipo de columnas tiene un revestimiento sólido como fase estacionaria, este revestimiento se denomina resina y tiene grupos cargados positivamente (intercambio aniónico) o negativamente (intercambio catiónico) unidos covalentemente a ella. Cuando la muestra se carga en la columna, las proteínas pueden unirse a intercambiadores catiónicos o aniónicos dependiendo de su carga neta. Una vez unidas las proteínas, para eluirlas diferencialmente de la columna de la columna se suele formar un gradiente que incrementa gradualmente fuerza iónica de la fase móvil

(aumentando la concentración de una sal, por ejemplo NaCl). La afinidad con la que una proteína se une a un intercambiador iónico depende de la fuerza iónica del medio dado por la competencia entre los grupos cargados de la proteína y los iones de la fase móvil, en consecuencia las proteínas con mayor número de cargas opuestas al intercambiador se unirán más fuertemente y por lo tanto serán más difíciles de eluir, requiriendo una fuerza iónica mayor que las proteínas con un menor número de cargas (Chávez Rojo, 2017; Levinson, 2001).

La técnica de cromatografía de intercambio iónico posee una gran capacidad de manejo de muestras, amplia aplicabilidad (particularmente a proteínas y enzimas), costo moderado, poderosa capacidad de resolución y facilidad de gradiente y automatización, estas características que la han llevado a que se convierta en una de las técnicas de cromatografía líquida más versátil y ampliamente utilizada.

Descripción de la técnica experimental.

En la técnica desarrollada en el laboratorio se utilizó la columna HiTrap Cpto Q de matriz de agarosa de alto flujo con un extensor de superficie de dextrano y grupo con carga positiva $-N^+(CH_3)_3$, en un volumen de la columna de 1 mL.

Previo a la aplicación de la muestra a la columna, esta se equilibró con un buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8. (5 mL, a 0.6 mL/min). Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular que tuvieron reconocimiento por IgE del suero de pacientes alérgicos (sección 7.5.2.1) fueron aplicadas a la columna a través de un inyector tipo loop. Las muestras se eluyeron a través de un gradiente lineal de 15 volúmenes del mismo buffer adicionado con 1 M de NaCl, colectando fracciones de 0.5 mL c/u y registrando la absorción a 280 nm de forma automatizada y simultánea a la elución. Se analizaron las fracciones obtenidas a través de un ensayo de ELISA para determinar cuáles eran reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos.

7.5.2.3 Cromatografía de fase reversa: HPLC

La técnica de fase reversa se ha convertido en el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada en HPLC e incluye cerca de la mitad de los métodos de cromatografía de líquidos descritos en la literatura. (Esquivel Soto & Leal Guadarrama, 2004). Al igual que en la cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico, la cromatografía de fase reversa se basa en procesos de migración diferencial, con la diferencia de que en la cromatografía de fase reversa se utiliza un empaque o revestimiento hidrofóbico y una fase móvil polar. Las proteínas o compuestos con mayor carácter hidrofóbico tendrán una mayor interacción con la fase estacionaria reflejado en un mayor tiempo de retención.

Descripción de la técnica experimental

Las proteínas previamente obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular (sección 7.5.2.1) y que fueron reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos fueron aplicadas a una columna de fase reversa C18, la cual fue previamente equilibrada con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.12% en agua. La elución se realizó a través de un gradiente lineal de acetonitrilo con 0.1% de TFA. Las fracciones obtenidas (volumen variables) fueron liofilizadas y resuspendidas en PBS para ser analizadas a través de ensayos de ELISA para evaluar la capacidad de cada una de ellas de ser reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos.

7.6 Identificación de antígenos alérgicos por espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis químico estructural de muy amplia distribución que permite la identificación y caracterización de compuestos puros con base en la separación de especie cargadas eléctricamente dentro de una fase gaseosa. En una fase inicial el compuesto es sometido a un

proceso de ionización en el cual el compuesto se descompone en submoléculas cargadas, estas moléculas cargadas son sometidas a un selector de velocidades e inmediatamente a un campo magnético que desvía su trayectoria de forma parabólica hacia el detector. Dado que durante este proceso las moléculas son impulsadas a una velocidad análoga, la desviación generada por el campo magnético que se refleja en el detector dependerá únicamente de la relación masa/carga (m/z) de cada molécula (Urban, 2016). El patrón de detección obtenido será un reflejo de la incidencia de moléculas ionizadas que son detectadas (intensidad relativa vs relación m/z). Durante este tipo de análisis las señales generadas para un compuesto en particular dependen de la estructura, composición, masa y carga de este, por lo tanto el espectro de masas generado es altamente específico y se utiliza como “huella digital” para la identificación de sustancias o el subanálisis de sus variantes. No obstante, la espectrometría de masas tiene las desventajas de requerir muestras de alta pureza para evitar la sobreposición de patrones y que se encuentren en cantidad y condiciones compatibles para el análisis.

Descripción de la técnica experimental

Las fracciones provenientes de la cromatografía de fase reversa (sección 7.5.2.3), que fueron reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Chenopodium album* fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica para su análisis e identificación. Un total de 50 μg de cada fracción fueron digeridas con tripsina de cerdo grado masas y se obtuvieron los perfiles de fragmentación de los péptidos obtenidos, los cuales fueron analizados con el Software Protein Pilot™ utilizando la base de datos de UniProt (www.uniprot.org) general al 66% (% similitud de los perfiles obtenidos comparados con los de todas las proteínas de la base) y la base de proteínas de polen al 66%.

7.7 Evaluación de reactividad cruzada de antígenos alergénicos con proteínas del polen de por inhibición por ELISA.

El ensayo de inhibición por inmunoadsorción acoplado a enzimas es una variante de los ensayos tipo ELISA que permite una evaluación cuantitativa del grado de disminución de la unión antígeno-anticuerpo por la presencia de un inhibidor específico. Previo a la adición del anticuerpo primario al antígeno fijo, el anticuerpo es preincubado con un inhibidor, los anticuerpos con reconocimiento a epítopos presentes en el inhibidor serán bloqueados evitando su conjugación con el antígeno fijo de interés, reflejándose como una disminución de la señal emitida al final del ensayo. El grado de inhibición obtenido en las preincubaciones dependerá de la concentración del inhibidor añadido y la presencia de anticuerpos primarios que ligan al inhibidor, por lo cual una evaluación adecuada requiere la información de un control de la condición experimental sin el inhibidor.

Descripción de la técnica experimental.

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de fase reversa que fueron reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Chenopodium album* fueron analizadas a través de ensayo de inhibición por ELISA. Se adsorbieron 2 µg de proteínas totales de un extracto alergénico de *Amaranthus palmeri* en una placa para ELISA de 96 pozos en las mismas condiciones descritas en los ensayos de ELISA indirecta. Simultáneamente se pre-incubó una mezcla de suero de pacientes alérgicos al polen de amaranto con diferentes concentraciones de las fracciones purificadas (sección 7.5), hasta 10 µg, durante 16 horas a 4 °C. Después de bloquear la placa con una suspensión de leche al 3%, se adicionaron a la misma 50 µL de los sueros pre-incubados y se incubaron por 4 horas más a 37 °C. El exceso de anticuerpos se retiró, se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween 0 (0.1% de concentración final), se incubó 2 horas a 37 °C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti IgE humana y 1.5 horas con un anticuerpo policlonal anti IgG de ratón a la misma

temperatura, con 5 lavados entre cada incubación. Los complejos se revelaron con 50 μL de TMB durante 30 minutos y la reacción se paró con 50 μL de HCl 1 M (7.2). Se registraron las absorciones de cada pozo a 450 nm. Para determinar los porcentajes de inhibición se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición}(\%) = 100 - \left(\frac{A_{450}[x]}{A_{450}[0]} \right) * 100$$

En donde $A_{450} [x]$ es la absorción observada en los pozos con una concentración específica de inhibidor y $A_{450} [0]$ es la observada para los pozos sin inhibidor.

8. Resultados y Análisis.

8.1 Concentración de proteínas totales del extracto alergénico del polen de *Chenopodium album*.

El extracto proteico comercial del polen de *Chenopodium album* empleado en el presente trabajo corresponde a una solución esterilizada que se obtiene en un amortiguador de fosfatos salino en una proporción 1:20 (w/v), por lo que no se cuenta con una referencia de la concentración de proteínas que se encuentran en el mismo y por lo tanto fue necesario determinar esta mediante cuantificación por el método colorimétrico de Bradford.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración del estándar de BSA y el ajuste de los datos a una recta, la concentración de proteínas totales para el extracto se determinó en 955 µg/ml (0.99 µg/µl).

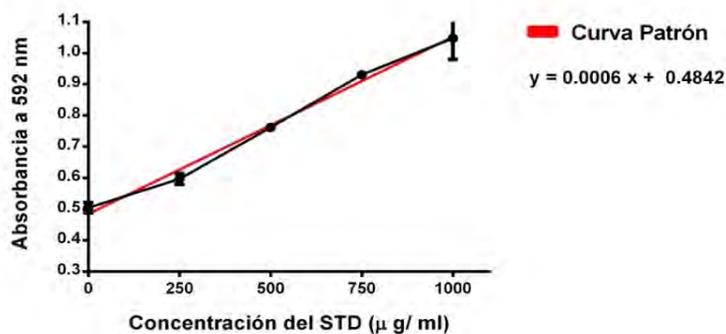


Figura 8.1. Curva patrón elaborada con BSA (STD) para la determinación de la concentración de proteínas totales del extracto proteico de *Chenopodium album* por el método de Bradford.

La concentración total de proteínas obtenida es similar a la reportada recientemente para un extracto del polen de *C. album* en condiciones controladas de laboratorio, la cual fue de 1.1 mg/mL (El-aziz, Shaaban, Atwa, & El-maksuod, 2016).

Si bien no existe una referencia general que nos indique cual es la concentración mínima de proteínas totales requerida para un extracto alergénico

de polen, es comprensible pensar que se requiere una cantidad suficiente de proteínas de manera que todos los antígenos alergénicos se encuentren representados en el mismo. La concordancia entre la concentración de proteínas obtenida para el extracto comercial con el que trabajamos y uno realizado en condiciones controladas en un laboratorio de investigación en Egipto, nos permite suponer que el extracto con el que se trabajó podría contener la concentración de proteínas máxima para este polen.

8.2 Determinación de la presencia de IgE en el suero de pacientes alérgicos a través de ensayos de ELISA.

Para determinar la prevalencia de pacientes alérgicos a pólenes que presentan IgE en suero específicas para antígenos alergénicos del polen de *Chenopodium album*, se analizó un banco de sueros de 269 pacientes a través de ensayos de ELISA, los cuales provienen de diversos centros de salud de la Ciudad de México (Tabla 8.2.1).

Tabla 8.2.1 Procedencia de los sueros de pacientes alérgicos que conforman el banco analizado

Procedencia	Nº de Sueros
Hospital Juárez de México	44
Centro Médico Nacional S XXI	54
Hospital General de México	40
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	82
Clínica Escuela de la ENMyH-IPN	49
Total	269

El criterio de positividad se adoptó de las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, las cuales establecen que en un paciente se considerará que presenta IgE específicas contra alguna fuente alérgica cuando los valores de absorción en un ensayo de ELISA sea superior al valor promedio observado para el suero de individuos no alérgicos más tres desviaciones estándar de esos valores. El promedio de absorción a 450 nm (A₄₅₀) observado en los ensayos de ELISA que se realizaron en suero de individuos no alérgicos fue de 0.04 y la desviación estándar fue de 0.01, por lo que, considerando el criterio descrito anteriormente, se consideraron como positivos todos los sueros con valores de absorción mayores a 0.07 (Tabla 8.2.2).

Tabla 8.2.2. Valores de A₄₅₀ obtenidos para los sueros de individuos no alérgicos al polen de *Chenopodium album* (Sueros control) y determinación del valor para el criterio de positividad en pacientes alérgicos.

Suero control*	A ₄₅₀
1	0.03
5	0.03
3	0.04
4	0.05
Promedio	0.04
DE	0.01
Promedio + 3DE	0.07

*El número de cada suero control se refiere a la identificación empleada en el banco de sueros de individuos no alérgicos.

Con base al criterio de positividad descrito y el análisis de los resultados de los ensayos de ELISA nos mostraron que, en el banco de sueros analizados, un 38.66% de pacientes alérgicos (104) presentan IgE específicas para antígenos alérgicos del polen de *Chenopodium album* (Figura 8.2.1). Estos resultados contrastan con reportes previos en los que se ha observado una prevalencia de pacientes alérgicos al polen de esta planta en 12.9% en la Ciudad de Guadalajara (Alcalá-Padilla et al., 2016) y de 0.5% para el sur de la Ciudad de México (Gaspar-López et al., 2014).

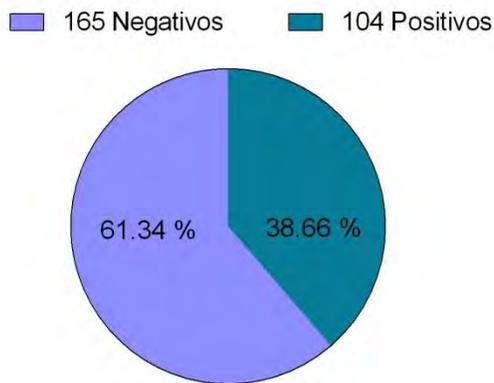


Figura 8.2.1 Proporción de sueros de pacientes alérgicos con IgE específicas para antígenos alérgicos del polen de *Chenopodium album* determinados a través de ensayos de ELISA.

La discrepancia entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y los reportados previamente para poblaciones de ciudades mexicanas podría explicarse, en principio, por la diferencia en el tipo de ensayos empleados en cada trabajo (pruebas cutáneas en los reportes previos y ensayos de ELISA en nuestro trabajo). Es importante destacar que, como se abordó anteriormente, la fuente de polen, el extracto empleado y su manejo impactan directamente en los resultados de las pruebas cutáneas. Adicionalmente, está ya ampliamente documentado que no existe una correlación clara entre los niveles de IgE específica en suero para una fuente alérgica y los resultados en la pruebas cutáneas o en la sintomatología clínica del paciente, no obstante, el carecer de extractos para las pruebas cutáneas que tengan una representatividad adecuada de cada antígeno alérgico, incluye una variable que es imposible de valorar a la fecha. Lo que sí es claro es que la presencia de IgE específicas para un antígeno alérgico es una condición para que se presenten reacciones alérgicas frente a una determinada fuente alérgica, por lo que los pacientes identificados en este estudio, potencialmente pueden llegar a presentar síntomas clínicos al exponerse a partículas de polen de *Chenopodium album*. Adicional a lo anterior, es para destacarse que los niveles relativos de IgE específica en cada suero, juzgados a partir de los valores de A_{450} , es muy variable, encontrando estos entre 3.731 a 0.09 unidades de absorbancia (Figura 8.2.2), con un promedio de 0.445, siendo a la fecha otra variable poco explorada a nivel clínico.

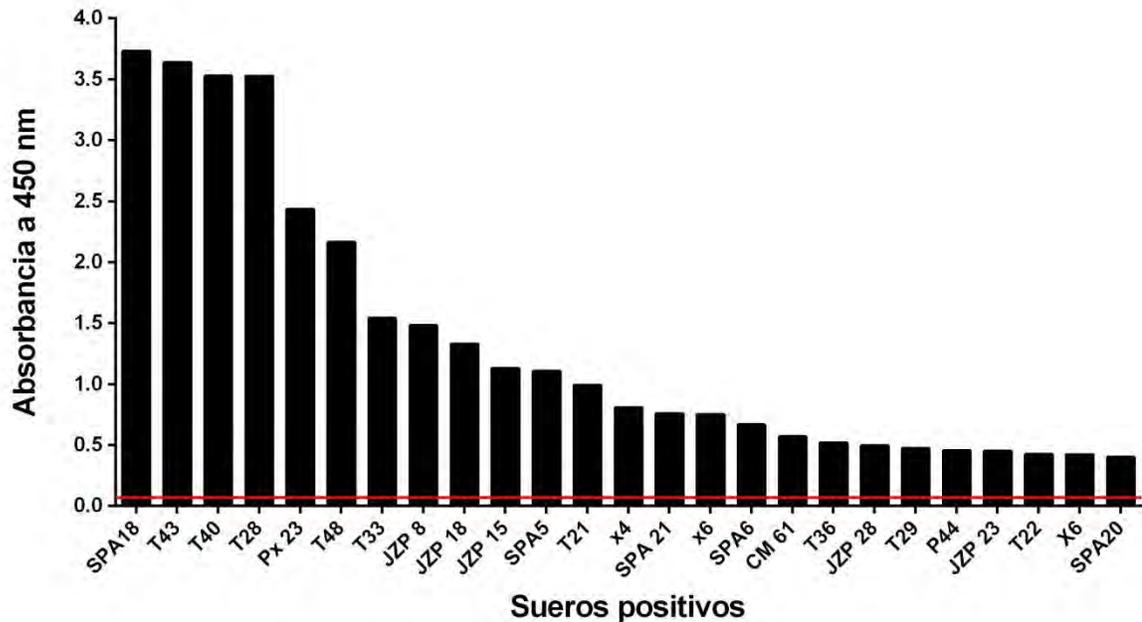


Figura 8.2.2 Selección de resultados de ensayos de ELISA en donde se destaca la variabilidad en la A_{450} observada para distintos sueros con IgE específicas para el polen de *Chenopodium album*. La línea roja muestra el valor del criterio de positividad.

Los sueros de pacientes que cumplieran con el criterio de positividad (preferentemente altos valores de IgE específicas, Figura 8.2.2) y tuvieran un número de alícuotas suficientes para varias determinaciones fueron seleccionados para los ensayos de posteriores de reconocimiento de proteínas alergénicas por parte de IgE de pacientes, utilizando dichos sueros de manera individual o como mezcla de estos (6-8 sueros).

8.3 Perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto alergénico del polen de *Chenopodium album*.

El perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto del polen de *Chenopodium album* fue analizado a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los resultados nos muestran que el extracto contiene proteínas de masas moleculares aproximadas de entre 17 y 130 kDa (Figura 8.3.1). Las proteínas con mayor abundancia fueron las que se

encuentran en el rango de masas moleculares de 55 a 100 kDa, siendo una fracción de 65 kDa aproximadamente la que se observa más enriquecida en el extracto. Estos resultados concuerdan con los reportados recientemente para un extracto alérgico del mismo polen (Nouri et al., 2012) observándose un patrón de proteínas y abundancias similares a lo obtenido en nuestros experimentos.

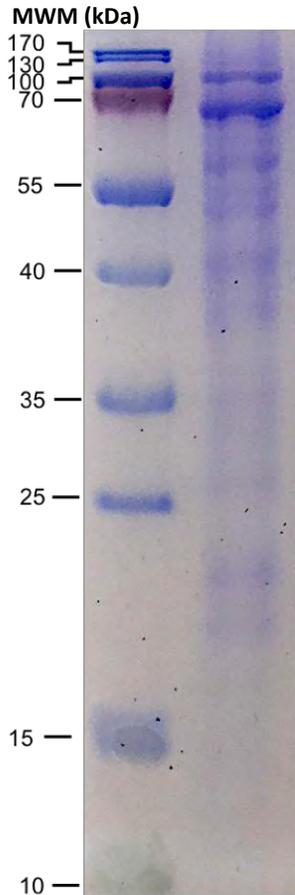


Figura 8.3.1. Perfil electroforético del extracto alérgico del polen de *Chenopodium album*. 30 μg de extracto del polen fueron separados en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se tiñeron con Azul de Coomassie brillante. En la primera línea se muestra el patrón de corrimiento de los marcadores de masa molecular (MWM) indicando del lado izquierdo su respectiva masa en kDa.

Sin embargo, en otro reporte también reciente, en donde se analizó el perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto alérgico del polen de *Chenopodium album*, el perfil electroforético del extracto empleado es significativamente diferente al observado en nuestros resultados observándose que las proteínas más abundantes en ese extracto estuvieron en el rango de 50 a 63 kDa (El-aziz et al., 2016). Estas inconsistencias pueden ser explicadas a partir de las diferencias en las metodologías empleadas en la obtención de las

proteínas a partir de los granos de polen, en nuestro caso la metodología empleada por el proveedor del extracto alergénico es similar a la reportada por Nouri y colaboradores (2012) y el método de extracción reportado por El-Aziz y colaboradores (2016), en donde se eliminan con solventes orgánicos todo el material pigmentado del polen, pudiendo haber arrastrado diversas proteínas en el proceso.

Es importante destacar que al realizar un *immunoblot* empleando un anticuerpo que reconoce específicamente a profilinas de plantas (reportadas como alergénicas en diversos pólenes y alimentos), observamos la presencia de un reconocimiento claro para una proteína de alrededor de 14 kDa, que corresponde con la masa esperada para esta proteína, pero en el perfil electroforético no se aprecia con claridad una proteína con esta masa (Figura 8.3.2).

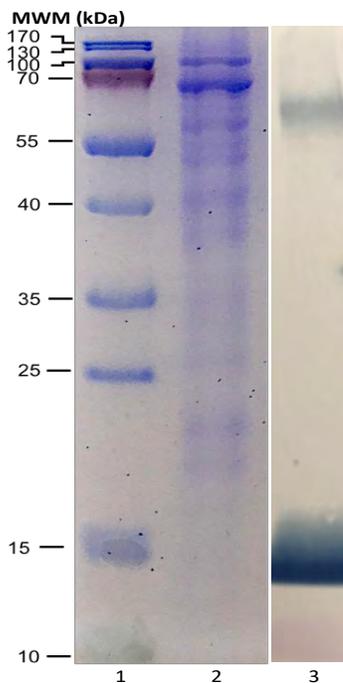


Figura 8.3.2. Perfil electroforético en un gel de poliacrilamida de gradiente (16%) del extracto alergénico del polen de *Chenopodium album*, e inmunodetección de profilina. En el primer carril (1) se muestra el corrimiento electroforético de los marcadores de masa molecular, en el carril 2 el perfil de las proteínas totales del extracto y en el carril 3 se muestra la inmunodetección de la profilina a través de un anticuerpo específico contra profilinas de plantas.

Estos resultados nos permiten afirmar que la sensibilidad de la tinción empleada en este estudio es significativamente menor a la obtenida en la

identificación a través de anticuerpos, es decir, podemos no observar en un perfil electroforético una fracción proteica al teñirla con azul de Coomassie o algún colorante similar, pero la cantidad de antígeno presente podría ser evidenciada por técnicas más sensibles como la detección con anticuerpos. Es por lo anterior que emplear un perfil electroforético para evaluar la calidad de un extracto alérgico o de un procedimiento de extracción de alérgenos, en donde podríamos obtener antígenos no detectables, no es una herramienta adecuada para la estandarización de los extractos que se emplearán en la clínica.

8.4 Identificación de las fracciones alérgicas reconocidas con mayor frecuencia en el suero de diferentes pacientes alérgicos.

Para determinar que fracciones proteicas del extracto total alérgico del polen de *Chenopodium album* se reconocen con mayor frecuencia por las IgE de pacientes alérgicos a este polen, se analizaron a través de *Western blot* los sueros de diferentes pacientes en las condiciones descritas en la sección de metodología para esta técnica. La figura 8.4.1 muestra los resultados obtenidos en la inmunodetección.

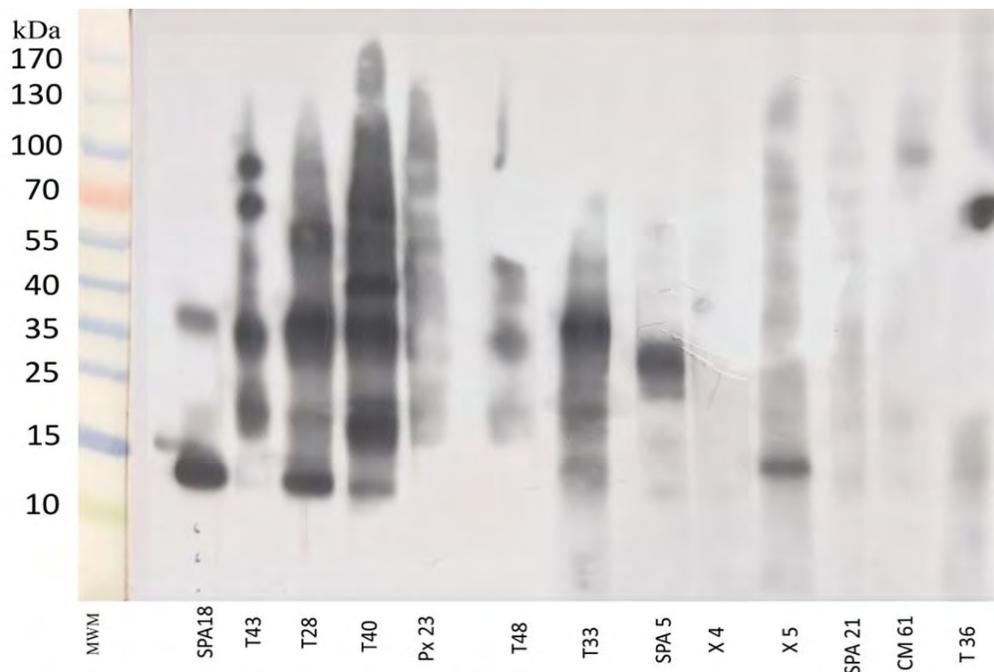


Figura 8.4.1 Inmunodetección por IgE del suero de pacientes alérgicos de proteínas del extracto alergénico del polen de *Chenopodium album*. Las proteínas del extracto separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron tiras individuales con el suero de pacientes alérgicos (selección de sueros con altos valores de A450, sección 8.2). La presencia de los inmunocomplejos se evidenció a través de quimioluminiscencia.

Los patrones de reconocimiento de antígenos alergénicos se muestran en cada carril (identificados con la clave interna para cada suero de paciente). MWM: marcadores de masa molecular, sus valores se muestran en el costado izquierdo en kilodaltons.

Los resultados nos muestran que los antígenos reconocidos por cada paciente varían significativamente, en un rango de 11 a 160 kDa aproximadamente, pero existen fracciones que son reconocidas con mayor frecuencia en el conjunto de estos pacientes. Alrededor del 45% de los sueros analizados reconocen una fracción de entre 13 y 14 kDa, el 70% reconoció a una banda de 17 kDa, 40% reconocen una banda de 37 kDa aproximadamente y el 40% una banda de 55 kDa. Adicionalmente, el análisis de *Western blot* de los sueros de pacientes alérgicos mostró que las bandas que se reconocen con mayor intensidad son las de 14, 17 y 37 kDa, sugiriendo que podrían ser las más alergénicas, ya que una fracción importante de las IgE que se producen contra

antígenos alérgicos con en reconocimiento a estas proteínas. Estos resultados concuerdan parcialmente con reportes previos en los que se evaluó la alergenicidad de tres proteínas del polen de *Chenopodium album*, de 13, 17 y una de 10 kDa en población iraní (Nouri et al., 2012) y de 50, 56, 63 y 67 kDa en población egipcia (El-aziz et al., 2016). Adicionalmente, bandas de aproximadamente 21, 25, 40, 60, 70, 75 y 87 kDa fueron reconocidas con menos frecuencia pero con una intensidad significativa, indicando que podrían ser clínicamente relevantes.

8.5 Aislamiento de Antígenos reconocidos por IgE de pacientes alérgicos.

8.5.1 Aislamiento inicial: Cromatografía de Exclusión Molecular.

El extracto del polen de *Chenopodium album* utilizado corresponde a una solución estéril e inyectable que se utiliza tanto en el diagnóstico de rinitis alérgica o asma alérgica a un tipo de polen específico, como en su tratamiento. La composición total del extracto se obtiene a partir de una suspensión de polen en amortiguador de fosfatos (1:40). El extracto se estabiliza con 50% de glicerol y se conserva con fenol 0.02%. Para el aislamiento de las proteínas es necesario retirar estos últimos componentes, junto con algunos pigmentos naturales presentes en la preparación, por lo que optamos por eliminarlos mediante diálisis en membranas con tamaño de poro que permite retener moléculas de 3000 Da o mayores.

En el desarrollo experimental por las características de las muestra a purificar y la disposición de material se utilizó la técnica de diálisis descrita en la sección 7.5.1, empleando un amortiguador de fosfatos salino (PBS) como amortiguador de reemplazo. El fraccionamiento inicial del extracto ya dializado se realizó a través de una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Superdex 75 acoplada a un FPLC. El extracto dializado se aplicó a la columna equilibrada con PBS y se colectaron fracciones de 1 mL c/u y la elución de las proteínas se monitoreo a través de la absorción a 280 nm. Se colectaron un

total de 36 fracciones (correspondientes a 1.5 volúmenes de columna). La figura 8.5.1.1 muestra un cromatograma representativo del fraccionamiento del extracto total obtenido en estas condiciones.

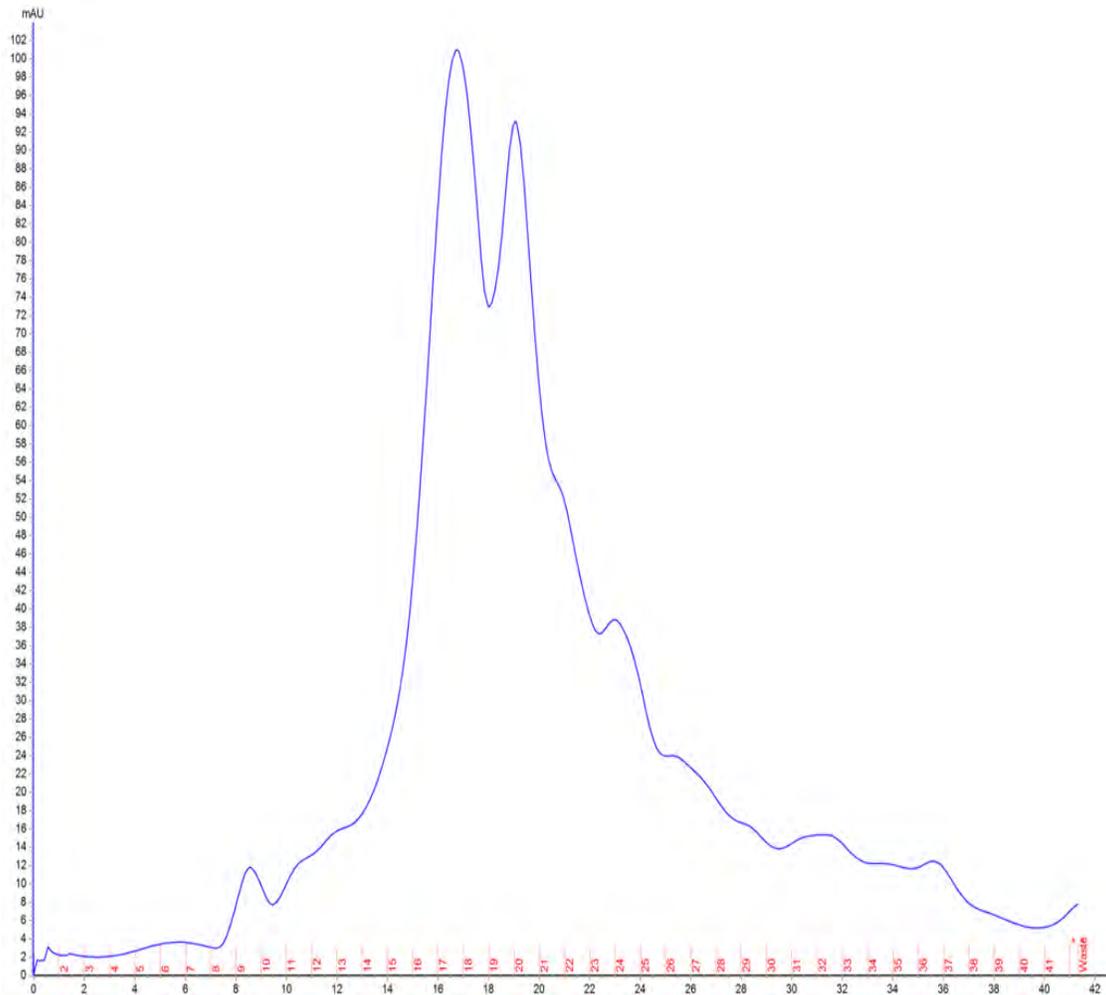


Figura 8.5.1.1. Cromatograma representativo del fraccionamiento del extracto total del polen de *Chenopodium album* en una columna Superdex 75. La línea azul representa los valores de absorción a 280 nm durante la elución de las proteínas. Los números en rojo indican las fracciones colectadas durante la elución de las proteínas en la columna.

Las fracciones conteniendo proteínas de los picos principales observados en el fraccionamiento cromatográfico se analizaron a través de ensayos de ELISA para evaluar la presencia de antígenos que pudieran ser reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos. Los resultados obtenidos nos mostraron que las fracciones que eluyen primero de la columna cromatográfica son las que contienen a la mayoría de los alérgenos del extracto a los que se unen las IgE (Figura 8.5.1.2).

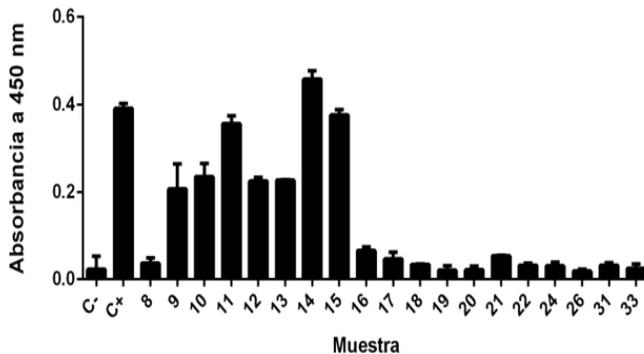


Figura 8.5.1.2 Valores de absorción a 450 nm de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular (Sup 75) a través de un ensayo de ELISA para la determinación de la presencia de proteínas que son reconocidas por IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Chenopodium album*. C-: control negativo, C+: control positivo.

Es importante destacar que las fracciones a las que unieron la mayor^{ml} proporción de IgE presentes en la mezcla de sueros ensayados son las que contienen bajas concentraciones de proteínas, a juzgar por los valores de absorción a 280 nm en el cromatograma. Esto último explica, al menos en parte, el por qué se torna extremadamente difícil estandarizar un extracto alérgico de los que se elaboran actualmente, ya que pequeñas variaciones en el contenido de proteínas totales en un lote particular de un extracto alérgico, podría ser de un impacto relevante en el contenido de algunos alérgenos particulares, que al estar en bajas concentraciones, podrían incluso quedar ausentes en los productos alérgicos finales. A partir de estas observaciones se refuerza la idea de que el poder contar con antígenos alérgicos aislados, para que con estos se realicen las mezclas adecuadas para su uso en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas, eliminaría estas variaciones en el contenido de

alérgenos en estos productos, permitiendo contar con productos para el diagnóstico y el tratamiento que mejoren la sensibilidad de las pruebas y aumente la seguridad y los resultados en los tratamientos.

Para estimar la masa molecular de las proteínas alergénicas presentes en cada fracción, se analizaron estas por *Western blot* para IgE en las mismas condiciones descritas anteriormente. La Figura 8.5.1.3 muestra el patrón de reconocimiento de los principales alérgenos obtenidos para cada fracción de la cromatografía de exclusión molecular (Sup 75).

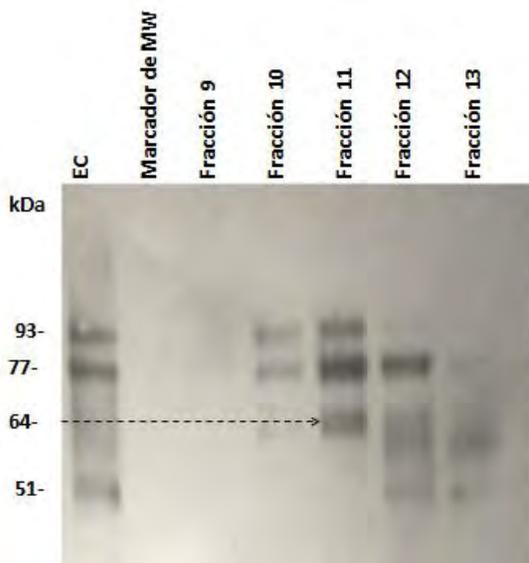
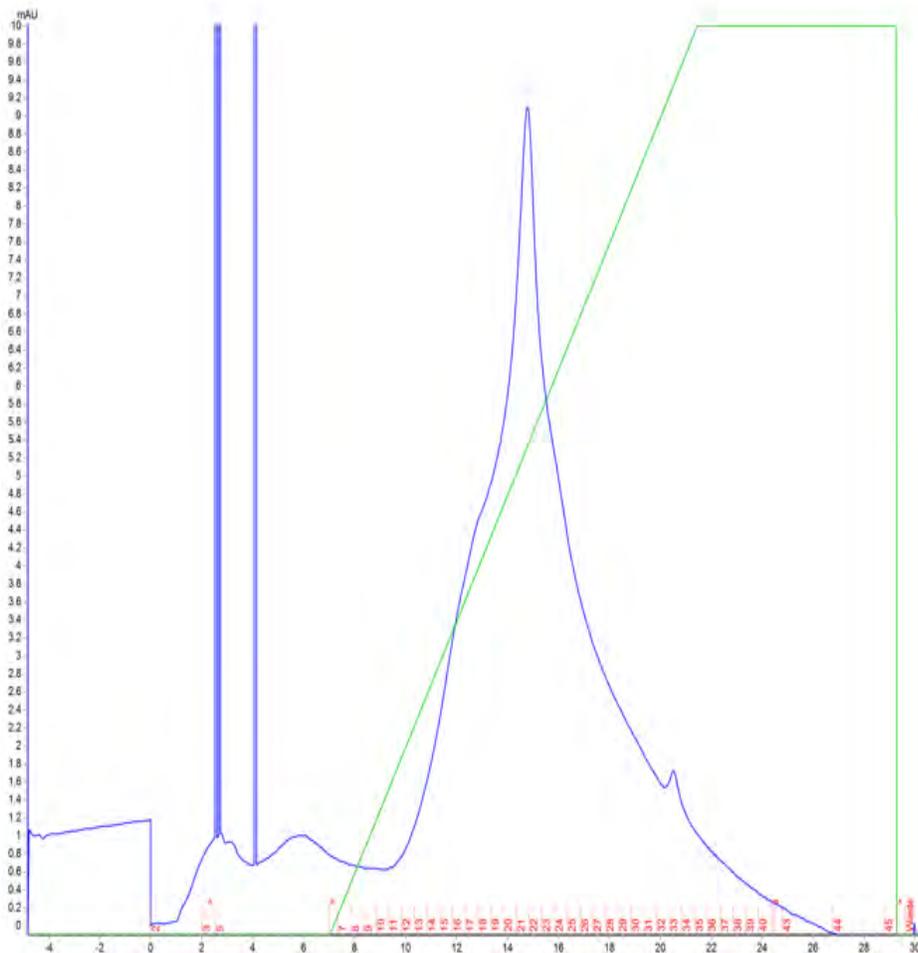


Figura 8.5.1.3. Patrón de reconocimiento de las principales proteínas alergénicas presentes en las diversas fracciones colectadas de la columna de exclusión molecular. Las masas moleculares fueron estimadas a partir del patrón de corrimiento de un marcador de masa molecular utilizando el programa ImageJ (borde izquierdo, incluyendo la fecha).

8.5.2 Purificación por cromatografía de Intercambio Iónico.

Una vez que se identificaron las fracciones de la columna de exclusión molecular que contienen antígenos de interés, se intentó una segunda purificación utilizando una columna de intercambio aniónico. El perfil cromatográfico obtenido nos mostró que a través de esta técnica no es posible aislar las proteínas contenidas en las fracciones analizadas (Figura 8.5.2.1).



Fracción 8.5.2.1. Cromatograma obtenido en una columna de intercambio aniónico. La línea azul muestra la absorción a 280 nm y la línea verde indica el gradiente de NaCl utilizado para la elución de las proteínas. Las líneas rojas indican las fracciones separadas durante la purificación.

A pesar de que durante la elución en la columna de intercambio iónico no se observó una resolución de picos favorables respecto a la purificación por cromatografía de exclusión molecular (100 mUA), se realizó una evaluación para la identificación de antígenos que pudieran ser reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos, observándose un reconocimiento pobre por parte de anticuerpos en todas las fracciones (sección 11. Anexo).

8.5.3 Purificación por cromatografía de fase reversa.

Debido a que a través de la cromatografía de intercambio iónico no fue posible purificar a las proteínas alergénicas presentes en las diferentes fracciones de la columna de exclusión molecular, se procedió a utilizar una columna de fase reversa acoplada a un HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución). La selección de fracciones eluidas se centró en aquellas que mostraron mayor presencia de antígenos con alto reconocimiento por IgE de pacientes alérgicos (fracciones 9 a 16 de la sección 8.5.1). La purificación de las proteínas obtenidas en las fracciones de cromatografía de exclusión molecular se realizó colectando manualmente las fracciones eluidas de la columna de fase reversa (Figuras 8.5.3.1 a 8.5.3.6). Las fracciones colectadas fueron liofilizadas, resuspendidas en PBS y analizadas para su unión a IgE a través de un ensayo de ELISA.

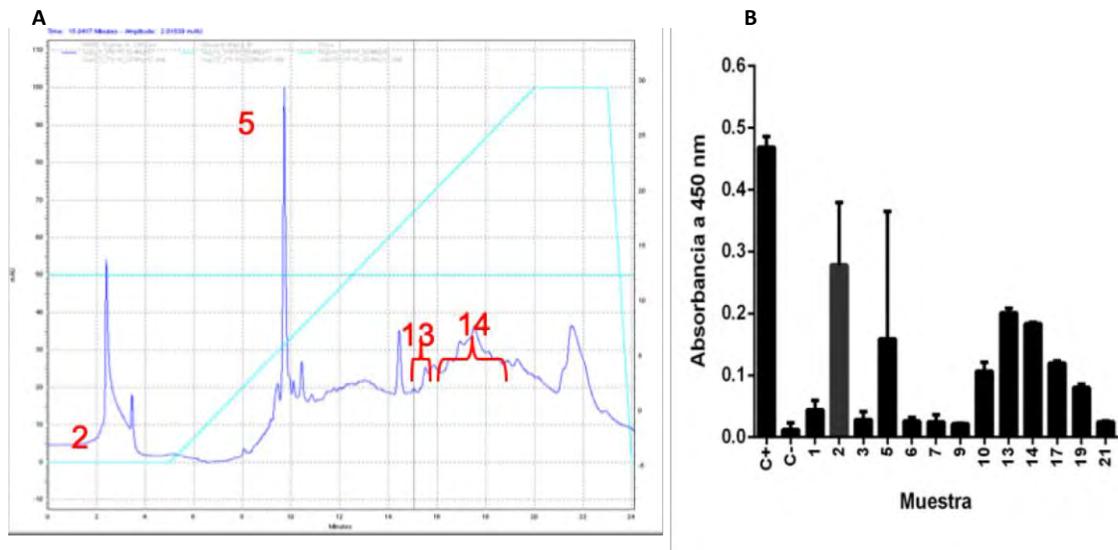


Figura 8.5.3.1. A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de las fracciones 9 y 10 proveniente de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones relevantes con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

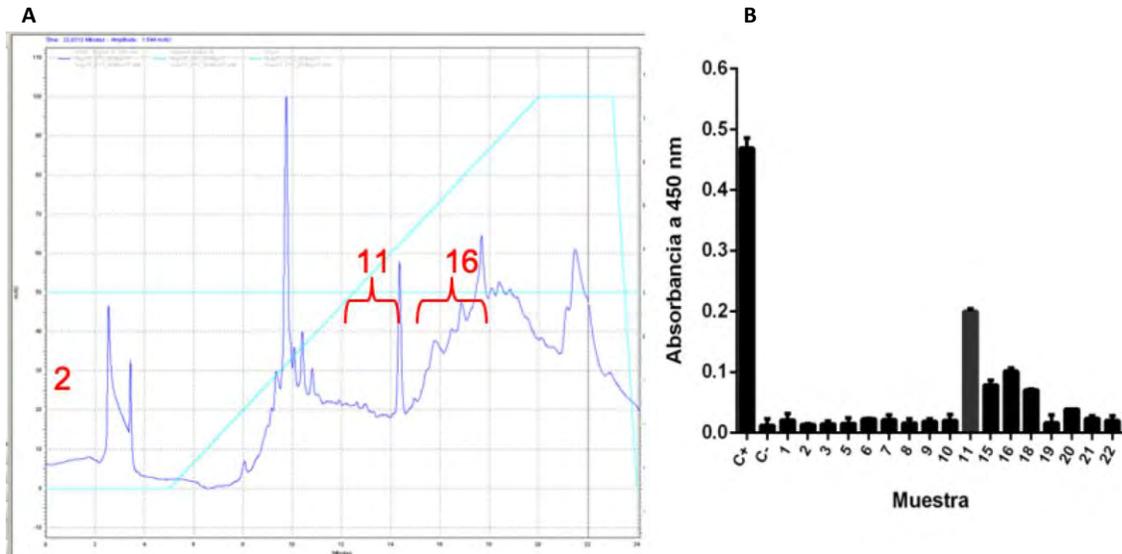


Figura 8.5.3.2 A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de la fracción 11 proveniente de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones relevantes con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

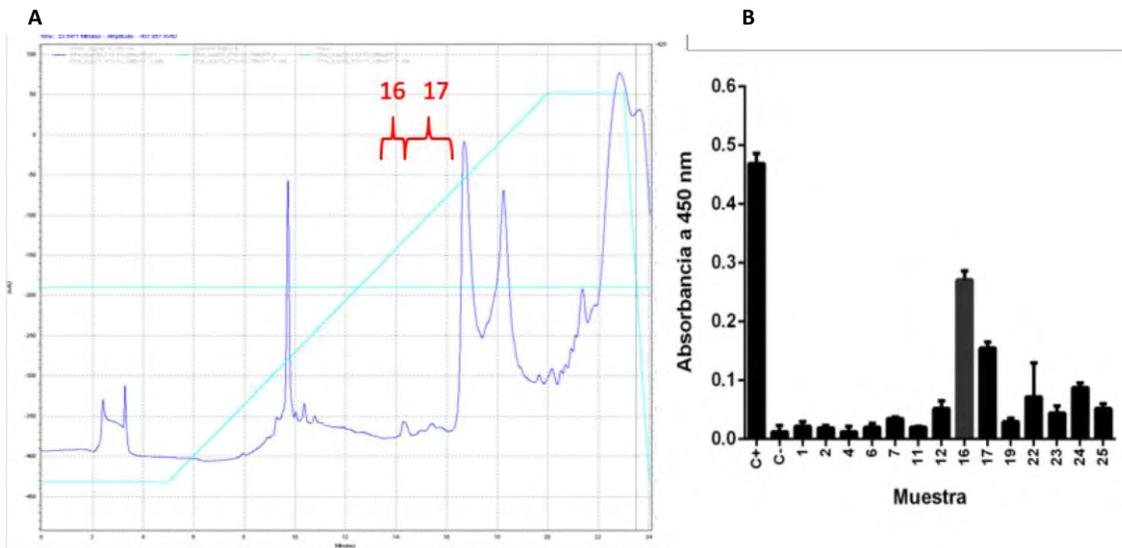


Figura 8.5.3.3. A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de las fracciones 12 y 13 provenientes de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones relevantes con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

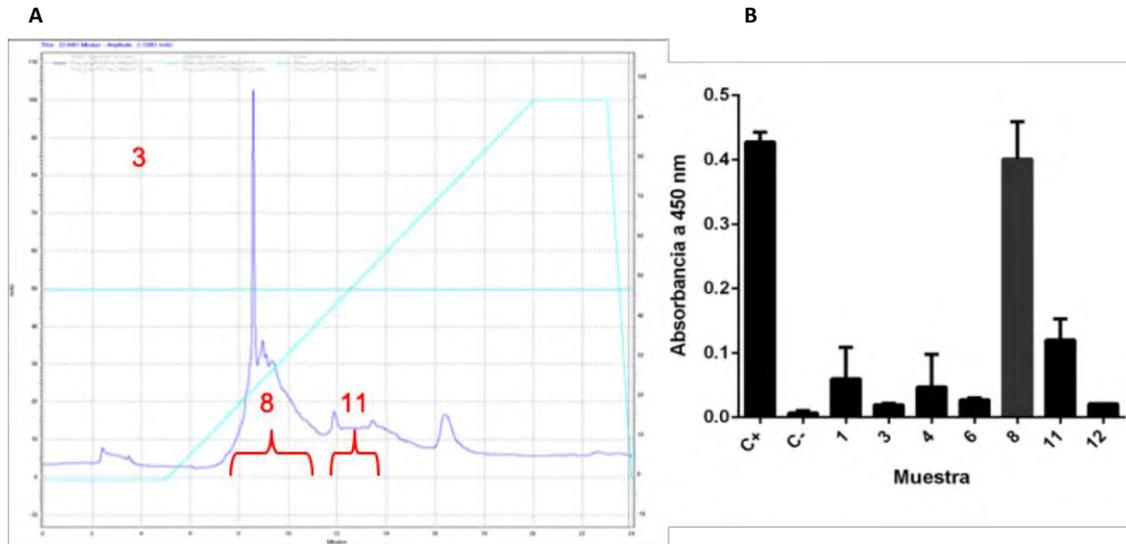


Figura 8.5.3.4. A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de la fracción 14 proveniente de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones relevante con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

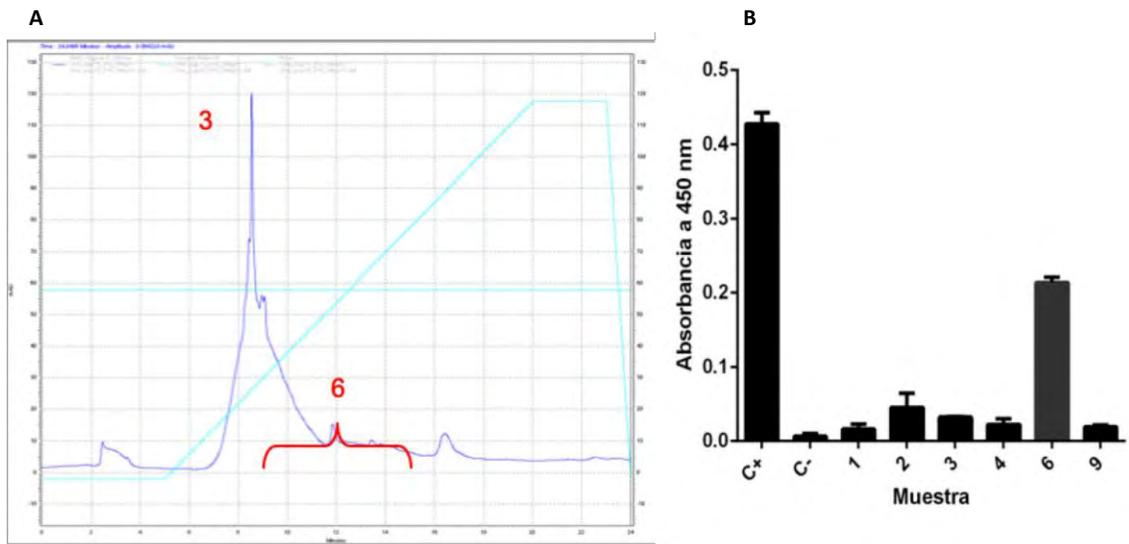


Figura 8.5.3.5. A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de la fracción 15 proveniente de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

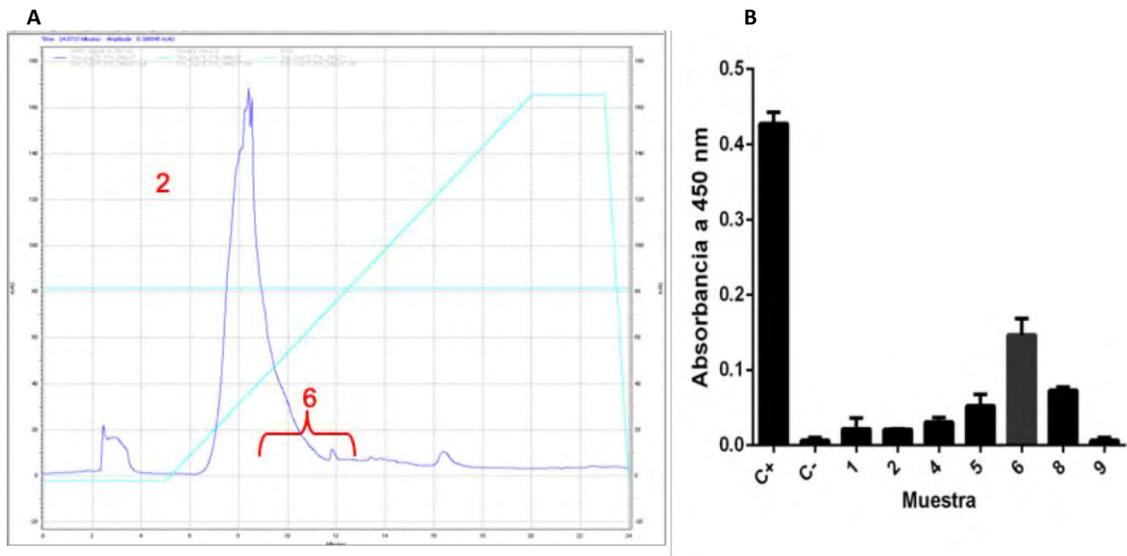


Figura 8.5.3.6. A) Perfil cromatográfico en una columna de fase reversa C18 de la fracción 16 proveniente de la columna de exclusión molecular. Los números indican las fracciones con antígenos reconocidos por IgE del suero de pacientes. B) Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna de fase reversa.

La purificación de los diversos antígenos alergénicos presentes en las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular nos permitió contar con diferentes proteínas puras que son reconocidas por las IgE de pacientes alérgicos al polen de *Chenopodium album*. Las fracciones purificadas con cantidad suficiente de proteína (por lo menos 50 μ g totales) y alto reconocimiento durante los ensayos de ELISA frente a sueros de pacientes alérgicos, se seleccionaron para su identificación por espectrometría de masas.

Cabe destacar que dentro de la evaluación de los cromatogramas, no se identificó ningún patrón de fracciones proteicas de interés por tiempo de elución, la mayoría estas se identifican en baja concentraciones y con la presencia de picos contiguos que pueden estar reflejando la presencia de isoformas.

8.6 Identificación de proteínas alergénicas por espectrometría de masas.

Para la identificación de las proteínas alergénicas seleccionadas a partir de las muestras obtenidas por la cromatografía de fase reversa, las fracciones liofilizadas fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Ciudad de México en donde se obtuvieron los perfiles de fragmentación de los péptidos trípticos para cada fracción (generados por la proteólisis con tripsina de cerdo), los cuales fueron analizados con el Software Protein Pilot™ utilizando la base de datos de UniProt (www.uniprot.org) general al 66% (% similitud de los perfiles obtenidos comparados con los de todas las proteínas de la base) y la base de proteínas de polen al 66%. La Tabla 8.6.1 muestra los resultados de las proteínas identificadas.

Tabla 8.6.1. Resultados de la evaluación de los perfiles de fragmentación.

ID UniProt	Organismo	Proteína	No. De residuos (Masa kDa)	% de cobertura de secuencia
A2WN93	<i>Oryza sativa</i>	Calmodulina 1	149 (16.8)	40
A0A1S3B936	<i>Cucumis melo</i>	Cinasa tipo 4 de un posible receptor de polen	676 (74.6)	8
W6EIU2	<i>Biscutella neustriaca</i>	Proteína paróloga a proteínas de reconocimiento de polen.	189 (21.7)	10
K7LCV6	<i>Glycine max</i>	Receptor S de lectina tipo G con actividad de serina/treonina cinasa	698 (78.7)	3

Una de las proteínas identificadas, con una cobertura significativa de la secuencia de aminoácidos con relación a los péptidos concordantes, corresponde a una secuencia corta (16.8 kDa) de la familia de la calmodulina. Estas proteínas pertenecen a una familia de proteínas que unen calcio y que poseen un dominio EF-hand. Dentro de las proteínas alergénicas que contienen este dominio se encuentra una del pasto inglés (*Phleum pratense*) identificada como Phl p 7 (Chen et al., 2016). Resultados recientes obtenidos en nuestro grupo de investigación muestran que un extracto alergénico comercial estandarizado de polen de

Amaranthus palmeri contiene una proteína alergénica homóloga a la identificada en este trabajo, sugiriendo una posible participación en las reacciones cruzadas entre pacientes alérgicos a cualquiera de estas dos fuentes (aún no publicados).

Otra de las proteínas identificadas podría ser una proteína homóloga a una cinasa tipo 4 de un receptor de polen con masa molecular de aproximadamente 75 kDa, proteína asociada a la regulación de la señalización durante el crecimiento del tubo polínico (Duckney et al., 2017). Recientemente se ha reportado que el alérgeno del árbol de olivo, Ole e1, comparte características estructurales y en secuencia con una proteína homóloga a la identificada aquí (Alche, M'rani-Alaoui, Castro, & Rodriguez-Garcia, 2004). Los resultados de *Western blot* nos muestran una fracción de 75 kDa, con una relativa baja frecuencia de reconocimiento por los pacientes alérgicos (31%), pero con una intensidad significativa, por lo que podría ser de relevancia clínica para los pacientes que reaccionen a este alérgeno.

Adicionalmente, se identificó una proteína homóloga a la proteína Aly327420, las cuales participan en el control de la fertilización de varias plantas, específicamente evitando la auto-fertilización (Leducq et al., 2014). La masa molecular aproximada es de 21.7 kDa, similar a la masa de una fracción proteica identificada en la inmunodetección de aproximadamente 22 kDa con frecuencia de reconocimiento del 35%.

Por último, se identificó una proteína con secuencia de lectina tipo G con actividad de serina/treonina cinasa, que forma parte de un receptor para proteínas de reconocimiento del polen especie-específico (Stein et al., 1996). La masa molecular reportada en la base de datos de esta proteína es de 78.7 kDa, similar a la masa encontrada en el *Western blot* de 76 kDa en nuestras muestras. Si bien no se ha reportado a la fecha que algún miembro de esta familia de proteínas provoque respuestas alérgicas, recientemente se ha sugerido que diversas proteínas esenciales en el proceso de polinización podrían estar involucradas en las respuestas de hipersensibilidad al polen (Solomon, 2002).

8.7 Inhibición de la unión a IgE de pacientes alérgicos al polen de *Amaranthus palmeri*.

La evaluación de la capacidad de inhibir la unión a IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Amaranthus palmeri* por antígenos purificados del polen de *Chenopodium album* fue evaluada a través de ensayos de inhibición por ELISA. Los resultados nos muestran que tres de los antígenos purificados tienen capacidad de inhibir entre 40% y 60% la unión de anticuerpos a proteínas alergénicas del polen del amaranto (Figura 8.7.1). Las proteínas que presentaron una mayor capacidad de inhibición fueron una cinasa tipo 4 de un posible receptor de polen y la proteína paróloga a proteínas de reconocimiento de polen. Estas proteínas, por su función biológica, se espera que sean altamente conservadas entre pólenes de diversas plantas y en el caso de estos pólenes podrían ser las responsables principales de las reacciones de reactividad cruzada observada en los pacientes alérgicos.

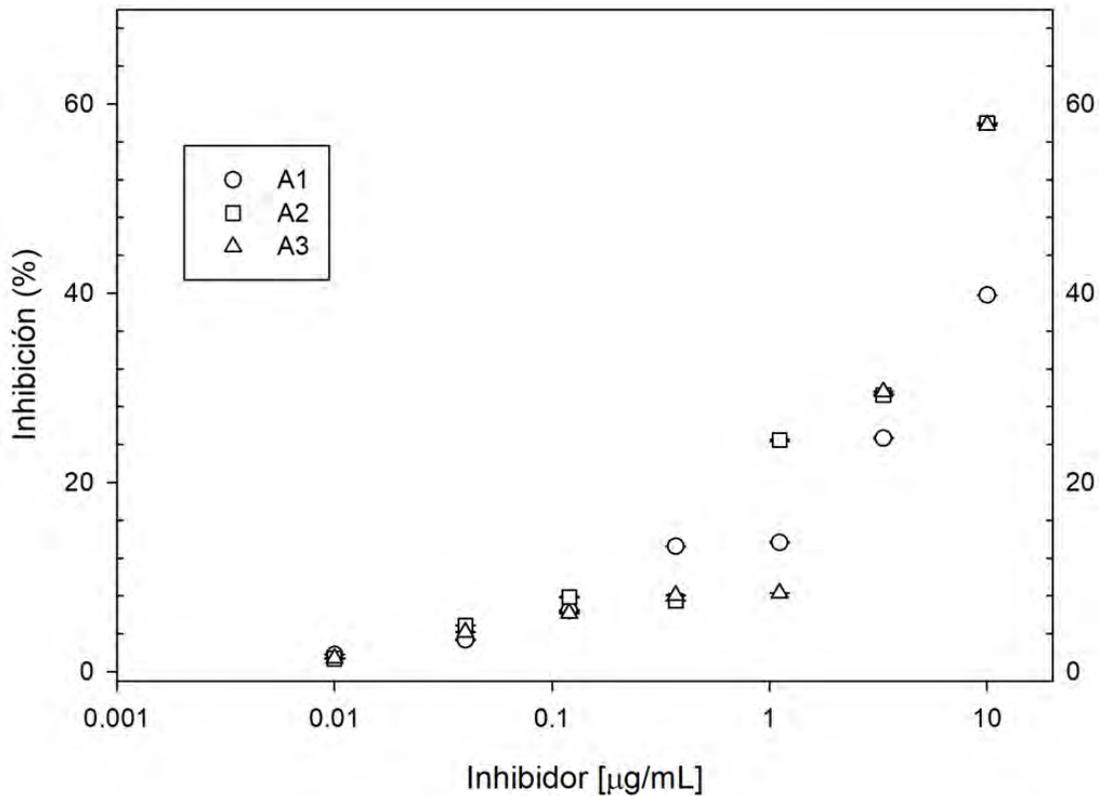


Figura 8.7.1. Patrón de inhibición de unión a IgE de alérgenos purificados de *Chenopodium album*. La capacidad de inhibición de unión a IgE del suero de pacientes alérgicos a alérgenos del polen de *Amaranthus palmeri* de la calmodulina 1 (A1 en círculos), la cinasa tipo 4 de un posible receptor de polen (A2 en cuadros) y la proteína paróloga a proteínas de reconocimiento de polen (A3 en triángulos) se determinaron a través de ensayos de inhibición por ELISA.

Para el caso de la calmodulina 1, la inhibición máxima de unión a IgE fue de cerca del 40% hasta las concentraciones ensayadas. Interesantemente, una proteína homóloga ha sido identificada en el extracto alérgico del polen de *Amaranthus palmeri*, como se mencionó anteriormente. En los pólenes de diversas plantas esta proteína se encuentra ampliamente conservada, por lo que dependiendo de la abundancia relativa en cada uno, podría ser clínica relevante ya que estaría participando en reacciones cruzadas entre diversas fuentes de polen.

En conjunto, estos tres alérgenos podrían ser los responsables de las reacciones cruzadas observadas entre pacientes alérgicos a cualquiera de los dos pólenes, adicionales a la profilina que no fue aislada en este estudio (Wurtzen, Nelson, Lowenstein, & Ipsen, 1995).

9. Conclusiones

Se identificaron 4 proteínas alergénicas del polen de *Chenopodium album*, tres de ellas no se han asociado anteriormente a reacciones alérgicas en pacientes sensibles a este polen.

Tres fracciones presentan una alta capacidad de inhibir la unión de las IgE a alérgenos del polen de *Amaranthus palmeri*.

Las proteínas que pudieron ser aisladas son todas diferentes a las previamente reportadas como alergénicas, por lo que la estrategia metodológica empleada nos permitió identificar nuevos alérgenos del polen de *Chenopodium album* que podrían ser clínicamente relevantes, especialmente para la población mexicana.

10. Perspectiva del trabajo a futuro.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos permitieron identificar nuevos alérgenos del polen de *Chenopodium album* con alta capacidad de inhibir la unión a IgE de pacientes alérgicos al polen de *Amaranthus palmeri* en ensayos in vitro, por lo que será necesario evaluar la importancia clínica de estos alérgenos en pacientes y sus posibles implicaciones prácticas en las pruebas diagnósticas y en la terapia de desensibilización.

11. Anexo

Se evaluó la resolución de picos en la columna de intercambio iónico como paso de purificación de antígenos consecutivo a la cromatografía de exclusión molecular con la respectiva evaluación de las fracciones obtenidas para la identificación de antígenos reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos por ensayo de ELISA (Figura 11.1), se observa pérdida de la actividad antigénica durante el proceso.

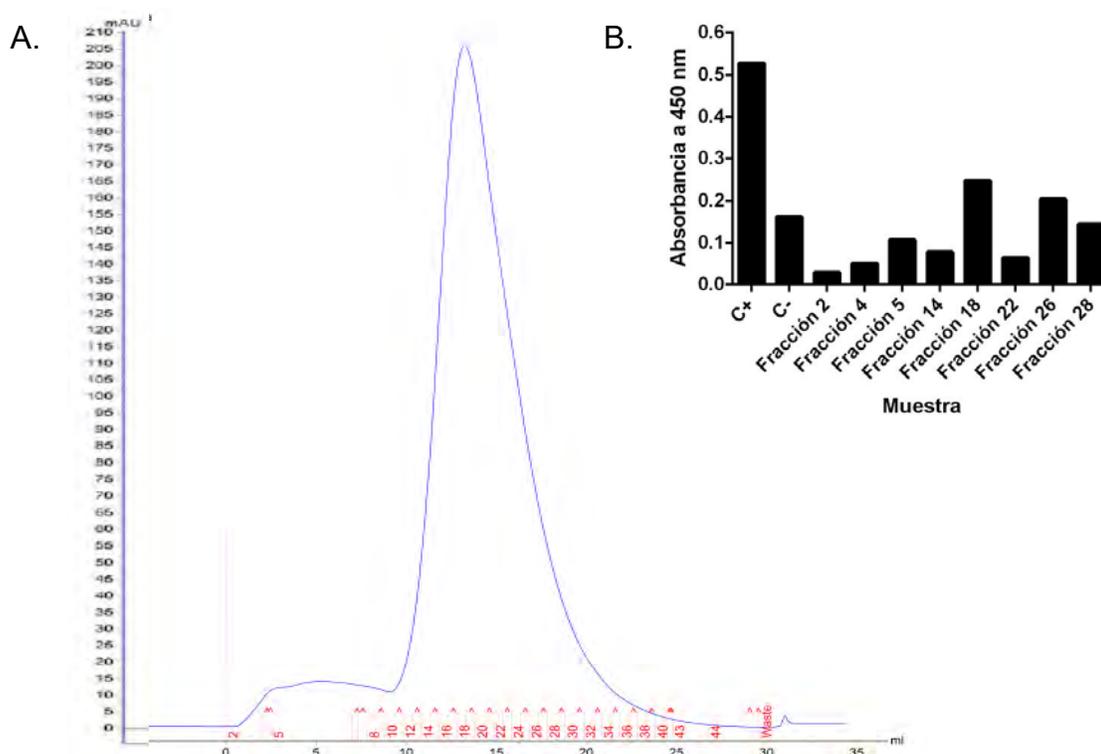


Figura 11.1- A. Cromatograma de las fracciones 16-19 de Superdex 75 en la columna de intercambio iónico CptoQ. La línea azul representa los valores de absorción a 280 nm durante la elución de las proteínas. Los números en rojo indican las fracciones colectadas durante la elución de las proteínas en la columna. B. Valores de absorción a 450 nm del análisis de ELISA de las diferentes fracciones colectadas de la columna CptoQ. C-: control negativo, C+: control positivo.

12. Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (2002). *Inmunología Celular y Molecular* (4th ed.). McGraw Hill.
- Alcalá-Padilla, G., Bedolla-Barajas, M., & Kestler-Gramajo, Amanda Valdez-López, F. (2016). Prevalencia de sensibilización a alérgenos en niños escolares con asma que viven en la zona metropolitana de Guadalajara. *Revista Alergia Mexico*, 63(2), 135–142.
- Alche, J. D., M'rani-Alaoui, M., Castro, A. J., & Rodríguez-García, M. I. (2004). Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol*, 45(8), 1149–1157.
- Anero Bartolomé, M. T., & et al. (2008). 3- El Grano De Polen: Morfología, Estructura Y Diversidad. In *Aerobiología y polinosis en Castilla y León*.
- Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens - An update from a molecular perspective. *Allergy*, 70(10), 1201–1211. <https://doi.org/10.1111/all.12696>
- Bañuelos Arias, A. del C., Montaña Velázquez, B. B., Campillo Navarrete, M. R., Mojica Martínez, M. D., Ayala Balboa, J. C., Silva Vera, R. I., ... Jáuregui Renaud, K. (2003). Pruebas cutáneas , IgE sérica específica e IgE total en el diagnóstico de pacientes con rinitis alérgica perenne. *Revista Alergia Mexico*, 50(4), 147–153.
- Barderas, R., Villalba, M., Y, P. C., Batanero, E., & Rodríguez, R. (2004). Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(6), 1192–1198.
- Becerril Ángeles, M., Vázquez Merino, C. L., Ángeles Garay, U., Alvarado Moctezuma, L. E., & Vilchis Guízar, E. (2008). Prevalencia de enfermedades alérgicas en adultos mayores. *Revista Alergia Mexico*, 55(3), 85–91.
- Berger, A. (2000). Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they? *Bmj*, 321, 424–424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>

- Berlot, G., Rossini, P., & Turchet, F. (2015). Biology of immunoglobulins. *Translational Medicine @ UniSa*, 11(4), 24–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25674545><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4309651>
- Bio-Rad. (n.d.). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. [https://doi.org/Bulletin 6040 Rev B US/EG 13-0891 0513](https://doi.org/Bulletin%206040%20Rev%20B%20US/EG%2013-0891%200513)
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N. G., Bousquet, P. J., Burney, P. G., ... Demoly, P. (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 67(1), 18–24. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x>
- Brito Galeana, F., Yamazaki, M. A., Espinosa Padilla, S., Vázquez Tsuji, Ó., Huerta López, J., & Berrón Pérez, R. (2003). Eosinófilos: Revisión de la literatura. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 12(2), 56–62. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2003/al032d.pdf>
- Celio Murillo, R., Abou Khair, F., Rodríguez Santos, O., Cuevas Castillejos, Héctor Ulises Laurrabaquio Miranda, A. M., Tinoco Morán, I. O., Cruz Suárez, M. Á., & Cruz Marmolejo, M. Á. (2014). Sensibilización a pólenes y asociación con la Clínica de Rinitis Alérgica y Asma Bronquial en niños de la provincia de Camagüey. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 23(1), 15–19.
- Chakraborty, P., Gupta-Bhattacharya, S., Roy, I., & Chanda, S. (2004). Identification of shared allergenic components from four common and dominant pollen taxa of Arecaceae. *Current Science*, 86(11), 1539–1543.
- Chávez Rojo, J. (2017). Tema 6. Purificación de proteínas Bioquímica.
- Chen, M., Xu, J., Devis, D., Shi, J., Ren, K., Searle, I., & Zhang, D. (2016). Origin and Functional Prediction of Pollen Allergens in Plants. *Plant Physiology*, 172(1), 341–357. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00625>
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Delbourg, M. F., Guilloux, L., Moneret-Vautrin, D. A., & Ville, G. (1996). Hypersensitivity to banana in latex-allergic patients. Identification of two major banana allergens of 33 and 37 kD. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 76(4), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60032-4](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60032-4)
- Duckney, P., Deeks, M. J., Dixon, M. R., Kroon, J., Hawkins, T. J., & Hussey, P. J. (2017). Actin–membrane interactions mediated by NETWORKED2 in

- Arabidopsis pollen tubes through associations with Pollen Receptor-Like Kinase 4 and 5. *New Phytologist*, 216(4), 1170–1180. <https://doi.org/10.1111/nph.14745>
- El-aziz, A. A., Shaaban, M., Atwa, A., & El-maksuod, A. A. (2016). Evaluation of *Chenopodium album* allergenicity in atopic asthmatics. *Current Trends in Immunology*, 17, 55–63.
- Espinosa García, F. J., & Sarukhán, J. (1997). *Manual de Malezas del Valle de México* (1st ed.). México: Instituto de Ecología-UNAM-FCE.
- Esquivel Soto, E. E., & Leal Guadarrama, L. I. (2004). *Métodos Físicoquímicos en Biotecnología*.
- García-Arellano, H., & Vázquez-Duhalt, R. (1998). Cuantificación De Proteínas: Una Revisión. *BioTecnología*.
- Gaspar-López, A., López-Rocha, E., Rodríguez-Mireles, K., Segura-Méndez, N., & Del Rivero-Hernández, L. (2014). Prevalencia de polinosis en pacientes con asma, rinitis y conjuntivitis alérgicas en la zona sur del Distrito Federal, 2007-2013. *Revista Alergia Mexico*, 61(3), 147–152.
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 391–403. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1996-x>
- Global Initiative For Asthma. (2016). Guía de Bolsillo Para El Manejo Y Prevención del Asma.
- Groeme, R., Airouche, S., Kopečný, D., Jaekel, J., Savko, M., Berjont, N., ... Moingeon, P. (2016). Structural and functional characterization of the major allergen amb a 11 from short ragweed pollen. *Journal of Biological Chemistry*, 291(25), 13076–13087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702001>
- Guidos F, G. A., & Almeida A, V. M. (2005). Polinosis y aeroalergenos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 14(2), 52–55. Retrieved from <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=4376>
- Hamid, Q. A., Schotman, E., Jacobson, M. R., Walker, S. M., & Durham, S. R. (1997). Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(2), 254–260. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70106-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70106-4)

- Hasnain, S. M., Alsini, H., Al-frayh, A., Gad-el-rab, M. O., & Alaiya, A. A. (2016). Amaranthus Pollen Allergens: Protein Diversity and Impact on Allergy Diagnosis. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, 4(1), 2320–4087.
- Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K.-C., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., ... Lockey, R. (2013). The skin prick test – European standards. *Clinical and Translational Allergy*, 3(3), 10. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-3-3>
- Hernández Chávez, L. A., Hernández Colín, D. D., & Martínez-Cairo Cueto, S. (1999). Alergenos frecuentes del Valle de México en niños. *Revista Alergia Mexico*, XLVI(1), 23–25.
- INER. (2015). INFORME ANUAL DE AUTOEVALUACIÓN DEL DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS.
- Jacobsen, L., Wahn, U., & Bilo, M. B. (2012). Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: The effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit - the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy*, 2(8), 11. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-2-8>
- Janeway, Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th ed.). New York: Garland Science.
- Jeong, K. Y., Hong, C. S., Lee, J. S., & Park, J. W. (2011). Optimization of allergen standardization. *Yonsei Medical Journal*, 52(3), 393–400. <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.393>
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczy, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2003). IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 33(5), 1205–1214. <https://doi.org/10.1002/eji.200322919>
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología Kuby* (6th ed.). México: McGraw Hill.
- Kruger, N. J. (n.d.). The Bradford method for protein quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (2nd ed.). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:25>
- Kuntze O. et al. (n.d.). Cucumis sativus Linn. *Indian Medicinal Plants*, 91. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70638-2_424

- Landa-Pineda, C. M., Arroyo-Becerra, A., Rosas-Alvarado, A., Terán, L. M., Garcia-Cruz, M. L., Marchat, L. A., & Reyes-López, C. A. (2016). Major allergen from *Amaranthus palmeri* pollen is a profilin: Isolation, partial characterisation and IgE recognition. *Allergologia et Immunopathologia*, *44*(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.002>
- Landa-Pineda, C. M., Guidos-Fogelbach, G., Marchat-Marchau, L., Lopez-Hidalgo, M., Arroyo-Becerra, A., & Sandino Reyes-Lopez, C. A. (2013). Profilinas: alérgenos con relevancia clínica. *Rev Alerg Mex*, *60*(3), 129–143.
- Larenas-Linnemann, D., Mayorga-Butrón, J. L., Sánchez-González, A., Ramírez-García, A., Medina-Ávalos, M., Figueroa-Morales, M. A., ... Solís-Galicia, C. (2014). ARIA México 2014 Adaptación de la Guía de Práctica Clínica ARIA 2010 para México. Metodología ADAPTE. *Revista Alergia México*, *61*(1), 3–116. Retrieved from <http://revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/52/69>
- Larenas-Linnemann, D., Salas-Hernández, J., Vázquez-García, J. C., Ortiz-Aldana, F. I., Fernández-Vega, M., Del Río-Navarro, B. E., ... Castro-Martínez, R. (2017). Mexican Asthma Guidelines: GUIMA 2017 Guía Mexicana del Asma: GUIMA 2017. *Revista Alergia México*, *64*(1), 11–128. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i0.272>
- Larenas Linnemann, D., Arias Cruz, A., Guidos Fogelbach, G. A., & Cid del Prado, M. Lou. (2009). Alérgenos usados en las pruebas cutáneas en México. *Revista Alérgia México*, *56*(2), 41–47.
- Leducq, J.-B., Gosset, C. C., Gries, R., Calin, K., Schmitt, É., Castric, V., & Vekemans, X. (2014). Self-Incompatibility in Brassicaceae: Identification and Characterization of SRK -Like Sequences Linked to the S -Locus in the Tribe Biscutelleae. *G3 (Bethesda)*, *4*(6), 983–992. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010843>
- Levinson, R. (2001). 5. Chromatography. In *Modern Chemical Techniques* (pp. 116–159). THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY-Unilever.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Martínez Sánchez, M. E. (2011). Dinámica de la diferenciación de Células Th: modelación con redes Booleanas.

- Mera Ovando, L. M. (n.d.). *Amaranta y los quelites* (1st ed.). México: Instituto de Biología-UNAM-CONABIO.
- Mousavi, F., Majd, A., Shahali, Y., Ghahremaninejad, F., Shokouhi Shoormasti, R., & Pourpak, Z. (2017). Immunoproteomics of tree of heaven (*Ailanthus altissima*) pollen allergens. *Journal of Proteomics*, *154*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.013>
- NCBI. (n.d.-a). Pollen allergen Che a 1. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q8LGR0>
- NCBI. (n.d.-b). Profilin Minor pollen allergen Che a 2. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q84V37>
- Nieto García, A., Ramos, M., Pamies Espinosa, R., Caballero Gómez, L., Oliver Jiménez, F., & Colomer Hernández, N. (2004). Implicación clínica de la reactividad cruzada entre alérgenos Clinical importance of cross-reactivity between allergens. *Allergologia et Immunopathologia*, *32*(3), 124–129.
- Nouri, H. R., Sankian, M., Vahedi, F., Afsharzadeh, D., Rouzbeh, L., Moghadam, M., & Varasteh, A. (2012). Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis. *Molecular Biology Reports*, *39*(3), 3169–3178. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1083-9>
- Offermann, L. R., Schlachter, C. R., Perdue, M. L., Majorek, K. A., He, J. Z., Booth, W. T., ... Chruszcz, M. (2016). Structural, functional, and immunological characterization of profilin panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(30), 15447–15459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733659>
- Okubo, K., Kurono, Y., Ichimura, K., Enomoto, T., Okamoto, Y., Kawauchi, H., ... Masuyama, K. (2017). Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. *Allergology International*, *66*(2), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.11.001>
- OMS/SIGN. (2010). Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos.
- OMS. (n.d.). Enfermedades respiratorias crónicas Asma. Retrieved from <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/>
- OMS. (2017). Asma. <https://doi.org/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs344/es/>

- Pajno, G. B. (2007). Sublingual immunotherapy: The optimism and the issues. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 796–801. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.009>
- Rajan, T. V. (2003). The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation. *Trends in Immunology*, 24(7), 376–379. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00142-X)
- Roitt, I. M. (1993). *Inmunología* (3rd ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Rodríguez, D., Dávila, I., Sánchez, E., Barber, D., Lorente, F., & Sánchez, J. (2011). Relationship Between Airborne Pollen Counts and the Results Obtained Using 2 Diagnostic Methods: Allergen-Specific Immunoglobulin E Concentrations and Skin Prick Tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 21(3), 222–228.
- Rosas-Alvarado, A., Bautista-Huerta, M., & Velázquez-Sámamo, G. (2011). Atlas de los pólenes alergénicos de mayor relevancia en México. *Revista Alergia Mexico*, 58(3), 162–170.
- Rosas Alvarado, A., Montes Montes, J., & Garcia Latorre, E. (2008). [Identification of *Amaranthus palmeri* pollen allergens comparing recognizing pattern between allergic and non-allergic]. *Rev Alerg Mex*, 55(6), 215–221.
- Schroeder, H. W. J., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(202), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.Structure
- Secretaría del Medio Ambiente. (2012). Inventario de emisiones contaminantes y de efecto invernadero. Zona Metropolitana del Valle de México.
- SEDEMA. (n.d.). La contaminación del aire. Retrieved from <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27Y6BhnmKkYQ==%27>
- Seo Jeon Jun. (n.d.). SI-2 Th2 immune response. Departamento de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Chung-Ang.
- Serra Batlles, J. (n.d.). Farmacoeconomía en rinitis y asma. In *Rinitis y Asma* (pp. 103–113).
- Solomon, W. R. (2002). Airborne pollen: A brief life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(6), 895–900. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.125556>
- Stein, J. C., Dixit, R., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1996). SRK, the Stigma-Specific S Locus Receptor Kinase of Brassica, Is Targeted to the Plasma

- Membrane in Transgenic Tobacco. *The Plant Cell*, 8(3), 429–445. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.3.429>
- Steinberg, T. H. (2009). Protein Gel Staining Methods. An Introduction and Overview. *Methods in Enzymology*, 463(C), 541–563. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63031-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63031-7)
- Steinke, J., & Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma—Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*, 2(2), 66–70. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1465-9921/2/66/>
- Stephen J., T., James N., F., Nouri-Aria, K. T., & Stephen R., D. (2004). Mechanisms of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(6), 1025–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.031>
- Strachan, D., Sibbald, B., Weiland, S., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, H. R., ... Williams, H. (1997). Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatric Allergy and Immunology*, 8(4), 161–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1997.tb00156.x>
- Tao, A. L., & He, S. H. (2005). Cloning, expression, and characterization of pollen allergens from *Humulus scandens* (Lour) Merr and *Ambrosia artemisiifolia* L. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(10), 1225–1232. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00194.x>
- Tehrani, M., Sankian, M., Assarehzadegan, M. A., Falak, R., Jabbari, F., & Varasteh, A. (2010). Immunochemical characterization of *Amaranthus retroflexus* pollen extract: Extensive cross-reactive allergenic components among the four species of *Amaranthaceae/Chenopodiaceae*. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 9(2), 87–95. <https://doi.org/09.02/ijaai.8795>
- Teixeira, L. K., Fonseca, B. P., Barboza, B. A., & Viola, J. P. (2005). The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 100(1), 137–144. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900024>
- Tiotiu, A., Brazdova, A., Longé, C., Gallet, P., Morisset, M., Leduc, V., ... Poncet, P. (2016). *Urtica dioica* pollen allergy: Clinical, biological, and allergomics analysis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 117(5), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.09.426>

- Toche P., P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune PANORAMIC VISION OF THE INMUNE SYSTEM DRA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)
- Urban, P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: An overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079), 5. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0382>
- Valenta, R., Sperr, W. R., Ferreira, F., Valent, P., Sillaber, C., Tejkl, M., ... Scheiner, O. (1993). Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 91(1 PART 1), 88–97. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(93\)90300-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(93)90300-5)
- Vargas-Becerra, M. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 68(S2), S91–S97. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2009/nts092c.pdf>
- Vega Robledo, G. B. (2009). Anticuerpos. *Inmunología Para El Médico General*. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un093j.pdf>
- Velarde-Domínguez, T., Talavera-Hernández, O., Sánchez-Santa Ana, J. R., & Madrigal-Mendoza, L. F. (2002). Eficacia clínica y seguridad de la inmunoterapia sublingual con extractos estandarizados en el tratamiento del asma alérgica ocasionada por *Dermatophagoides* en población mexicana pediátrica. *Revista Sanidad Militar México*, 56(1), 10–14.
- Vennera, M. del C., & Picado, C. (2012). Patologías mediadas por la inmunoglobulina E: De la inmunoglobulina E al omalizumab. *Inmunología*, 31(4), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.08.001>
- Villalba, M., Barderas, R., Mas, S., Colás, C., Batanero, E., & Rodríguez, R. (2014). Amaranthaceae Pollens: Review of an emerging allergy in the mediterranean area. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 24(6), 371–381.
- Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 18, 121–133. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>
- Walls, D., & Loughran Editors, S. T. (n.d.). *Protein Chromatography Methods and Protocols*. (D. Walls & S. T. Loughran, Eds.) (2nd ed.). Humana Press Inc. Retrieved from <http://www.springer.com/series/7651>

- Warner, J. (2011). Immunotherapy in asthma. *Paediatrics and Child Health*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.2217/imt.10.47>
- Wilson, D. R., Nouri-Aria, K. T., Walker, S. M., Pajno, G. B., O'Brien, F., Jacobson, M. R., ... Durham, S. R. (2001). Grass pollen immunotherapy: Symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 971–976. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.115483>
- Wurtzen, P. A., Nelson, H. S., Lowenstein, H., & Ipsen, H. (1995). Characterization of Chenopodiales *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer* pollen allergens. *Allergy*, 50(6), 489–497. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1995.tb01184.x>
- Zambrano Villa, S. (2007). *Inmunología básica y clínica* (1st ed.). México: McGraw Hill.
- Zhou, M., & Ouyang, W. (2003). The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res*, 28(1), 25–37. <https://doi.org/10.1385/IR>