



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**INMUNOPROTEÓMICA DE LA ALERGIA ALIMENTARIA EN PACIENTES  
PEDIÁTRICOS MEXICANOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Q. F. B. ALBERTO ENRIQUE FERNÁNDEZ MOLINA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Horacio Reyes Vivas**

**Instituto Nacional de Pediatría, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Adela Rodríguez Romero**

**Instituto de Química, UNAM**

**Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo**

**Facultad de medicina, UNAM**

**Ciudad de México. noviembre, 2022**



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.

## Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme enseñado tanto.

Al Dr. Horacio Reyes Vivas, que me enseñó que no todo está dicho en la investigación que siempre hay algo nuevo por descubrir inclusive en lo que ya se cree conocido.

Al comité tutorial conformado por la Dra. Adela Rodríguez Romero y el Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo por guiarme en este camino y enseñarme a no rendirme y continuar en la búsqueda del conocimiento.

A los miembros del jurado: Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort, Dr. Juan Francisco Martínez Aguilar, Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista, Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella y Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara por las correcciones y las recomendaciones realizadas a la presente tesis.

Este proyecto cuenta con el apoyo de una subvención del INP (038/2018); F-M A es becaria del CONACyT.

Al CONACyT (CVU 810925) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al PAEP por haberme apoyado y brindarme la oportunidad de presentar un cartel en el octavo simposio de la sociedad mexicana de proteómica.

A todos los miembros del equipo del laboratorio de bioquímica genética que siempre fueron muy amables conmigo y me brindaron ayuda y escucharon cuando lo necesité.

A mi amor Erika, que me enseñaste a dejar de conformarme con lo suficiente, a buscar siempre ser mejor en todos los aspectos de mi vida y a nunca rendirme sin importar que el panorama no luciera prometedor, que me apoyaste y que siempre has querido verme bien y realizado, ¡Te amo!

A Dely por todo el apoyo que me da y que siempre confía en mí y me echa hartas porras siempre que voy a realizar una encomienda que puede parecer dificultosa, las palabras de apoyo siempre sientan bien en esos momentos.

A mi amigo y colega Jorge, por el apoyo y los consejos a lo largo de la maestría, con nuestra frase característica, "pero hey, las risas no faltaron"

A mis padres que siempre me han apoyado y buscado que sea una gran persona en este mundo, sin ellos no sería lo que soy ahora, gracias por todas las enseñanzas que me brindan siempre.

A toda mi familia que siempre ha creído en mí y que también me han apoyado en las buenas y en las malas.

A mis amigos, que siempre me han escuchado cuando lo necesito que siempre están ahí cuando necesito ser escuchado o necesito de un consejo o simplemente necesito despejarme un poco, agradezco que tengan tiempo para mí.

# Índice.

Agradecimientos.....	2
Inmunoproteómica de la alergia alimentaria en pacientes pediátricos mexicanos. .	5
Resumen.....	5
Marco teórico.....	6
Generalidades.....	6
Proteómica.....	6
Alergia.....	7
Alergia alimentaria.....	8
Clasificación de la alergia alimentaria.....	9
Epidemiología.....	10
Manifestaciones clínicas.....	13
Diagnóstico.....	14
Tratamiento.....	16
Fisiopatología de las alergias alimentarias.....	22
Antecedentes.....	24
Nomenclatura de los alérgenos.....	25
Principales tipos de proteínas alergénicas en manzana.....	28
Justificación.....	32
Hipótesis.....	32
Objetivos.....	32
General.....	32
Específicos.....	32
Metodología.....	33
Extracción de proteínas.....	34
Electroforesis SDS-PAGE.....	38
Isoelectroenfoque.....	40
Transferencia de proteínas.....	43
Western Blot.....	45
Preparación de la muestra de proteínas para el análisis mediante espectrometría de masas....	47
Espectrometría de masas.....	48

Especificaciones de la espectrometría de masas.....	48
Resultados.....	49
Población.....	49
Características de la población.....	52
Extracción de proteínas.....	57
<b>Utilización del rf para calcular la masa aproximada de las bandas de proteínas.</b> ....	58
Cálculo del peso molecular aproximado de estándares internos mediante el método del rf..	59
Transferencia de proteínas.....	60
Western blot.....	62
Espectrometría de masas.....	65
Spot 1 Mal d 1.02 (Q9S7M5).....	68
Spot 2 Nucleoside-diphosphate kinase, NDKB (A0A498JEZ2).....	71
Spot 3 Proteína no caracterizada (A0A498HLF4).....	73
Spot 4 Glutathione transferase A0A498HW70.....	78
<b>Discusión.....</b>	<b>81</b>
Población.....	81
Transferencia de proteínas.....	82
Western Blot.....	83
Análisis estructural y funcional.....	84
Spot 1 Mal d 1.02 (Q9S7M5).....	84
Spot 2 Nucleoside-diphosphate kinase, NDKB (A0A498JEZ2).....	85
Spot 3 Proteína no caracterizada (A0A498HLF4).....	86
Spot 4 Glutathione transferase A0A498HW70.....	86
<b>Conclusiones.....</b>	<b>91</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>91</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>92</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>102</b>
Desarrollo de una proteína recombinante.....	102
Extracción de RNA.....	103
Obtención del cDNA.....	106
Obtención del cDNA.....	106

# Inmunoproteómica de la alergia alimentaria en pacientes pediátricos mexicanos.

## Resumen.

La alergia se define como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos que puede ser mediada por anticuerpos o células. En general, se describen dos tipos de alergias, las mediadas por IgE y las no mediadas por IgE, ambas pueden producirse a través de diferentes tipos de alérgeno que desencadenan la respuesta inmune. Se estima que alrededor del mundo la prevalencia de la alergia alimentaria es de 5-8%, y en México es de 6-8%; sin embargo, debido a la dificultad en el diagnóstico, la desviación de los datos puede ser de hasta un 10%. La manzana *malus domestica* es una fuente de alérgeno frutal que corresponde a un 37% de casos. Por lo tanto, en este proyecto nos enfocamos en la alergia alimentaria, particularmente la alergia a manzana en la población pediátrica. La alergia alimentaria tiene muchas manifestaciones clínicas: dificultad para respirar, obstrucción de la garganta, comezón en boca y garganta, etc. Un retraso en el diagnóstico preciso promueve la reducción de la calidad de vida y el riesgo potencial de desarrollar anafilaxia y muerte. Para un diagnóstico apropiado de la alergia alimentaria, necesitamos combinar diferentes pruebas, historia clínica, auscultación médica, pruebas de inmunoglobulina específicas, pruebas cutáneas y reto oral. Una sola prueba positiva por sí misma no asegura la presencia de la patología, pero la combinación de pruebas reduce la desviación del diagnóstico. La certidumbre del diagnóstico podría favorecerse mediante el estudio de los alérgenos para los que la población pediátrica mexicana es reactiva; las herramientas proteómicas pueden ayudar a obtener esta información. Concomitantemente,

nuestro objetivo es identificar las diferentes proteínas alergénicas de manzana en la población pediátrica mexicana, y un objetivo subsecuente es el desarrollo de un kit diagnóstico diseñado para la población mexicana. Usando western blot 2D de proteínas extraídas de la manzana, determinamos la fuente empleando el suero de pacientes con diagnóstico de alergia a las frutas. Identificamos a las proteínas inmunorreactivas a través de espectrometría de masas. Este es un proyecto innovador porque en México no existen reportes de las principales proteínas inmunorreactivas de esta fruta. Debido a que cada población tiene un contexto genético distinto que puede promover una respuesta inmune distinta, esperamos descubrir diferentes proteínas alergénicas a las que se encuentran reportadas.

## Marco teórico.

### **Generalidades.**

#### Proteómica.

La proteómica es el conjunto de los métodos y tecnologías para la identificación y cuantificación de proteínas contenidas en una célula, tejido o un organismo. Se complementa con otras tecnologías como la genómica y la transcriptómica al revelar la identidad de las proteínas de un organismo, al analizar la estructura y funciones de una proteína particular. Las tecnologías proteómicas son utilizadas en diferentes medios de investigación para la detección de diversos marcadores diagnósticos, candidatos para la producción de vacunas, en el entendimiento de los mecanismos de patogenicidad, la alteración de los patrones de expresión en respuesta a distintas señales y la interpretación de las vías de las proteínas funcionales de diferentes enfermedades (Aslam *et al.*, 2017).

La proteómica comprende el entendimiento de las características estructurales, las modificaciones postraduccionales y la abundancia de las proteínas. Entre los métodos que contempla la proteómica se encuentra la espectrometría de masas que ha permitido la identificación de proteínas, aportando de esta manera información relacionada con los epítomos críticos sobre la superficie de los alérgenos. La espectrometría de masas se aplica para la identificación, caracterización y cuantificación de los alérgenos en una amplia variedad de matrices, tan diversa como los principales alimentos alergénicos y los productos farmacológicos derivados de la inmunoterapia con alérgenos. De este modo, representa el método de elección para el control de calidad de los productos de inmunoterapia de los alérgenos (Nony *et al.*, 2016). Por lo tanto, la proteómica nos resulta particularmente útil para el desarrollo del presente proyecto para poder identificar con precisión a las proteínas inmunorreactivas responsables de la alergia alimentaria en pacientes pediátricos mexicanos.

### Alergia.

La Academia Europea de Inmunología Clínica y Alergia en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, definen a la alergia como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos o de los que se sospecha fuertemente, y la hipersensibilidad se define como una reacción adversa del sistema inmune contra algún estímulo que es tolerado por la mayoría de las personas (Demoly *et al.*, 2014; Muraro *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2020).



Existe una gran variedad de alérgenos a los cuales algunos sectores de la población pueden generar manifestaciones clínicas mediadas por mecanismos inmunológicos, dentro de los cuales podemos encontrar alergias a diferentes componentes, por ejemplo:

- El pelo de las mascotas.
- Los ácaros.
- El polen.
- El moho.
- Los alimentos.
- Los pastos y malezas
- Fármacos.

#### Alergia alimentaria.

La alergia alimentaria es una reacción patológica del sistema inmunológico desencadenada por el consumo de un antígeno de proteína alergénica. La exposición a cantidades ínfimas de alimentos alergénicos puede producir muy diversos síntomas clínicos, que pueden variar en severidad de paciente en paciente (Yu, Freeland and Nadeau, 2016). La alergia alimentaria es ocasionada por la respuesta anormal de la inmunoglobulina E a los alimentos. Actualmente no existe una cura aprobada por la FDA (Iweala, Choudhary and Commins, 2018). Para poder entender la alergia alimentaria en los pacientes, es necesario saber que las alergias alimentarias comienzan por lo general en los primeros dos años de vida.

A pesar de que más de un tercio de los pacientes van a reportar reacciones adversas por alergias alimentarias en su juventud, las tasas de IgE proveniente de la alergia alimentaria verificable son mucho más bajas (Iweala, Choudhary and Commins, 2018).

### Clasificación de la alergia alimentaria.

La alergia alimentaria se clasifica en alergias mediadas por IgE, las no mediadas por IgE, que se encuentran conformadas principalmente por mecanismos mediados por células T, y las mixtas, que involucran mecanismos mediados por anticuerpos IgE y no mediados por IgE (figura 1) (Valle Rodríguez, Huerta López and Huerta Hernández, 2017).

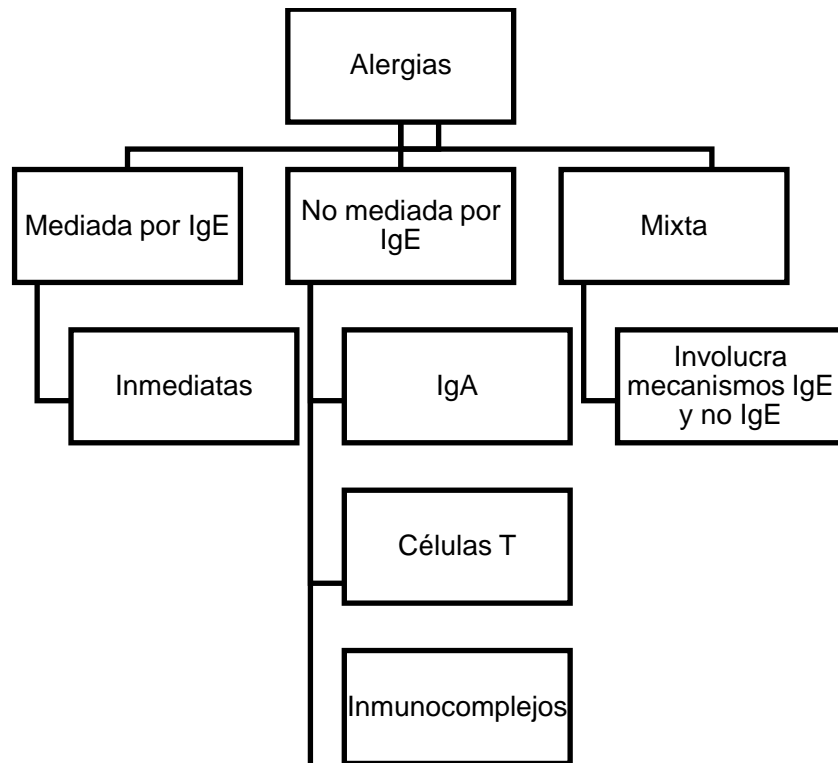


Figura 1. Clasificación de la alergia alimentaria.

## Epidemiología.

Un estudio reciente (Ontiveros *et al.*, 2016) reportado en México, basada en encuestas realizadas a la población, encontró que la prevalencia de la alergia alimentaria reportada por los pacientes en niños de 5 a 13 años es de 10% para las reacciones adversas a los alimentos, de 5.5% de una alergia alimentaria percibida, 4.9% como alergia alimentaria diagnosticada por médico, 4.4% alergia alimentaria inmediata y 1.2% como anafilaxia, las reacciones alimentarias inmediatas son desencadenadas principalmente por el consumo de camarón (1.3%), otros mariscos (0.7%), fresa (0.6%), chocolate (0.5%), y huevo (0.4%). En un estudio (López Pérez *et al.*, 2009) que se realizó en la Ciudad de México se encontró un 42.6% de prevalencia de pacientes con alergia, de los cuales un 57% tenía una edad igual o menor a los 18 años. Las alergias alimentarias más comunes en niños ocasionada por la leche (1.94% de los niños encuestados), cacahuete (1.16%), y mariscos (0.87%). Otro estudio basado en población de Estados Unidos reportó un estimado ligeramente superior de prevalencia de alergia alimentaria en infantes (8%) (Savage and Johns, 2015) .

En otros países desarrollados, los estimados totales de prevalencia se encuentran en el rango de los estimados de los Estados Unidos. La prevalencia de la alergia alimentaria se estima en un 6.7% en Canadá (7.1% en niños y 6.6% en adultos). Un meta análisis reciente de la prevalencia de la alergia alimentaria europea encontró una prevalencia total de alergia alimentaria reportada por los padres o también conocida como auto reportada de 5.9% de 2000 a 2012 (Savage and Johns, 2015).

La prevalencia de la alergia alimentaria en Asia es baja. Sin embargo, existe una escasez en los datos respecto a la prevalencia de la alergia alimentaria en la población de la India, particularmente en niños. Estudios recientes tienden a utilizar cuestionarios que responden los pacientes o los padres de los pacientes y es probable que las cifras se encuentren sobreestimadas. Existen estudios que reportan la prevalencia de alergia alimentaria en niños de 4-5% en Singapur, 10.9% en Corea, 4.98% en el noreste de China y tan alto como 12.6% en Japón. Debido a la creciente urbanización, el desarrollo y la riqueza, se espera el incremento de la prevalencia de la alergia alimentaria en Asia y la India. Así mismo, aumentará de manera similar la prevalencia del asma, reflejando lo que ocurre en occidente (Devdas *et al.*, 2018).

La prevalencia estimada de la alergia alimentaria entre los niños del Reino Unido, Canadá y Estados Unidos es de aproximadamente 6-8%. En Australia, la alergia alimentaria mediada por IgE afecta hasta el 10% de los niños. En general, los estudios actuales estiman una prevalencia de la alergia alimentaria en general de un 5% en adultos y un 8% en niños. Un incremento de tres veces en la prevalencia del cacahuete y la nuez se observó en Reino Unido y los Estados Unidos entre 1997 y 2008, mientras que en Australia, se ha observado un incremento de 10 veces en referencias especializadas para la alergia alimentaria y un incremento de 5 veces en referencias hospitalarias para anafilaxis relacionada con la alergia alimentaria (Devdas *et al.*, 2018).

Un estudio realizado en México en el 2016 menciona que la prevalencia de las reacciones alimentarias adversas fue del 10.0%, donde los desencadenantes más importantes fueron leche y mariscos. En este estudio se resalta el hecho de que el principal alérgeno en la población infantil escolarizada son los mariscos. Así mismo, se menciona que la prevalencia de alergias alimentarias para el cacahuete y la nuez es relativamente baja si se le compara con la población en los Estados Unidos de América (Ontiveros *et al.*, 2016).

Las alergias alimentarias constituyen del 5-8% de prevalencia a nivel mundial (Hassan and Venkatesh, 2015) mientras que en México, se estima que es de 6-8% (Aguilar-Jasso *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Alergia menciona que la alergia alimentaria ha incrementado en los últimos años. Se acepta generalmente que afecta al 2.5% de la población en general, pero el sesgo de los datos de prevalencia es elevado variando de 1% a 10%. El problema del sesgo consiste en el diagnóstico correcto de la alergia, pues se encuentra sujeto a diferentes factores como lo son la diferencia de criterios para diagnosticar la alergia alimentaria, las metodologías de estudio, la variación geográfica, la variación étnica, la edad y la dieta particular de cada paciente que conforman el estudio en general (Peters, Allen, *et al.*, 2013; Peters, Gurrin, *et al.*, 2013; Soares-Weiser *et al.*, 2014; Benedé *et al.*, 2016; National Academies of Sciences *et al.*, 2016; Sayes, 2017).

La incidencia a la alergia alimentaria no es uniforme en las diferentes poblaciones alrededor del mundo, pues existe una diferencia en la prevalencia a la alergia alimentaria en Reino Unido (2.18%) y Grecia (0.07%). Del mismo modo, existen diferencias en las alergias a determinados alimentos, como lo es la alergia al huevo

que tiene una prevalencia en Europa (1.23%) diferente de la de Australia (9%). También la prevalencia de alergia al cacahuete es diferente entre el Reino Unido (1.8%), Australia (3.0%) y Estados Unidos (1.4%) (*Food Allergy | World Allergy Organization*, no date).

La forma de preparar los alimentos también influye en la prevalencia a la alergia alimentaria, pues es mayor la alergia al cacahuete en Estados Unidos donde se prefiere el consumo del cacahuete tostado a diferencia de la baja prevalencia que presenta China, donde se consume preferente hervido (Maleki *et al.*, 2000).

#### Manifestaciones clínicas.

Existen diferentes manifestaciones clínicas que se pueden presentar al entrar en contacto con el alimento alergénico, que consiste en la irritación y molestia en el tracto gastrointestinal. Aunque los síntomas no se limitan al tracto gastrointestinal, en algunos casos se puede llegar a producir conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica y asma alérgica. Es importante señalar el hecho de que se puede producir anafilaxia, que consiste en la inflamación de las vías respiratorias de manera súbita pudiendo ocasionar la muerte si no se atiende a tiempo. Según (Sampson, 2004), las principales manifestaciones clínicas de las personas con alergia alimentaria van desde las dermatológicas (urticaria, angioedema, rash eritematoso morbiforme y enrojecimiento), respiratorios (rinoconjuntivitis alérgica y broncoespasmo agudo), gastrointestinales (síndrome de alergia oral y espasmo gastrointestinal agudo), cardiovascular (Mareo, desmayo y anafilaxia) y variados (contracciones del útero y sensación de muerte inminente) (Anvari *et al.*, 2019).

## Diagnóstico.

El primer indicio de que una persona es alérgica proviene de la información que proporciona el paciente, el cual acude a la clínica debido a una molestia que cree que se encuentra atribuida a la ingesta de algún alimento. Es el médico alergólogo, quien confirma el diagnóstico de la alergia, apoyándose en herramientas como la prueba de reto oral, determinación de IgE específicas y las pruebas dermatológicas (Sicherer and Sampson, 2014; Yu, Freeland and Nadeau, 2016).

### Prueba de reto oral.

Consiste en la administración del alérgeno al cual el paciente describe una reacción desfavorable al consumirlo, es el estándar de oro para confirmar la presencia de una alergia. Sin embargo, es una prueba que requiere la presencia de médicos especializados en la materia, pues al administrar el alérgeno en cuestión puede ser que el paciente desarrolle un cuadro de anafilaxia, padecimiento que puede ser potencialmente mortal si no se toman las medidas adecuadas (Sicherer and Sampson, 2014; Yu, Freeland and Nadeau, 2016).

### Pruebas dermatológicas.

Es una prueba que consiste en la aplicación sobre la piel de una gran variedad de alérgenos, los cuales varían desde diferentes clases de pólenes, ácaros, pelo de mascotas, con la finalidad de identificar los alérgenos a los que el paciente es reactivo. La identificación se realiza mediante la medición de la inflamación que genera el contacto del alérgeno sobre la piel, se mide el diámetro de la roncha que genera y se compara con un control positivo (histamina), y un control negativo (solución salina).

La prueba resulta positiva si la reacción producida por el alérgeno es superior a la del control negativo y se asemeja con la producida por el control positivo (Sicherer and Sampson, 2014; Yu, Freeland and Nadeau, 2016).

Determinación de IgE específicas.

Esta prueba se realiza mediante la toma de suero del paciente, mismo que será procesado en un ensayo de ELISA, donde se mostrará el título de los anticuerpos del suero del paciente contra el alérgeno en cuestión. Si el paciente sospecha de alergia, en teoría el título de los anticuerpos IgE específicos (sIgE) se incrementará, sin embargo, debido a la baja cantidad de anticuerpos IgE que posee el suero sanguíneo, es una prueba difícil de realizar. Existen varias unidades mediante las cuales se mide el título de anticuerpos, una de ellas son las kU/L, un valor de IgE específicas de 0.35-0.69 es considerado de significancia dudosa, moderadas de 0.70-3.49 como posible, altas de 3.50-17.49 como muy posible y muy alto de 17.50-49.99 como muy probable. Aunque los datos precisos para poder determinar la cantidad de sIgE necesarias para un valor predictivo para el diagnóstico de la alergia varían conforme al alimento utilizado para la prueba, existen varios autores (Bahna, 2008; Anvari *et al.*, 2019) que confirman esta variabilidad en estudios que se realizan de manera individual.



Existen variantes de la técnica donde se utiliza el principio de la unión específica de los anticuerpos para realizar estudios de competencia, para poder determinar la existencia de reactividad cruzada de un alérgeno presente en diferentes componentes biológicos, también para hacer una aproximación sobre la identificación de una posible proteína alergénica, así como para confirmar la responsabilidad de una proteína alergénica producida mediante recombinación genética (Vieths *et al.*, 1994; Wachholz, Dearman and Kimber, 2005; Hao *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2020)

#### Tratamiento.

El tratamiento por excelencia consiste en la modificación de la dieta de los individuos que presentan alergia donde se omiten los alimentos alergénicos. Sin embargo, existen la inmunoterapia alergénica que consiste en la aplicación de dosis graduales controladas del alérgeno mediante vía subcutánea u oral, con la finalidad de desencadenar el fenómeno de tolerancia en los pacientes (Zarif, 2020). El tratamiento no tiene una efectividad del 100% y algunos de los pacientes tratados pueden volver a tener síntomas alérgicos (Pecora *et al.*, 2018).

La alergia alimentaria es una condición que amenaza potencialmente la vida que no tiene terapias aprobadas además de evitar la fuente de la alergia y la epinefrina inyectable para el tratamiento de reacciones alérgicas agudas (Wood, 2017).

## Tratamiento con alérgenos.

La historia clínica no es suficiente para determinar el alérgeno específico del paciente. Además de proporcionar información sobre las sensibilidades específicas, las pruebas de diagnóstico de alergias tienen un valor predictivo en términos de la posibilidad del desarrollo de una alergia alimentaria y la severidad/persistencia de la enfermedad alérgica. Los dos métodos más comúnmente utilizados para confirmar la sensibilización de la alergia alimentaria son las pruebas dermatológicas y la medición de IgE específica en suero. Ambos métodos tienen un valor de diagnóstico similar en términos de sensibilidad y especificidad, con ambos parámetros variando con el escenario clínico y el alérgeno probado (Chung *et al.*, 2010). Actualmente, existen tres diferentes tipos de ensayos de IgE específicas del suero utilizados en los Estados Unidos. Los tres ensayos reportan sensibilidad analítica comparable, con los coeficientes de variación de la precisión, reproducibilidad y linealidad menores a 15%. Sin embargo, los estudios comparativos han demostrado variabilidad inter-ensayo, sugiriendo que detectan diferentes poblaciones de anticuerpos IgE en suero humano, o bien, no miden los mismos anticuerpos con la misma eficacia. Los ensayos de IgE específica utilizan como reactivo el extracto del alérgeno. Las pruebas realizadas con esos reactivos pueden identificar la sensibilidad a los alérgenos clínicamente irrelevantes. Esta limitación del diagnóstico ha retardado el desarrollo de las pruebas de diagnóstico molecular, también referidos como análisis de componente resuelto, que utilizan alérgenos nativos o recombinantes purificados para detectar la sensibilidad de la IgE a moléculas de alérgenos individuales. Esos avances en el IgE sérico de las

pruebas podrían mejorar la precisión de las pruebas de diagnóstico molecular, que podrían disminuir la necesidad de retos alimentarios y mejorar la especificidad de la inmunoterapia con alérgeno (Cox, 2011)

Tratamiento con fármacos.

La adrenalina administrada al inicio de los síntomas que podrían representar un caso de anafilaxia después de la ingestión del alimento alergénico es crucial para evitar el desenlace fatal de las reacciones que produce, medicamento que reduce al cabo de unos minutos los síntomas tan severos que presenta. También se utilizan los antihistamínicos y antiinflamatorios esteroideos, que disminuyen la sintomatología de los episodios de alergia como las erupciones y la comezón mediante el bloqueo de los receptores H1; los bloqueadores de los receptores H2 pueden utilizarse para aliviar los síntomas gastrointestinales, sin ser una cura para la misma (Martinis *et al.*, 2020)

Existen terapias que incluyen el uso de anticuerpos que tienen la capacidad de regular las funciones de las células inductoras y efectoras involucradas en la alergia alimentaria, así como la producción de IgE, con el objetivo de suprimir las respuestas nativas y adaptativas que producen las reacciones alérgicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales Omalizumab (anti-IgE) y Dupilumab (anti-interleucina-4Ra) y anticuerpos monoclonales en contra de la IL-5 (reslizumab y mepolizumab) (Martinis *et al.*, 2020).

Inmunoterapia.

Una primera aproximación en el tratamiento de las alergias es el empleo de la inmunoterapia, que consiste en el suministro de pequeñas cantidades de alérgenos conocidos para el paciente, con la finalidad de que dicho suministro genere una respuesta de tolerancia en el organismo. El mecanismo mediante el cual se alcanza dicha tolerancia es desconocido hasta la fecha, se ha propuesto un papel importante de las células T reguladoras en el desarrollo del fenómeno de tolerancia (Eiwegger *et al.*, 2019; De Martinis *et al.*, 2020); aunque aún se desconoce la condición precisa para que el paciente pueda conseguir este estadio del sistema inmunológico, existen tres tipos de inmunoterapia.

a) Subcutánea.

La inmunoterapia subcutánea es la forma de inmunoterapia alérgica más predominante y que existe desde hace mucho tiempo. Se dan dosis de extractos de alérgenos que se deben ir incrementando gradualmente conforme pasa el tiempo, a esto se le conoce como fase de construcción, hasta que la dosis de mantenimiento mensual buscada se alcanza. La técnica es importante debido a que la administración subcutánea depende de una adecuada absorción. Una inyección intramuscular accidental podría resultar en una rápida absorción, con riesgo incrementado de una reacción sistémica. Las inyecciones deben ser administradas bajo la supervisión directa de personal médico apropiado. Las medicaciones necesarias y el equipo deben estar disponibles inmediatamente para el tratamiento de la anafilaxia, inclusive epinefrina intramuscular (Wong & Lomas, 2019).

Los efectos adversos más comunes de la inmunoterapia subcutánea incluyen reacciones relacionadas en el sitio de inyección local como una gran hinchazón, prurito, eritema, o dolor. Se puede tratar con medidas de soporte como lo son: el uso de hielo, corticosteroides tópicos, antihistamínicos orales adicionales y fármacos antiinflamatorios no esteroideos o acetaminofén (Wong & Lomas, 2019).

Se han descrito varios cambios inmunológicos en la inmunoterapia subcutánea. Se ha demostrado un incremento inicial de IgE específica durante los primeros meses del tratamiento, al que sigue un descenso gradual. También se ha observado incremento sérico de IgG específica, particularmente de las subclases IgG2 e IgG4 desde los primeros cuatro meses de uso de inmunoterapia (Heeringa *et al.*, 2020). Inicialmente, se pensó que la función de los IgG era bloquear la activación de mastocitos y basófilos compitiendo con la IgE por los alérgenos, pero recientemente se ha propuesto que la IgG4 puede inhibir la presentación de antígenos alérgicos mediada por CD23 a células T (Wachholz and Durham, 2004; Gepp *et al.*, 2016). La inmunoterapia específica induce un estado de tolerancia alérgica alterando la memoria alérgeno-específica, así como la respuesta de los linfocitos T y B hacia los alérgenos con la participación de linfocitos T reguladores e interleucina 10 (Akdis *et al.*, 1998; Dolch *et al.*, 2019). Se sabe que la inmunoterapia específica logra inducir el desarrollo y activación de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ productoras de interleucina 10 con capacidad supresora, por lo que la estimulación de linfocitos T reguladores es considerada el evento cardinal de la inmunoterapia (Francis, Till and Durham, 2003; Shi and Qin, 2005; Lou *et al.*, 2012).

De este modo, la inmunoterapia específica cumple una importante función en el tratamiento de la patología alérgica modulando al sistema inmune y reduciendo gradualmente la severidad de la respuesta (Valle Rodríguez et al., 2017).

b) Oral.

La inmunoterapia oral es un tratamiento experimental en donde los pacientes consumen cantidades crecientes de la comida, las proteínas en crudo o la proteína en específico que les produce la alergia en un intento de generar un grado de desensibilización. La desensibilización es posible en muchos pacientes, aunque conlleva riesgos significativos con las reacciones alérgicas, y la habilidad para inducir tolerancia a largo plazo no ha sido dilucidado por completo (Wood, 2017).

c) Sublingual.

La inmunoterapia sublingual es un desarrollo terapéutico relativamente reciente que puede ser más conveniente para pacientes con alergias ambientales. La administración de un alérgeno en específico hacia la mucosa oral se realiza a través de tabletas de rápida disolución colocadas bajo la lengua. La medicación se toma todos los días, con la primer dosis administrada en la clínica bajo la supervisión directa de personal médico apropiado. El paciente puede entonces continuar con el resto de la terapia en casa, con un auto inyector de epinefrina disponible para todas las veces que se requiera (Wong & Lomas, 2019).

## Fisiopatología de las alergias alimentarias.

Los alérgenos de las frutas son consumidos y pueden generar reacción mediante el síndrome de alergia oral que consiste en que el individuo presenta diversos síntomas de la alergia sobre el tracto digestivo al consumir el alimento contra el que es alérgico (Renz *et al.*, 2018). Aunque también pueden absorberse en el intestino y migrar al torrente sanguíneo (De Martinis *et al.*, 2019). El mecanismo de la alergia mediada por anticuerpos IgE se divide en dos etapas. La primera etapa se denomina como sensibilización al alérgeno, la cual consiste en que, tras una exposición a éste, las células presentadoras de antígeno procesan la molécula y lo presentan a las células T CD4+ vírgenes mediante la presentación del antígeno entre el complejo principal de histocompatibilidad y el receptor de la célula T, proceso que se ve favorecido por la secreción de IL-4 y la linfopoyetina estromal tímica. Este proceso activa la célula T hacia un perfil Th2 que apoyado por las citocinas IL-4 e IL-13, ocasiona que las células B maduren hacia un estado de células B de memoria productoras de anticuerpos IgE, dicha producción de anticuerpos se adherirá a las regiones FcεR1 de los mastocitos, basófilos y eosinófilos. La segunda etapa consiste en el contacto de los alérgenos con los anticuerpos IgE anclados en la membrana de los basófilos y los mastocitos que generan una cascada de señalización que conlleva a la degranulación de los mismos liberando histamina, leucotrienos y prostaglandinas responsables de las manifestaciones clínicas de la alergia como se muestra en la figura 2 (Himly *et al.*, 2016).

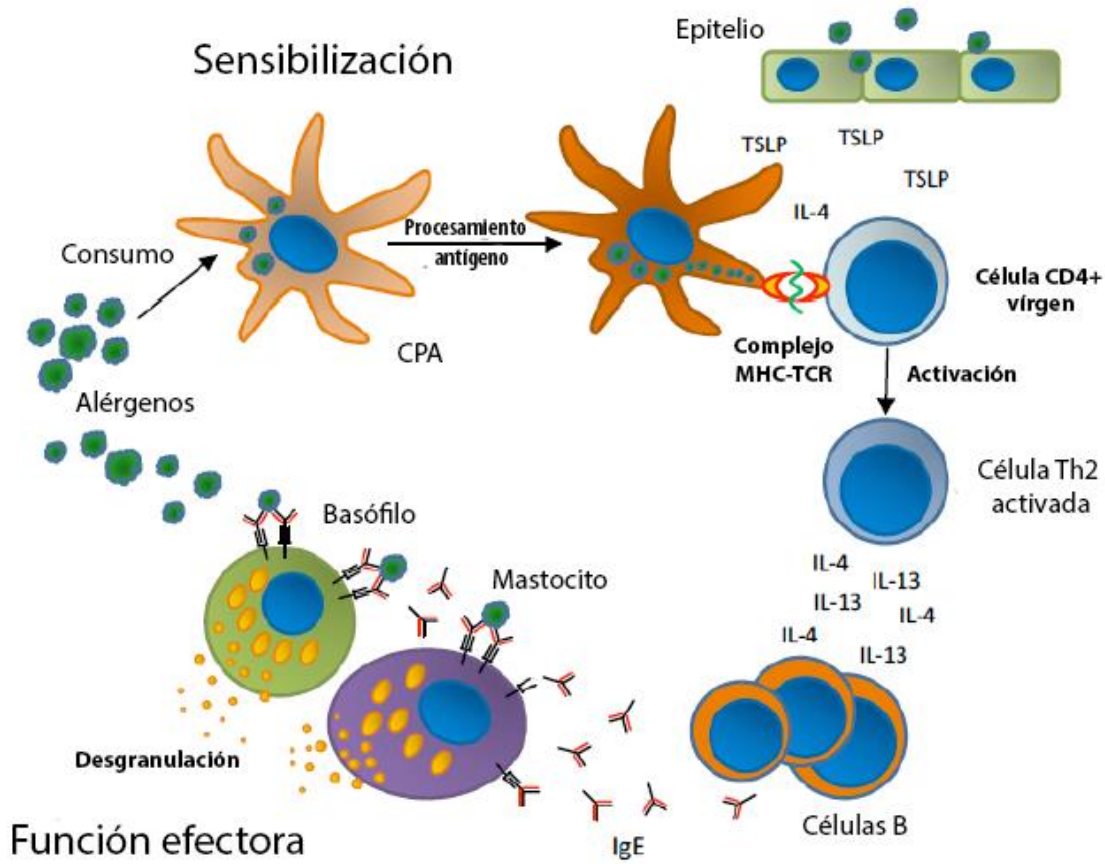


Figura 2. Mecanismo de sensibilización y función efectora de la hipersensibilidad mediada por anticuerpos IgE. [Tomado de Himly, *et al.*, 2016]

El mecanismo de tolerancia se encuentra regulado por las células T reguladoras, las cuales actúan como antagonistas mediante la secreción de IL-10 y TGF-beta, que generan diferentes efectos en las funciones efectoras de las células Th2, como son la supresión de la migración de células Th2 a los tejidos, la desensibilización temprana de mastocitos y basófilos, la supresión de la producción de moco, inducción temprana de IgG4 y una disminución tardía en IgE. (Fujita *et al.*, 2012). De este modo, la tolerancia inmunológica hacia los alérgenos es la formación de tolerancia clínica a largo plazo hacia los alérgenos que es soportada por los cambios en las respuestas de memoria y especificidad de antígeno de las células B y T y la



regulación positiva de los umbrales de activación de los mastocitos y basófilos, resultando en un control eventual de los síntomas de alergia, un ejemplo de esto se encuentra en la figura 3 (Kucuksezer *et al.*, 2013)

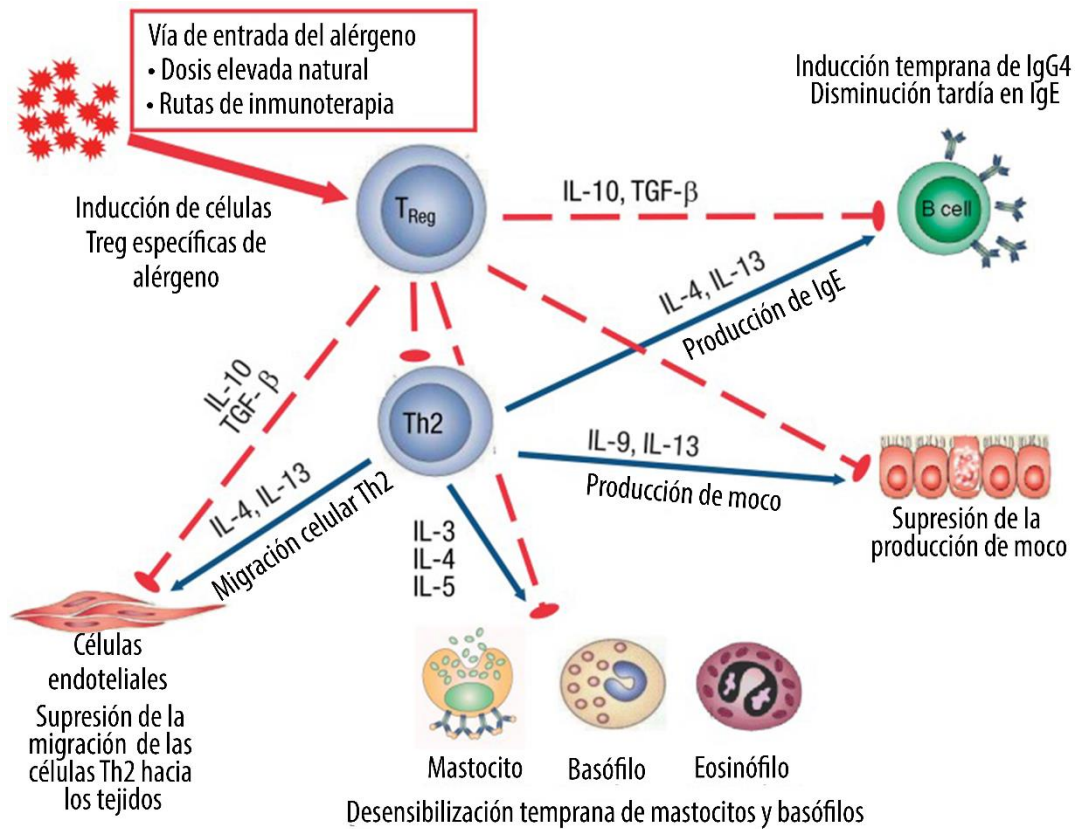


Figura 3. Mecanismo de tolerancia a la hipersensibilidad tipo 1. [Tomado de (Kucuksezer *et al.*, 2013)]

## Antecedentes

En México se llevaron a cabo estudios en el Hospital Infantil de México y en el Instituto Nacional de Pediatría, donde se reportan indicios de que una de las principales frutas a las que es alérgica la población mexicana es la manzana. En el trabajo de Rodríguez-Mireles *et al.*, se analizan a 44 pacientes con diagnóstico de alergia alimentaria, el 37% de la muestra que analizaron resultó positiva a alergia a la manzana. En el trabajo de Azamar-Jácome *et al.*, se estudiaron 29 pacientes

pediátricos con diagnóstico de alergia alimentaria, el 54% de las muestras que analizaron generó un diagnóstico de alergia a las manzanas. Estos antecedentes nos llevan a definir a la manzana como parte del proyecto y determinar cuáles de sus proteínas son los principales alérgenos para la población infantil mexicana (Azamar-Jácome *et al.*, 2017; Aguilar-Jasso *et al.*, 2018)).

La finalidad del proyecto involucra la generación de un kit diagnóstico mediante la creación de proteínas recombinantes alergénicas de diferentes frutas como lo son la manzana, el durazno, la pera y el plátano. El proyecto consta de diferentes etapas, estandarización de técnicas para generar los perfiles proteómicos de las diferentes frutas, identificación de las proteínas alergénicas en pacientes pediátricos mexicanos de las diferentes frutas y la generación de las proteínas recombinantes para poder desarrollar el kit diagnóstico. El presente proyecto se enfoca en la identificación de las proteínas alergénicas de la manzana que afectan a pacientes pediátricos mexicanos.

### **Nomenclatura de los alérgenos.**

La nomenclatura sistemática para los alérgenos se originó a principios de los años ochenta, cuando apenas se habían descrito tan sólo unas cuantas proteínas alergénicas. Un grupo de científicos dirigidos por el Dr. David G. Marsh desarrolló la nomenclatura basado en la taxonomía Linnaen, que en un futuro se vería establecido como el “*World Health Organization/ International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Subcommittee*” en 1986. Su principal objetivo era el de estandarizar los nombres que se otorgaban a los antígenos (alérgenos) que ocasionaban alergias mediadas por IgE en los

humanos. El subcomité publicó por vez primera una lista revisada de los nombres de los alérgenos en 1986, que continuó creciendo con publicaciones hasta 1994. Entre 1994 y el 2007, la base de datos se encontraba disponible en línea y posteriormente, se convirtió en una página de internet más moderna. La lista de alérgenos se volvió la “*Allergen Nomenclature database*” ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), que incluye actualmente 880 proteínas de una gran variedad de fuentes. El subcomité tiene expertos en alergología clínica y molecular. Ellos revisan los candidatos a alérgeno, utilizando criterios basados en evidencia desarrollados por el subcomité. Este proceso de revisión evalúa los análisis bioquímicos y las pruebas de alergenicidad mandados, y busca asignar nombres de los alérgenos antes de la publicación. El subcomité mantiene y revisa la base de datos enfrentándose a nuevos retos como el que las nuevas tecnologías “ómicas” proporcionen más datos sobre alérgenos potencialmente nuevos. Muchos artículos publican información sobre alérgenos nuevos que requieren un nuevo nombre oficial, que involucra el envío de información confidencial al *WHO/IUIS “Allergen Nomenclature Subcommittee”*, suficiente como para demostrar la unión de la IgE de pacientes alérgicos a la proteína purificada.

Como se definió en la revisión de 1994, los nombres de los alérgenos consisten de las tres primeras letras del género, una letra del epíteto de la especie, seguido de un número arábigo. Ocasionalmente, se añade una letra al género (Sola para tomate, *Solanum lycopersicum*, porque Sol fue utilizado para múltiples especies de hormigas, *Solenopsis sp*) o al de las especies (Hel como 1 para un caracol *Helix aspersa* como Hel a fue utilizado para una margarita *Helianthus annuus*) que es una

forma para diferenciar alérgenos de diferentes especies que tienen nombres muy similares. En algunas ocasiones, el nombre taxonómico de la especie se cambia (por ejemplo, *Betula verrucosa* se vuelve *Berula pendula*), pero el subcomité podrá decidir si conserva el nombre original del alérgeno si éste ha sido utilizado ampliamente en la literatura (por ejemplo, Bet v 1 para el principal alérgeno del abedul). Los alérgenos que provienen de la misma fuente son clasificados en grupos bioquímicos (designados por números arábigos que contienen dos dígitos), usualmente conforme al orden en el que fueron identificados (por ejemplo, Der p 1 o Bet v 1). Cuando es posible, los alérgenos de especies diferentes que están relacionados por el nivel taxonómico de familia u orden, y que pertenecen a la misma familia bioquímica de proteínas, se les asignará el mismo número entre especies. Sin embargo, debido a la convención de nombrar históricamente a los alérgenos, algunos de éstos que pertenecen a la misma familia de proteínas se les han asignado números diferentes. Dentro de cada grupo, los alérgenos pueden ser isoalérgenos o tener variantes (isoformas) dependiendo de su identidad basada en su secuencia de aminoácidos. Los isoalérgenos son proteínas homólogas que comparten las siguientes propiedades bioquímicas: peso molecular similar, función biológica similar o idéntica, y una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 67% (esta regla no siempre se sigue). Cada isoalérgeno puede tener múltiples formas de secuencias altamente idénticas (>90% de identidad, difiriendo por lo general en pocos aminoácidos), que son designados como variantes (o isoformas).

Los isoalérgenos y sus variantes se distinguen mediante sufijos numéricos seguidos de un punto después del número del alérgeno. Los primeros dos números corresponden a un isoalérgeno en particular (por ejemplo, Amb a 1.01 y Amb a 1.02), y los dos números subsecuentes 01-99 definen cada variante del isoalérgeno en particular (por ejemplo, Amb a 1.0101 y Amb a 1.0102). (Pomés *et al.*, 2018)

### **Principales tipos de proteínas alergénicas en manzana.**

La alergia a la manzana *Malus domestica*, una fruta de la familia de las rosáceas, por lo general se presenta con síntomas orofaríngeos moderados. Mal d 1, que es homólogo al principal alérgeno del polen Bet v 1, fue el primer alérgeno en manzana caracterizado. Más adelante, se identificaron otros alérgenos que incluyeron a la proteína tipo taumatina (TLP; Mal d 2), la proteína de transferencia de lípidos no específica (nsLTP; Mal d 3) y la profilina (Mal d 4) (Hassan and Venkatesh, 2015).

En el norte y el centro de Europa, la ocurrencia de alergia a manzana se asocia muy frecuentemente a la polinosis que se define como la aparición de síntomas respiratorios (rinoconjuntivitis y asma) como resultado de la inhalación de polen hacia el cuál el paciente se encuentra previamente sensibilizado (Bartra *et al.*, 2009), y la sensibilización se debe a la reactividad cruzada entre Bet v 1 y Mal d 1.

En el caso del sur de Europa, la alergia a esta fruta es por el conjunto con la alergia al durazno ocasionada por los alérgenos Pru p 3 y Mal d 3. Los síntomas relacionados a Mal d 1 son generalmente moderados y locales, síntomas representativos de una proteína lábil químicamente. Por otro lado, Mal d 3, es una proteína muy estable debido a la presencia de cuatro puentes disulfuro (Alessandri *et al.*, 2012). Se han detectado repetidamente a Mal d 3 y sus homólogos en otras

frutas y vegetales como los principales actores de la alergia alimentaria verdadera. Las manifestaciones sistémicas ocurren principalmente en el área del mediterráneo y se ha observado que se basa en la reactividad cruzada entre la proteína LTP de la manzana y la del durazno, considerado el durazno como sensibilizador primario (Gomez *et al.*, 2014). La alergenicidad de LTP no se reduce mediante el procesamiento con altas temperaturas. Se sabe muy poco sobre el modelo de sensibilización hacia Mal d 2 (TLP). Sin embargo, debido a la presencia de 8 puentes disulfuro conservados en Mal d 2, se espera que presente resistencia al pH o al calor (Smole *et al.*, 2008, p. 2). Mal d 4, es un alérgeno menor y parece estar relacionado a la polinosis; Bet v 2, la profilina del polen del abedul sensibiliza a aproximadamente 20% de los pacientes alérgicos al polen (Huertas *et al.*, 2014; Odongo *et al.*, 2015). Las profilinas parecen tener proteínas de reacción cruzada con alérgenos de otras frutas y vegetales de la familia de las rosáceas, Vitaceae y Solanaceae, así como con otros pólenes (Hassan and Venkatesh, 2015).

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) se reconocen actualmente como una fuente elevada de alérgenos. Los PRs se encuentran definidas como proteínas que son codificadas en el genoma de las plantas y son inducidas específicamente en la respuesta a infecciones por patógenos como los hongos, las bacterias o los virus, o por factores ambientales adversos. Las PRs no constituyen una superfamilia de proteínas, representan una colección de proteínas no relacionadas que funcionan como parte del sistema de defensa de las plantas.

Actualmente, las PRs se clasifican en 14 familias. Muchos alérgenos importantes de las plantas son homólogos de las proteínas miembros de la familia PR (Breiteneder, 2004).

Muchos alérgenos de las plantas pertenecen a sólo cuatro familias de proteínas, indicando que las estructuras conservadas y las actividades biológicas podrían jugar un papel central en determinar o promover las propiedades alergénicas. La conservación de residuos de superficie y cadenas principales con la familia Bet v 1 tiene un papel importante en el mantenimiento de los epítomos de unión a IgE, que explica los síndromes de alergia de reactividad cruzada. Contrario a una opinión popular, la sensibilización a los alérgenos de las frutas rosáceas puede ocurrir sin relación con la polinosis y puede tener diversas consecuencias severas (Marzban *et al.*, 2005)

Mal d 1 es el principal alérgeno en alergias asociadas a polen y frutas, que pertenece a las proteínas inductoras de patogénesis (PRP-10). Estudios de hibridación descubrieron genes homólogos a bet v 1 en manzanas, peras, perejiles, frijoles y papas, con homologías de secuencia de 50-70%. A diferencia de otras PRP-10, cuya expresión es fuertemente inducida bajo condiciones de estrés o ataque de patógenos, los alérgenos de frutas parecen estar expresados constitutivamente (Marzban *et al.*, 2005)

Mal d 2 pertenece a la familia de proteínas tipo taumatina (TLPs), que se reportan como una familia novedosa de alérgenos de fruta, los TLPs son generalmente resistentes al pH o a la desnaturalización inducida por el calor debido a la presencia de 8 puentes disulfuro (Krebitz *et al.*, 2003). Hasta ahora diferentes TLPs de frutas

han sido reportadas con la habilidad de unir anticuerpos IgE de pacientes alérgicos e.g. manzana, kiwi, uva, y cereza con un 50% de identidad de secuencia (Breiteneder, 2004). Los TLPs con origen en polen de *Cupressaceae* está reportado como un alérgeno importante en España, Estados Unidos y el norte de México (Marzban *et al.*, 2005)

Mal d 3, una proteína de transferencia de lípidos no específica (LTP), ha sido identificada como el principal alérgeno en frutas pertenecientes a la familia de las rosáceas como el durazno y la manzana, particularmente en el área del Mediterráneo que se encuentra libre de abedul. Está proteína y sus homólogos en otros frutos y vegetales se han señalado como los verdaderos actores detrás de la alergia alimentaria. Los LTPs pueden resistir la desnaturalización por el procesamiento con calor de los alimentos y la degradación por digestión por el tiempo suficiente como para inducir sensibilización y síntomas sistémicos a través de la mucosa gástrica. Actualmente, se ha incrementado el número de proteínas homólogas a LTP con un porcentaje de similitud mayor al 80%, se han identificado en diferentes plantas alimenticias, particularmente en frutas con hueso (Marzban *et al.*, 2005)

Mal d 4 pertenece al grupo de las profilinas, que son alérgenos de plantas de menor importancia que tienen un papel en la alergia asociada al polen. Las profilinas, presentes en todo sistema eucarionte, regulan la polimerización de la actina del citoesqueleto y median las señales de transducción en la célula (Valenta *et al.*, 1991; Radauer *et al.*, 2006). Bet v 2 (profilina del polen de abedul) sensibiliza aproximadamente 20% de los pacientes alérgicos al polen (Marzban *et al.*, 2005).



## Justificación.

En México no existen estudios a nivel proteómico sobre la alergia alimentaria. La manzana es una de las principales frutas a las que la población pediátrica mexicana presenta alergia y es consumida de manera tradicional en la etapa pediátrica como fuente nutritiva, por lo que se decide analizar las principales proteínas inmunorreactivas; con la finalidad de mejorar el diagnóstico y las terapias de este padecimiento que reduce la calidad de vida y en ocasiones, puede llegar a ser letal.

## Hipótesis.

Debido a las diferencias en la prevalencia de las alergias alimentarias en las poblaciones del mundo, esperamos encontrar proteínas específicas para la población pediátrica mexicana.

## Objetivos

### **General.**

- Identificar mediante inmunoproteómica a alérgenos en manzana que afectan a la población pediátrica mexicana.

### **Específicos.**

- Obtener un extracto íntegro de proteínas de la pulpa de la manzana.
- Obtener muestras de suero de pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de alergia a las frutas.
- Separar mediante geles desnaturizantes de doble dimensión (2D) los extractos de proteína de pulpa de manzana

- Reconocer mediante Western Blot 2D a las proteínas inmunorreactivas de la pulpa de la manzana.
- Identificar mediante espectrometría de masas o degradación de Edman las proteínas inmunorreactivas de la pulpa de la manzana.
- Desarrollar una lista de alérgenos de la pulpa de la manzana en población infantil mexicana.
- Comparar los resultados obtenidos con los encontrados en la literatura.

## Metodología.

### **Estrategia de estudio.**

Para poder identificar las probables nuevas proteínas alergénicas en la población pediátrica mexicana, se extraen proteínas de la pulpa de manzana mediante el método de extracción fenólica. Se analiza su integridad y pureza mediante el análisis en SDS-PAGE. Después, se realiza la técnica de Western blot para poder identificar a las proteínas inmunorreactivas. Las proteínas inmunorreactivas son digeridas y purificadas a partir de un SDS-PAGE con tripsina que serán analizadas mediante espectrometría de masas o degradación de Edman. Finalmente, las secuencias obtenidas serán comparadas con las reportadas en la literatura y una vez que se discriminen secuencias nuevas, se elaborará una lista con los nuevos alérgenos en la población pediátrica mexicana, tal como se muestra en la figura 4.

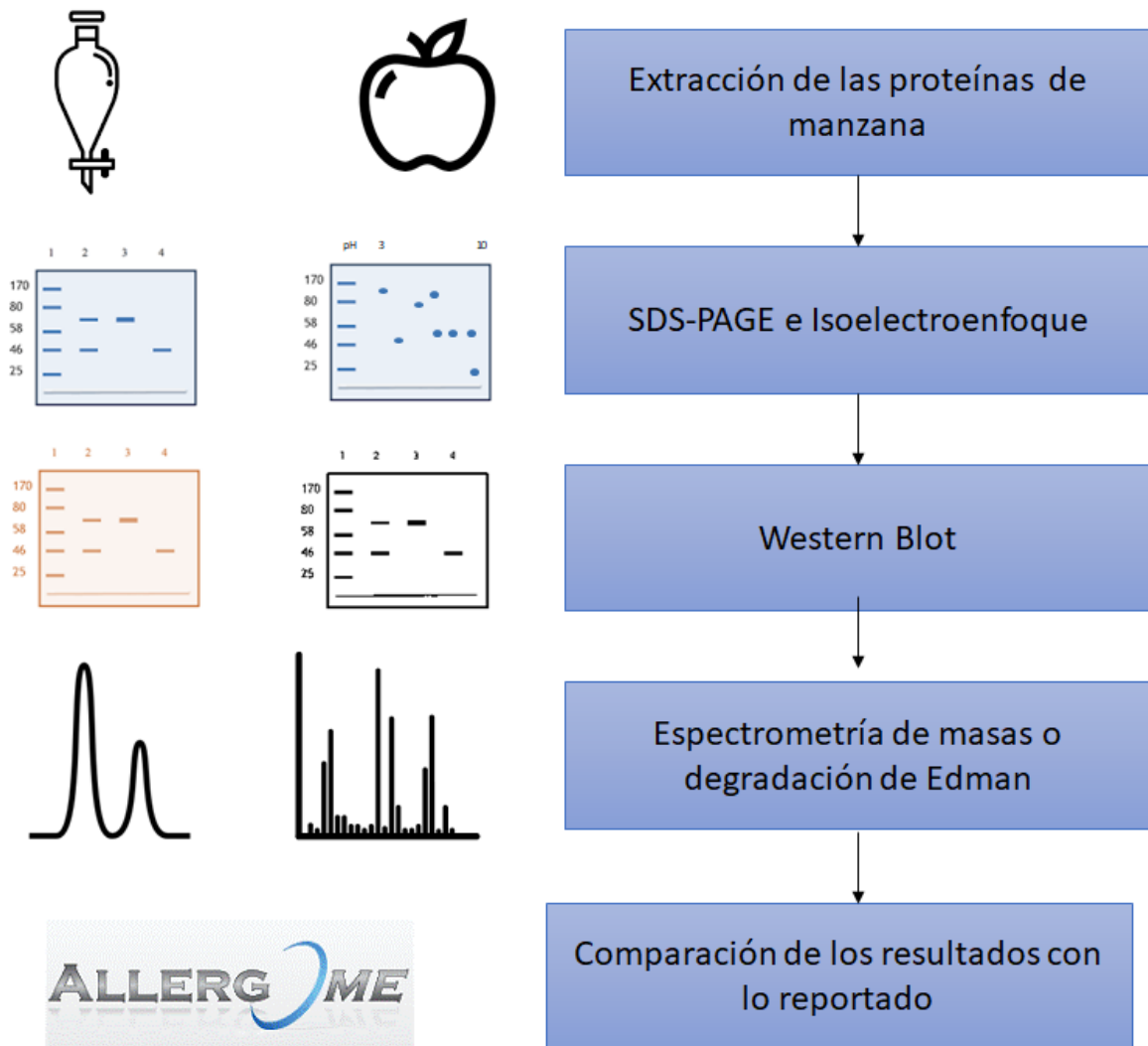


Figura 4. Plan de trabajo para satisfacer los objetivos del proyecto.

### Extracción de proteínas.

Se utilizó un método modificado descrito por Hurkman (Hurkman and Tanaka, 1986). Este método modificado demostró ser útil para la extracción adecuada de proteínas de diversas frutas; las modificaciones fueron realizadas con una estandarización previa al presente proyecto (Delgado Gómez *et al.*, 2018). La figura 5 muestra un esquema representativo del proceso, el cual se enumera a continuación:

1. Retirar la cascará a las manzanas con el pelador.
2. La manzana se corta en cubos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, posteriormente se pesan 100 g de cubos de manzana a los cuales se les adiciona nitrógeno líquido junto con hielo seco a una licuadora, que debe ser accionada inmediatamente, el polvo fino resultante se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 2L y se le adiciona 200 mL del amortiguador de extracción (tabla 1) y se mantiene con agitación suave toda la noche a 4°C.

Tabla 1. Componentes del amortiguador de extracción.

Componente	Cantidad	Función
Sacarosa	30% m/v	Aumentar la densidad de la fase orgánica y se pueda facilitar la extracción de cada una de las fases.
B-mercaptoetanol	5%	Reducir los residuos de cisteína para que la molécula se mantenga en su estado desnaturalizado y pueda migrar fácilmente a la fase orgánica.
Tris-HCl pH 8.0	0.1 M	Ser la fase acuosa que remueve contaminantes de la proteína.

Sodio dodecilsulfato (SDS)	2%	Desnaturalizar a la proteína para facilitar la migración hacia la fase orgánica.
Inhibidores de proteasas	Una tableta	Evitar la degradación de las proteínas de la muestra.

3. Al día siguiente se añaden 200 mL de fenol saturado con Tris al matraz que contiene la manzana pulverizada y el amortiguador de extracción y se mantiene con agitación suave toda la noche a 4°C.
4. Al día siguiente, se debe separar la mezcla del matraz de 2L en tubos con capacidad de 50mL mediante centrifugación a 3220xg durante 25 min a 4°C y se recupera el solvente orgánico (el fenol que tiene un color amarillo) colocándose en un matraz Erlenmeyer de 2L. Después, se le adicionan 5 volúmenes de una solución de acetato de amonio 0.1M en metanol y se mantienen con agitación suave toda la noche a 4°C.
5. Al día siguiente, se divide el contenido del matraz en tubos con capacidad de 50 mL y se centrifuga a 3220xg durante 45 min a 4°C y se recuperan los botones en un sólo tubo con capacidad de 50 mL, se recuperan aproximadamente 5 mL.
6. Se mezclan y dividen esos 5 mL en 20 microtubos de 1.5 mL (se obtiene un total de 20 microtubos).

7. Se hacen dos lavados con 800  $\mu$ L de metanol frío (-20°C) y 3 lavados con 800  $\mu$ L de acetona fría (-20°C) a 8400xg durante 15 min a 4°C.
8. Los tubos se secan en una centrifuga con vacío (speedVac) a temperatura ambiente durante 10 min.
9. Se añaden 400  $\mu$ L de una solución de desoxicolato de sodio al 0.02% a cada tubo, se mezclan apropiadamente y se incuban toda la noche a 4°C.
10. Al día siguiente, se añaden 40  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 100%, se mezclan apropiadamente y se mantienen incubando toda la noche a 4°C.
11. Al día siguiente se centrifugan a 18600xg durante 20 min a 4°C y se lavan dos veces con acetona fría (-20°C),
12. Se secan los microtubos en speedVac a temperatura ambiente durante 10 min.

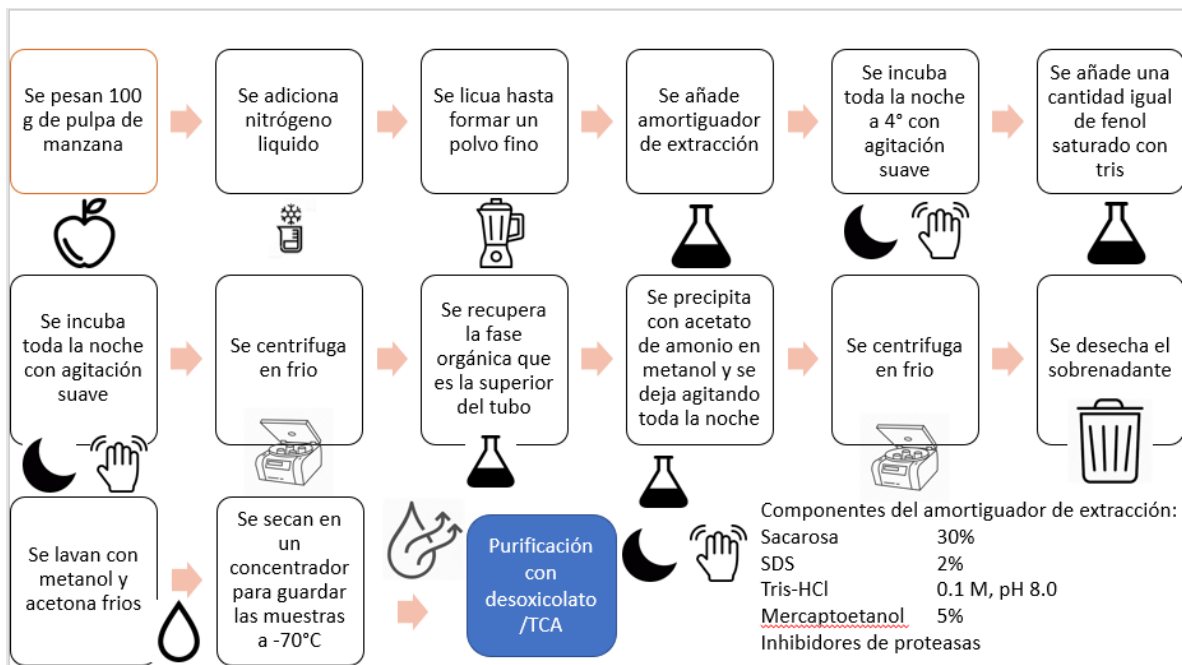


Figura 5. Esquema representativo de la extracción de proteínas de manzana.

## **Electroforesis SDS-PAGE.**

Esta técnica se utilizó para confirmar la presencia y pureza de las proteínas extraídas, así como para confirmar la cantidad de proteínas extraídas de la pulpa de manzana. El método se basa en la desnaturalización de las proteínas y el recorrido a través de una red artificial hecha de acrilamida a diferentes porcentajes. Para poder preparar un gel de acrilamida se utilizan las siguientes sustancias y proporciones:

Tabla 2. Proporciones y soluciones para preparar un gel de acrilamida al 16%.

<b>Solución</b>	<b>16% gel separador</b>	<b>4% gel concentrador</b>
<b>Acrilamida/ bis acrilamida 30% T, 2.67% C</b>	2.7 mL	0.33 mL
<b>Buffer Tris 1.5 M pH 8.8</b>	1.3 mL	X
<b>Buffer Tris 0.5 M pH 6.8</b>	X	0.5 mL
<b>Glicerol 80%</b>	0.812 mL	0.325 mL
<b>Agua destilada</b>	0.188 mL	0.915 mL
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	50 $\mu$ L	20 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L

Mediante la aplicación de un campo eléctrico en una cámara específica para electroforesis, la red creada con el gel de acrilamida limita el paso de las proteínas que se encuentran cargadas con el detergente SDS. Dependiendo del tamaño de

las proteínas migrarán más lento o más rápido, velocidad que se verá reflejada en la distancia que hayan recorrido en un tiempo determinado, las proteínas de menor peso molecular migrarán más rápidamente, y se observan en la parte inferior del gel, mientras que las proteínas de mayor peso molecular tendrán mayor dificultad para migrar y se observarán en la parte superior del gel de acrilamida (Walker, 1996). La figura 6 muestra un esquema sobre esta técnica.

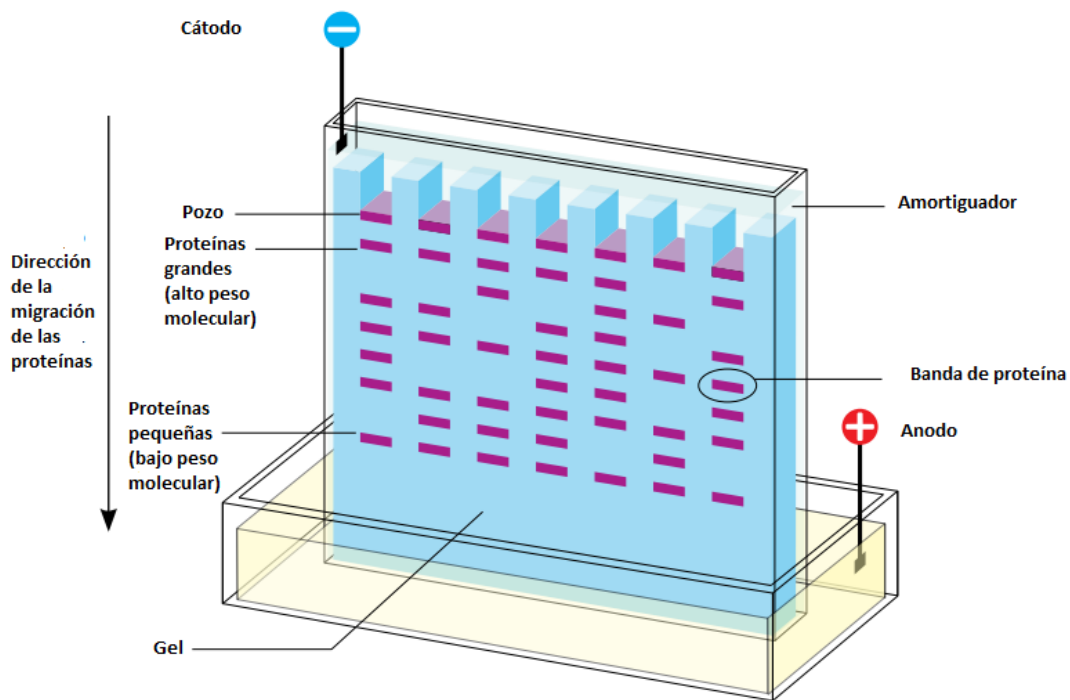


Figura 6. Esquema representativo de la electroforesis de proteínas SDS-PAGE. [Tomado de [https://www.bio-rad.com › literature › Bulletin\\_6040](https://www.bio-rad.com › literature › Bulletin_6040)]

A continuación, se describe el procedimiento para la electroforesis de proteínas de manzana.

1. Se toma un microtubo que contiene proteínas de manzana y se resuspende en 60  $\mu$ L de buffer de lisis recién preparado (Urea 8M, tiourea 2M y SDS 1%).



2. Se sónica en baño hasta que ya no se observa la pastilla de proteínas (1 min aproximadamente).
3. Se prepara el coctel de reactivo añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 4x y 4  $\mu\text{L}$  de DTT 1M al microtubo que contiene el buffer de lisis y las proteínas.
4. Se mezcla con micropipeta y se hierve durante 4 min.
5. Las muestras se centrifugan durante unos segundos y después, se añaden 20  $\mu\text{L}$  a 4 pozos de un gel de acrilamida al 16% con un espesor de 1mm.
6. La electroforesis se corre a 90V constantes durante 30 min y después, a 120 V constantes durante 3h.
7. El gel se libera de los vidrios y se lava 3 veces con agua destilada durante 1 min.
8. Se seca el exceso de agua destilada y se añade al gel una solución de Coomassie coloidal para revelar las proteínas.

### **Isoelectroenfoque.**

Se utiliza para obtener una separación de proteínas adicional a lo observado con un gel SDS-PAGE convencional. El método consiste en dos separaciones continuas aplicadas a las proteínas, que se basan en dos características de las proteínas: el peso molecular y el punto isoeléctrico particular de las proteínas.

La primera dimensión consiste en la separación de proteínas mediante la generación de un gradiente de pH a lo largo de un gel de acrilamida generado por moléculas que se conocen como anfólitos. Al aplicarse un campo eléctrico, las proteínas migran al pH donde tienen carga neutra, este pH es conocido como punto isoeléctrico de las proteínas. La segunda dimensión consiste en la separación por

peso molecular de las proteínas que se encuentran en el gel donde llegaron las proteínas a su punto isoeléctrico. Al finalizar el procedimiento, se obtiene un gel con las proteínas separadas tanto por su punto isoeléctrico como por su peso molecular (figura 7) (Varga and Ceska, 1972).

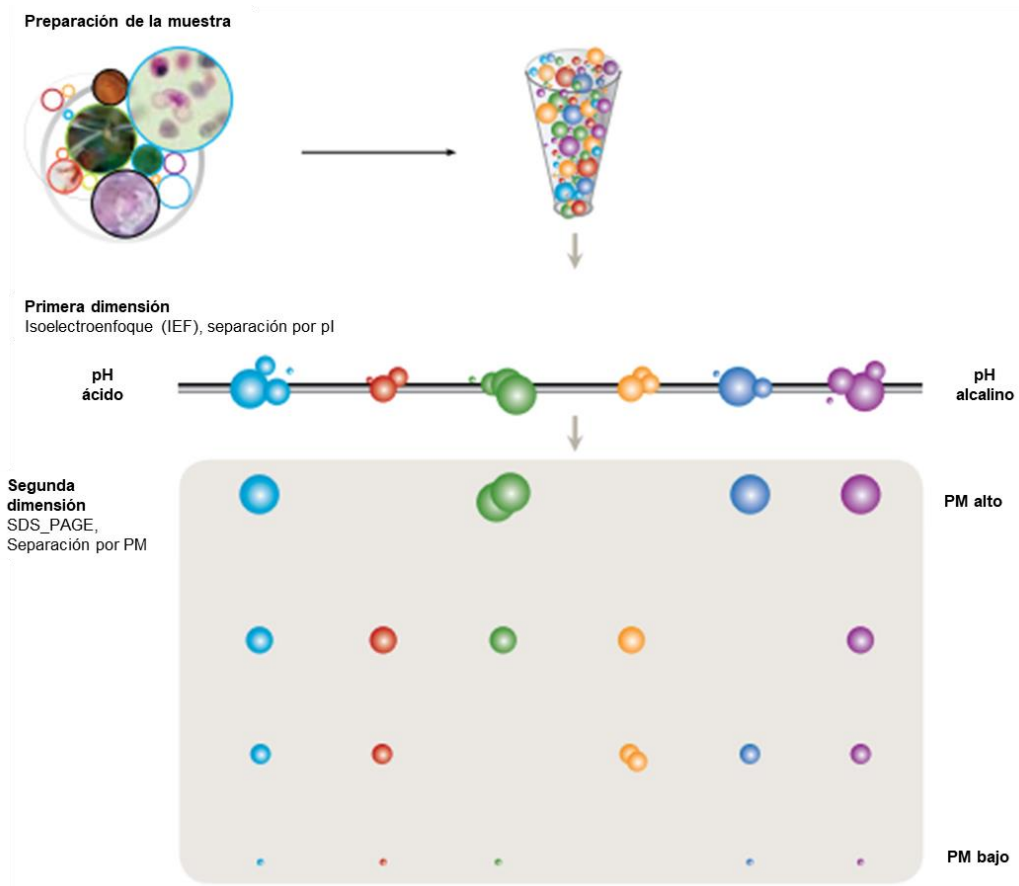


Figura 7. Esquema representativo de la electroforesis de dos dimensiones. [Tomado de [https://www.bio-rad.com › literature › Bulletin\\_2651](https://www.bio-rad.com › literature › Bulletin_2651)]

Para poder separar nuestras proteínas mediante la técnica de electroforesis de dos dimensiones se necesita:

1. Adicionar a una o varias pastillas de proteínas 125  $\mu$ L de buffer de isoelectroenfoco (8M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 2% anfolitos, 65 mM

DTT y 0.002% de azul de bromofenol) y sonicar hasta desaparecer la pastilla de proteínas.

2. Adicionar los 125  $\mu\text{L}$  a un carril de la cámara de isoelectroenfoco y colocar la tira de isoelectroenfoco boca abajo con la finalidad de que la superficie del gel entre en contacto con la solución y la tira absorba las proteínas de la mezcla (figura 8).



Figura 8. Tiras montadas en un equipo de electroforesis de dos dimensiones.

3. Añadir 800  $\mu\text{L}$  de aceite mineral y correr el programa de isoelectroenfoco que es el siguiente.
  - a. Rehidratación 12h a 20°C (PASIVA).
  - b. 250 V durante 20 min Lineal
  - c. 4000 V durante 2h Lineal

- d. 4000 V a 10 000 V durante 2h Rápida
  - e. 500 V 8h rápida (mantenimiento).
- 
4. Sacar la tira y secar el exceso de aceite mineral e incubar en buffer de equilibrio I (Urea 6M, 0.05M Tris, 2% SDS, 30% Glicerol, 65 mM DTT) durante 15 min con agitación suave).
  5. Incubar en buffer de equilibrio II (Urea 6M, 0.05M Tris, 2% SDS, 30% Glicerol, 216 mM Iodoacetamda) durante 15 min con agitación suave.
  6. Incubar en buffer Laemmli de electroforesis (0.025 Tris, 0.192M Glicina 0.1% SDS).
  7. Colocar la tira en un gel de acrilamida al 16% con 13% de glicerol para separar la segunda dimensión de proteínas y con ayuda de un papel filtro colocar el marcador de peso molecular.
  8. Retirar el gel y lavarlo 3 veces con agua destilada durante 1 min.
  9. Revelar con Coomassie coloidal durante toda la noche y desteñir con solución desteñidora (10% Etanol absoluto, 1.4% ácido fosfórico) durante 1h.

### **Transferencia de proteínas.**

Se utiliza para que las proteínas se encuentren depositadas sobre una membrana de PVDF para su posterior utilización en el procedimiento conocido como Western Blot. La técnica consiste en la aplicación de un campo eléctrico para ocasionar la migración de las proteínas de un gel SDS-PAGE o 2D hacia una membrana que puede ser de PVDF o nitrocelulosa. La transferencia se lleva a cabo debido a la diferencia entre el pH del amortiguador de transferencia y la carga de las proteínas

unidas a las moléculas del detergente SDS. Existen dos tipos diferentes de transferencia de proteínas: el sistema semi-húmeda y el húmedo. (Tovey and Baldo, 1989). La figura 9 muestra un esquema representativo de la técnica de transferencia semi-húmeda.

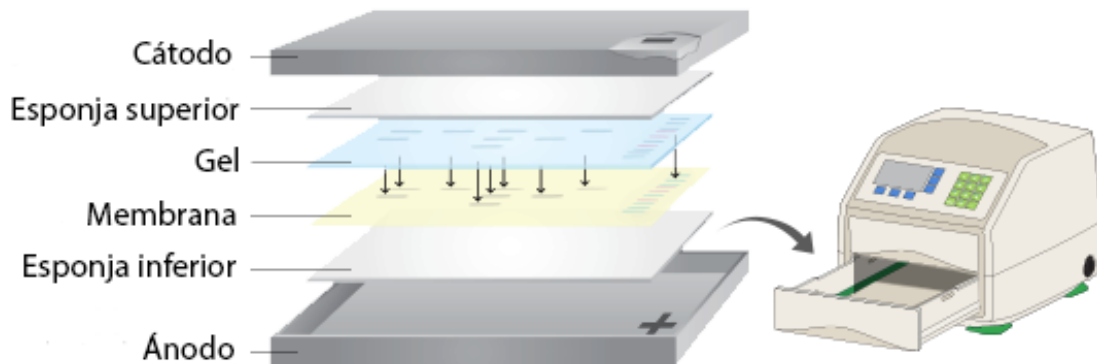


Figura 9. Esquema representativo de la transferencia semi-húmeda de proteínas [Tomado de <https://www.bio-rad.com>].

La transferencia de proteínas se realiza de la siguiente manera:

1. Después de haber corrido un gel de proteínas de manzana, ya sea en una o en dos dimensiones, en vez de adicionar Coomassie coloidal para teñir el gel, se transfiere a un recipiente con buffer de transferencia (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.04% SDS, 20% metanol) y se incuba en conjunto con las esponjas de transferencia, dos pedazos de papel filtro con dimensiones de 8.5 x 6.5 cm y una membrana de PVDF con dimensiones de 8.5 x 6.5 cm durante 12 min con agitación suave.
2. Posteriormente, se coloca la esponja, después papel filtro, después la membrana, luego el gel de acrilamida, después un segundo papel filtro y finalmente la segunda esponja. El sándwich se coloca en el equipo de Trans-blot y se programa para correr a 271 mA durante 30 min.

3. Al finalizar el tiempo, la membrana se tiñe con rojo de Ponceau durante 10 min y se lava con agua destilada para poder observar la eficacia de la transferencia.
4. Se procede a realizar el Western blot.

### Western Blot.

Se utiliza para identificar proteínas mediante la utilización de anticuerpos con una sustancia reportera que permite identificar proteínas de interés. En el caso específico de las alergias alimentarias como la alergia a manzana, esta técnica revela las proteínas de la manzana a los cuales son reactivos los anticuerpos IgE de los pacientes pediátricos mexicanos. La técnica se basa en las uniones específicas que generan los anticuerpos hacia su antígeno (figura 10) (Burnette, 1981).

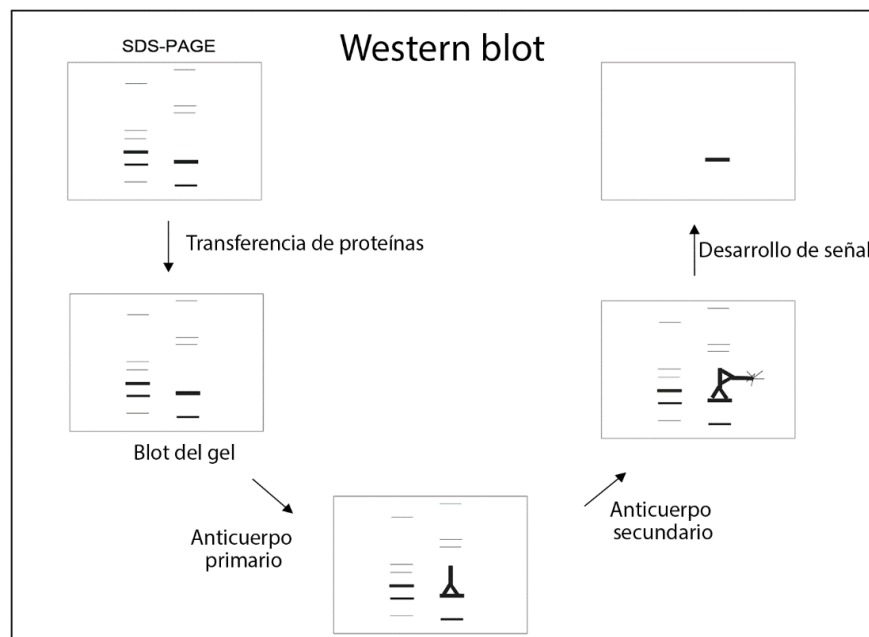


Figura 10. Esquema representativo del análisis Western Blot [tomado de (Kurien and Scofield, 2006)].

El western blot de las proteínas de manzana se realizó de la siguiente manera:

1. La membrana previamente transferida se corta en tiras de aproximadamente 0.5 mm x 8.5 cm, las cuales se colocan en una bandeja con pozos que tiene unas dimensiones aproximadas de 1 cm x 10 cm, con una capacidad aproximada de 1.5 mL. También se utilizó la membrana completa sin cortar.
2. La membrana se incuba con una solución de PBS pH 7.4 con leche descremada al 4.5% durante 2 h con agitación de 120 rpm a 37°C.
3. Posteriormente, la membrana se lava 3 veces con PBS-T al 0.05% durante 5 min cada lavado.
4. Posteriormente, se adiciona el anticuerpo primario (suero de paciente diagnosticado con alergia alimentaria) a una proporción de 1:8 en PBS-T 0.05% y se incuba durante 2h con agitación a 120 rpm/37°C, después, se mantiene toda la noche a 4°C.
5. Al día siguiente, se realizan 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-T al 0.05% y se añade el anticuerpo secundario (Abcam 99806), el cuál es un anticuerpo monoclonal hecho en ratón, en una proporción 1:2000 en PBS-T 0.05% y se incuba durante 2h a 37°C con agitación constante.
6. Al finalizar la incubación realizar 3 lavados de 5 min con PBS-T 0.05% y un último lavado con PBS.
7. Preparar la mezcla de reacción con el reactivo luminol y peróxido de hidrógeno a una proporción de 1:1 y agregar a la membrana colocada sobre acetato y dejar actuar durante 1 min, al finalizar el minuto, remover el exceso y leer en un fotodocumentador (Fusion Fx).

## **Preparación de la muestra de proteínas para el análisis mediante espectrometría de masas.**

Para poder analizar un spot en particular, se utilizó el siguiente protocolo (Martínez-Aguilar and Molloy, 2019).

1. El spot se corta cuidadosamente utilizando una punta de micropipeta.
2. El fragmento de gel se coloca en un microtubo de 1.5 mL.
3. Al tubo se le adicionan 500  $\mu$ L de acetonitrilo al 100% y se incuba durante 5 min. Este proceso se realiza al menos 3 veces.
4. Posteriormente, el solvente se remueve en speed-vac.
5. Las muestras se rehidratan con una solución de tripsina (13 ng/ $\mu$ L) y se mantienen en hielo durante una hora, el volumen es variable, por lo general 120  $\mu$ L son suficientes para cubrir el punto cortado.
6. La solución residual de tripsina se remueve y se reemplaza con bicarbonato de amonio 50 mM con desoxicolato de sodio 0.1%, las muestras se incuban toda la noche a 37°C.
7. Posteriormente, el sobrenadante se transfiere a un tubo de baja retención y se añade solución de extracción de péptidos (desoxicolato de sodio al 0.1%)
8. Los tubos se sonicán durante 10 min, los sobrenadantes se juntan en un tubo de baja retención y se repite la extracción dos veces más con solución de desoxicolato de sodio al 0.1%, juntando todos los sobrenadantes.
9. El extracto final se seca en speed-vac y se almacena a -70°C hasta su análisis mediante espectrometría de masas.



## **Espectrometría de masas.**

Es una herramienta que nos permite medir la masa molecular de un polipéptido, para determinar características estructurales adicionales como la secuencia de aminoácidos, el sitio de anclaje y tipo de modificaciones postraduccionales. Para los fines del presente proyecto, permite la identificación de las principales proteínas alergénicas de los pacientes pediátricos mexicanos. La técnica se basa en la ionización y ruptura de los péptidos o proteínas mediante la aplicación de un voltaje elevado, que son analizados por el equipo. Posteriormente, los perfiles de las proteínas son comparados con diferentes bases de datos que contienen la información de diferentes proteínas registradas, los cuales brindan la información sobre las características de las proteínas analizadas (Cech and Enke, 2001; Domon and Aebersold, 2006).

### Especificaciones de la espectrometría de masas.

Se realizó una colaboración con la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) con el Dr. Juan Francisco Martínez Aguilar. Se utilizó un espectrometro de masas de la marca AB SCIEX Triple TOF 5606 con detector *multichannel plate* con ionización mediante *electrospray* y cromatografía líquida masas masas (LC MS/MS). Para el análisis proteómico por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas se empleó un cromatógrafo de líquidos Eksigent nanoLC 425 con una precolumna ChromXP C18, 350  $\mu\text{m}$  x 0.5 mm x 3 $\mu\text{m}$  y una columna analítica nano ChromXP C18, 75  $\mu\text{m}$  x 15cm x 3  $\mu\text{m}$ . Los péptidos se resuspendieron en disolución de acetonitrilo 2% v/v, ácido fórmico 0.1% v/v en H<sub>2</sub>O milliQ (disolvente A), se cargaron en la precolumna con el disolvente A y se separaron en la columna analítica aumentando gradualmente la

proporción de un disolvente B consistente en acetonitrilo 99.9% v/v, ácido fórmico 0.1% v/v. Se utilizó como método de fragmentación *collisional induced dissociation* (CID) con una energía de colisión máxima de 80V para las cargas de 2+ a 5+ modo de adquisición conocido como [AID-Adquisición Independiente de Datos or DIA-Data-Independent Acquisition] en general utilizado para muestras complejas de proteínas que generan cientos de miles de péptidos tripticos en el cual no se toma en consideración un m/z específico, pero se eleva a MS2 un amplio rango de m/z de MS1, o ADD- Adquisición Dependente de Datos or DDA Data-dependent Acquisition o] donde se lleva a MS2 un m/z a la vez] en el cual se toman como parámetros para el escaneo MS1, iones de 400-1250 m/z que sean superiores a las 200 cuentas por segundo (cps) y un tiempo de acumulación de 250 ms. Para el MS2 se toma el top 20 con los estados de carga de 2+ a 5+ de los iones de 100-1800 m/z con un tiempo de acumulación de 50 ms, así como una exclusión dinámica por 30s y una tolerancia de masas de 100 ppm.

La identificación de proteínas se llevó a cabo por búsqueda en base de datos con el software ProteinPilot 5.0.1 de AB Sciex. Las proteínas identificadas tienen un nivel de confianza de identificación mayor o igual a 99%.

## Resultados.

### **Población.**

Se cuenta con un total de 26 pacientes con diagnóstico de alergia a frutas y 12 controles para descartar falsos positivos. Lo anterior se obtuvo a través de la colaboración con el Servicio de Alergias del Instituto Nacional de Pediatría INP para

el diagnóstico y la toma de muestra del suero de los pacientes con alergia a frutas. Para las muestras control, nos apoyamos de la colaboración con el Servicio de Ortopedia del INP debido a la poca probabilidad de que lleguen a presentar la morbilidad denominada como alergia alimentaria.

Los criterios de inclusión involucran a pacientes de cualquier género con diagnóstico clínico de alergia relacionada a la manzana que cuente con consentimiento o asentimiento informado.

Los criterios de exclusión involucran a pacientes con inmunosupresión, pacientes con alergias inespecíficas y pacientes con alguna comorbilidad que contraindique la realización de alguno de los procedimientos diagnósticos.

Las tablas 3 y 4 muestran las características de la población alérgica a frutas.

Tabla 3. Características de la población total de pacientes alérgicos a frutas. Atopía se refiere si el paciente tiene o no familiares de primer grado con diagnóstico de alergia. F, femenino; M, masculino; M, manzana; PI, Plátano; D, durazno; Pe, pera; R, rinitis; C, conjuntivitis; A, asma; D, dermatitis; Le, leve; Mo, moderado; Gr, grave.

CÓDIGO	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10	FP11	FP12	FP13	FP14
GÉNERO	F	F	M	F	F	F	M	M	M	F	F	M	F	M
EDAD (AÑOS)	15	14	14	15	11	10	11	15	15	8	3	12	8	15
ATOPIA	SÍ	NO	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
RETO ORAL		M PI			D			D M	M	M		M PI D Pe	D Pe	M
PRUEBAS CUTÁNEAS				D	D			M Pe D	M				Pe	M
ENFERMEDADES ALÉRGICAS		R A	R A	C	R		R	R A	D	R	R D		C R	

MANIFESTACIONES ASOCIADAS A LA ALERGIA	Le	Le	Le	Le	Le	Le	Le	Le	Le	Le	Le		Mo	Mo	Le
--	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	--	----	----	----

La tabla 3 muestra las características de la población de estudio, los primeros 13 pacientes obtenidos con diferentes características, como son el género, edad y atopía. Este último dato es importante porque incrementa la probabilidad del paciente de desarrollar una alergia a lo largo de su vida, las pruebas de reto oral y cutáneas positivas, así como las enfermedades alérgicas y el grado de severidad de las manifestaciones asociadas a la alergia.

CÓDIGO	FP13	FP14	FP15	FP16	FP17	FP18	FP19	FP20	FP21	FP22	FP23	FP24	FP25	FP26
SEXO	F	M	F	M	F	F	M	M	M	F	M	M	M	F
EDAD (años)	8	15	16	15	10	16	13	14	10	16	12	15	6	11
ANTECEDENTES DE ATOPIA	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	SÍ
RETO ORAL	D Pe	M		PI	M D Pe	PI		M	M D	M PI D Pe		M	D	M PI D Pe
PRUEBAS CUTÁNEAS	Pe	M				PI	M Pe	M	M D	M PI D Pe				

ENFERMEDADES ALÉRGICAS	C R		C	C R D	R	R A D	R D	C R D	R	C R A D		R D	C R	C R D
MANIFESTACIONES ASOCIADAS A LA ALERGIA	Mo	Le	Le	Le	Le	Le	Ge	Le	Le	Le		Le	Le	Mo

Tabla 4. Características de la población total de pacientes alérgicos a frutas. F, femenino; M, masculino; M, manzana; Pl, Plátano; D, durazno; Pe, pera; R, rinitis; C, conjuntivitis; A, asma; D, dermatitis; Le, leve; Mo, moderado; Gr, grave.

La tabla 4 es la continuación de los siguientes 13 pacientes obtenidos con la descripción de las mismas características de la tabla 1.

Existen valores en blanco dentro de la tabla correspondiente a valores extraviados o no anotados, sin embargo, se conoce que los pacientes enviados tienen un diagnóstico clínico a alguna de las frutas; manzana, plátano, durazno y pera.

#### Características de la población.

Se presenta una serie de figuras donde se muestra en porcentajes los valores de la tabla 3 y 4.

La tabla 5 muestra el género y los antecedentes de atopía de la población y entendemos por atopía como un conjunto de enfermedades que se producen con la enfermedad alérgica que incluyen a la dermatitis atópica, la alergia alimentaria, la rinitis alérgica y el asma alérgica, y en la que los niños que presentan una de ellas tienen una elevada probabilidad de desarrollar alguna de las otras. Adicionalmente, los antecedentes familiares de enfermedad atópica incrementan substancialmente el riesgo de desarrollar alguna enfermedad atópica. La propensión a la atopía es hereditaria, si ambos padres tienen una enfermedad atópica hay una probabilidad

del 40% de que su descendencia tenga una enfermedad atópica (Stepanovic *et al.*, 2019). Este dato incrementa las posibilidades de un diagnóstico certero de alergia.

Tabla 5. Características de la población del estudio en cuanto al género y a los antecedentes de atopía.

Características de la población	
Sexo	
Masculino	50%
Femenino	50%
Antecedentes de Atopia	
Sí	77%
No	23%

En la figura 11 podemos ver las edades de los pacientes pediátricos a los que se les tomó la muestra de suero. Como se puede visualizar, la mayoría tienen una edad de entre 12 y 18 años, sin embargo, también hay pacientes de una edad menor a los 10 años. Esta información es de relevancia porque se considera la edad de 5 años como la ideal para iniciar un tratamiento con inmunoterapia y tiene un mejor pronóstico en el tratamiento con algún tipo de inmunoterapia (Finegold, 2007; Ridolo *et al.*, 2017; Arasi *et al.*, 2018; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2020).

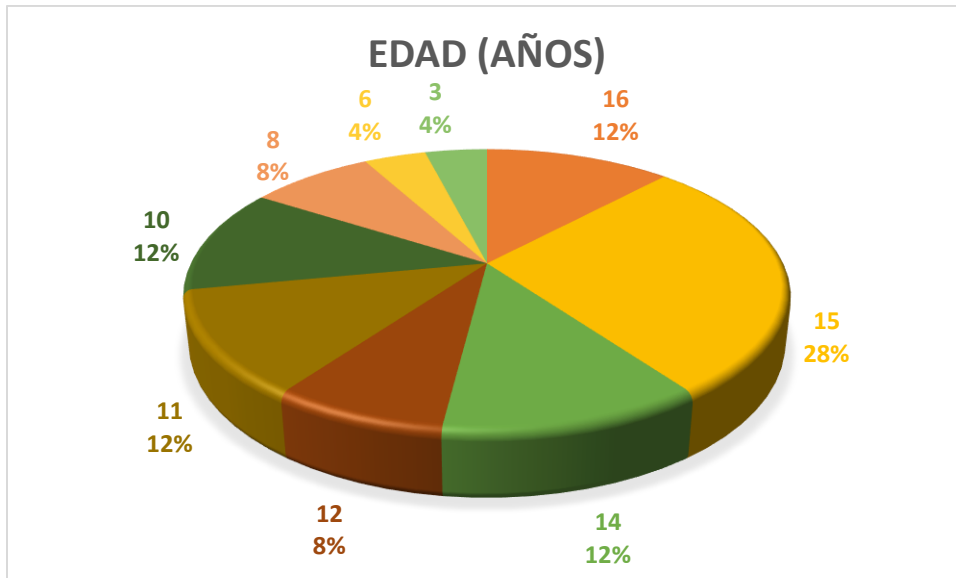


Figura 11. Porcentaje de la edad de los diferentes pacientes en la población de estudio.

La figura 12 nos muestra los resultados de la pruebas cutáneas que se les realizó a los pacientes con alergia alimentaria diagnosticada, podemos apreciar que en su mayoría son alérgicos a la manzana, seguido del durazno, pera y plátano.



Figura 12. Porcentaje de pacientes que cuentan con el análisis de prueba cutánea a las frutas de estudio.

La figura 13 muestra el porcentaje de pacientes que tienen una prueba de reto oral positiva a los diferentes alimentos a los que fueron sometidos, se observa un porcentaje mayor de alergia de reto oral a la manzana, seguido del durazno, después el plátano y finalmente la pera.

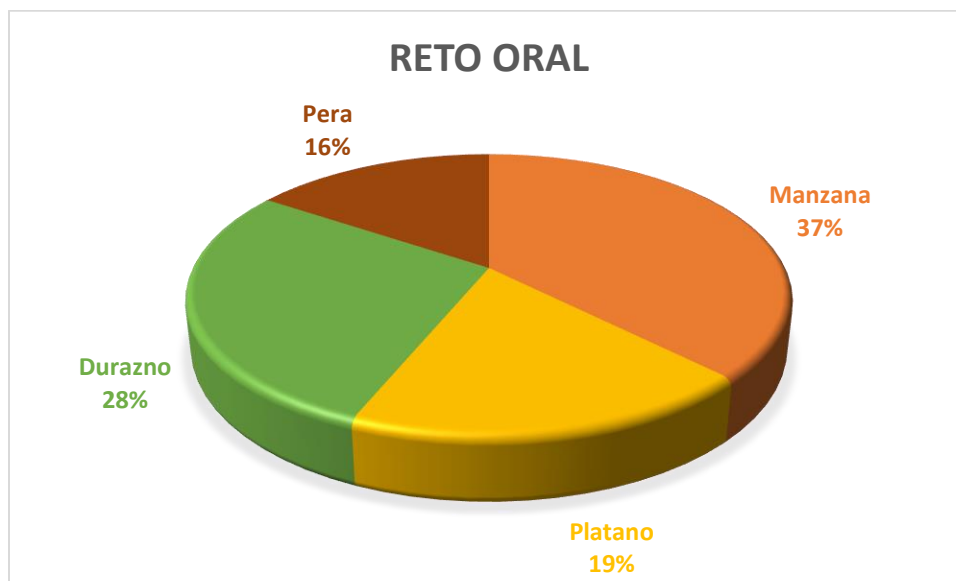


Figura 13. Porcentaje de pacientes dentro de la población que cuentan con un resultado positivo a la prueba de reto oral a las frutas que se muestran en la figura.

La figura 14 nos muestra la variación de las enfermedades alérgicas encontradas en nuestra población de estudio. Como se puede observar, la alergia alimentaria no se encuentra aislada a producir una reacción adversa conocida como el síndrome de alergia oral, esto debido a la compleja conexión entre los alérgenos provenientes de las frutas y otros alérgenos provenientes de otro sitios como puede ser principalmente los pólenes, otros alimentos, los ácaros, etc. Podemos observar que en su mayoría la población pediátrica estudiada presenta rinitis alérgica, seguido de dermatitis atópica, después conjuntivitis alérgica y finalmente asma alérgica.



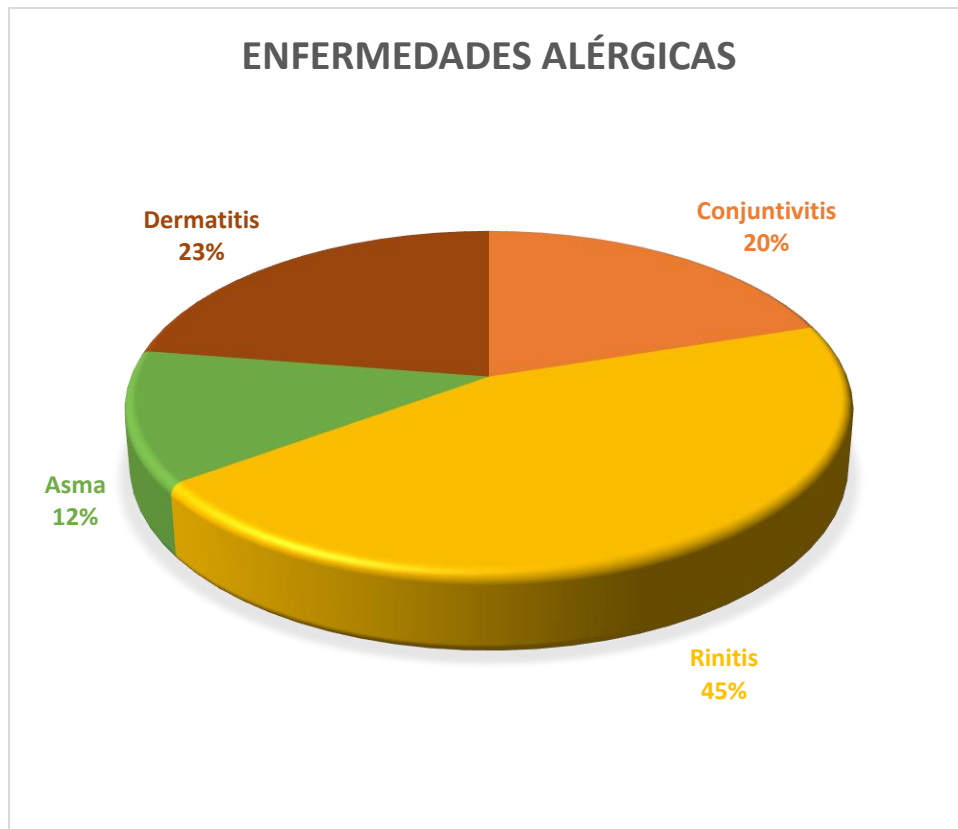


Figura 14. Porcentajes de manifestaciones clínicas dentro de la población de estudio.

La figura 15 nos muestra el grado de severidad de la alergia presentada por los pacientes de nuestra población pediátrica según fue diagnosticada y valorada por su médico alergólogo. Como podemos observar, la mayoría de los pacientes presentan un grado leve de alergia alimentaria, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se hayan presentado casos moderados y hasta graves de alergia alimentaria.



Figura 15. Severidad de las manifestaciones alérgicas en la población de estudio.

#### **Extracción de proteínas.**

La figura 16 muestra la efectividad de la extracción de proteínas de manzana. En el gel se observan proteínas con diferentes pesos moleculares, se observa mayor abundancia de proteínas con un peso molecular dentro del intervalo de 30 a 200 kDa, sin embargo, se alcanzan a percibir proteínas con un peso molecular de 6.8 a 30 kDa a pesar de encontrarse en una menor proporción.

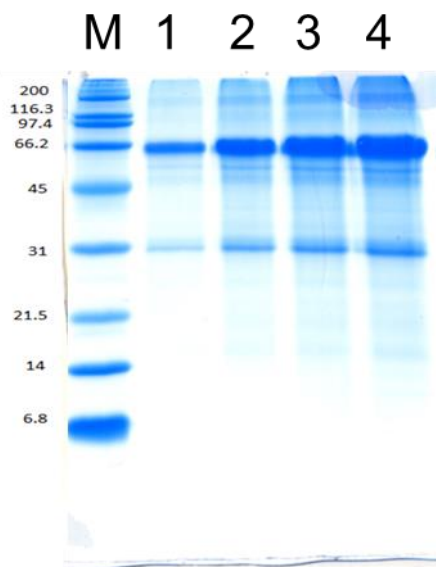


Figura 16. Gel de acrilamida al 16% con una pastilla de proteínas solubilizada; carril 1 (2 µL de una pastilla solubilizada con 60 µL de buffer de lisis), carril 2 (5 µL de una pastilla solubilizada con 60 µL de buffer de lisis), carril 3 (7 µL de una pastilla solubilizada con 60 µL de buffer de lisis) y carril 4 (10 µL de una pastilla solubilizada con 60 µL de buffer de lisis), M (marcador de peso molecular).

Cada carril representa una cantidad diferente de proteínas, se decide trabajar con la condición del carril cuatro por considerarlo suficiente para la realización de las pruebas mediante el ensayo con Western Blot.

### **Utilización del $r_f$ para calcular la masa aproximada de las bandas de proteínas.**

Para poder determinar la masa aproximada de las proteínas identificadas mediante western blot, se utiliza el cálculo del  $r_f$  y la relación que posee con la masa de las proteínas. El método consiste en hacer una curva de calibración mediante la medida de la distancia que ha recorrido la banda y su relación que existe con el frente de la corrida, este cociente es conocido como  $r_f$ , el cuál es graficado en contra del Ln del peso molecular de las proteínas que se utilizan como referencia.

La gráfica da como resultado una ecuación de la recta que nos permite interpolar valores de  $r_f$  dentro del mismo gel para poder obtener un valor aproximado del peso molecular de las bandas encontradas.

Cálculo del peso molecular aproximado de estándares internos mediante el método del  $r_f$ .

Se procedió a probar la efectividad del método sobre unas bandas de proteínas elegidas por su intensidad y definición en el gel de una dimensión (figura 16). Los pesos moleculares de la figura 18 se calcularon a partir de la curva de calibración de la figura 17, en donde se muestra una calibración adecuada para los pesos moleculares que van desde los 14.4 hasta 66.2 kDa; este fue el intervalo de confianza donde los valores de  $r_f$  que se quieran obtener son confiables, pues se trata de una interpolación y no una extrapolación.

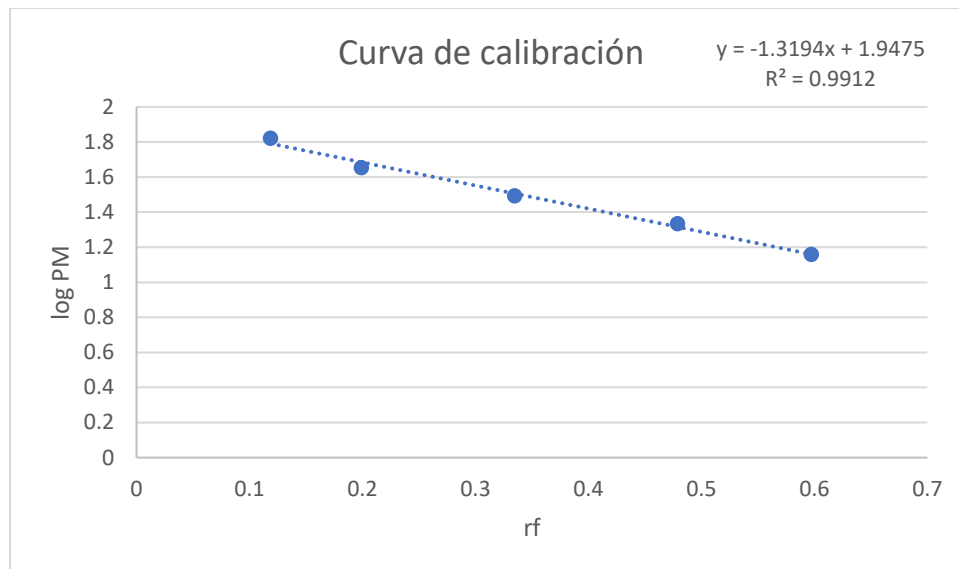


Figura 17. Curva de calibración que muestra el  $r_f$  de las bandas de proteínas del estándar broadrange de biorad contra su peso molecular conocido.

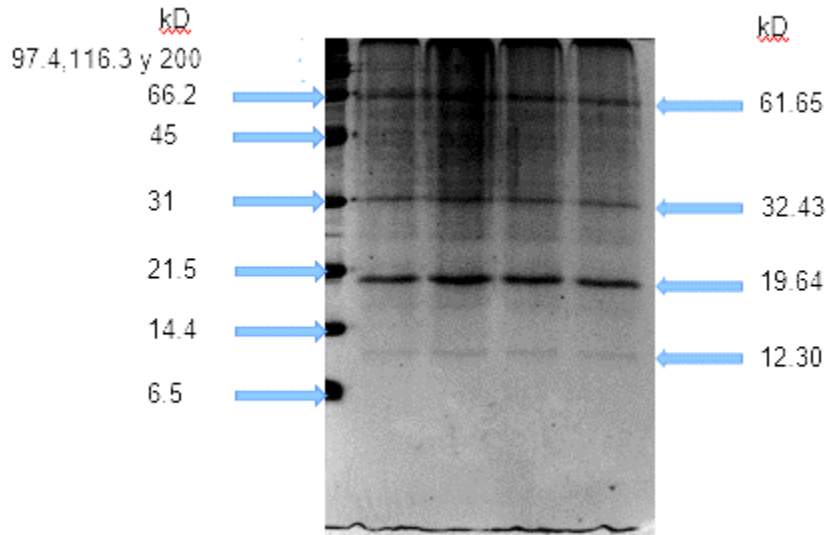


Figura 18. Gel de acrilamida al 16% y 13% de glicerol donde se muestran los pesos moleculares aproximados mediante el uso de la curva de calibración con rf.

En la figura 18 se observa el método aplicado a los “estándares internos de la muestra de proteínas de manzana. Como se puede observar, los valores presentados con los estándares internos y la comparación con el marcador de peso molecular es coherente, lo que nos permite utilizar la técnica dentro de nuestros experimentos de Western blot.

### Transferencia de proteínas.

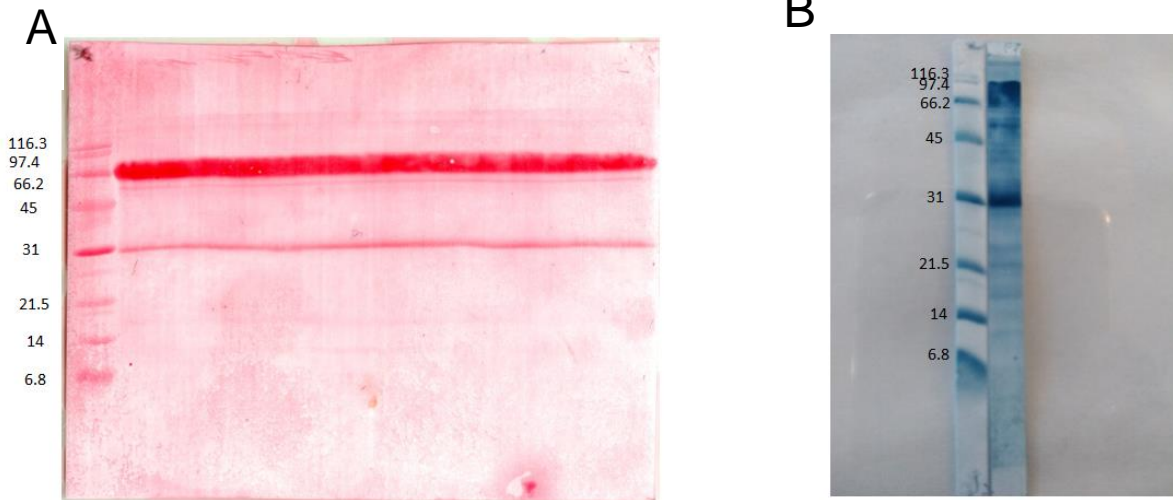


Figura 19. Transferencia de proteínas de la pulpa de la manzana hacia una membrana de PVDF teñidas con rojo de Ponceau (A) y Amido black (B).

La figura 19 muestra dos transferencias realizadas sobre membranas de PVDF. La membrana teñida con rojo de Ponceau (figura 19A), muestra que se han transferido proteínas tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular, que confirman la correcta transferencia de proteínas de la pulpa de la manzana a la membrana de PVDF. La figura 19B muestra una transferencia teñida con amido black, que también confirma la presencia de proteínas en la membrana de PVDF.

La figura 20 muestra dos geles de acrilamida donde se muestra la eficiencia de la transferencia de proteínas, se observa que en el gel que no se transfirió (figura 20A) presentó mayor cantidad de proteínas que el posterior a la transferencia (figura 20B), confirmando la eficacia de la transferencia de proteínas mediante el sistema semi-húmedo.

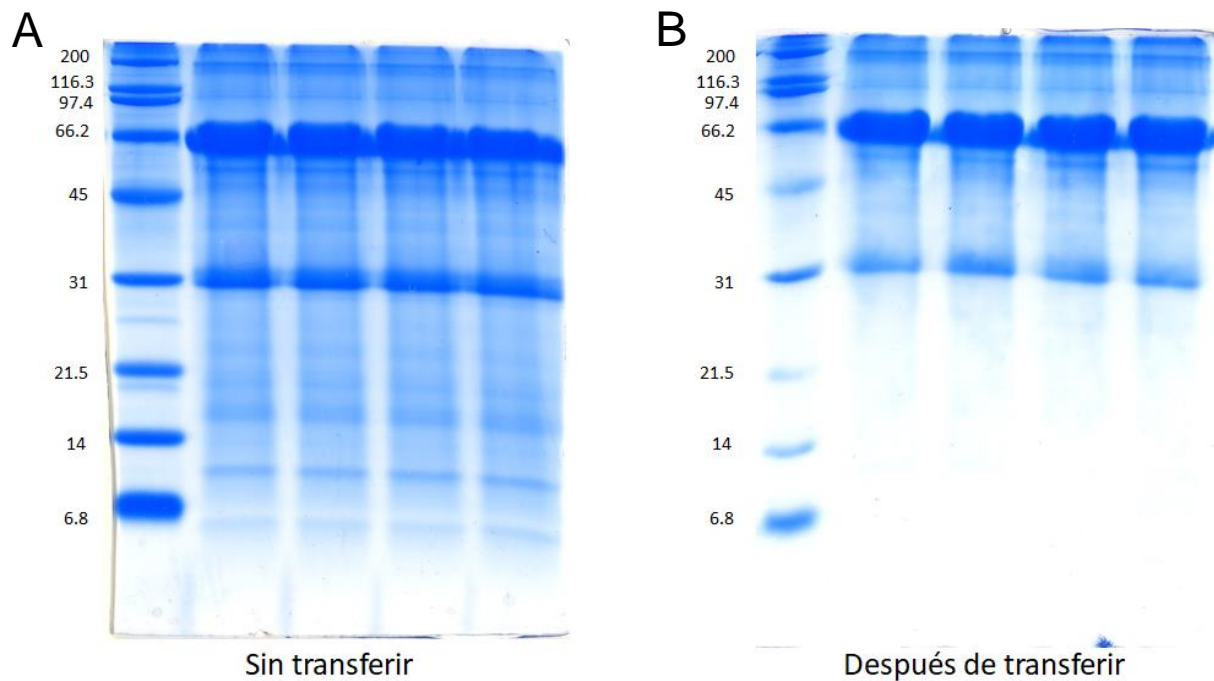


Figura 20. Geles SDS-PAGE antes (A) y después (B) de realizar el método de transferencia de proteínas. Geles de acrilamida al 16% con 13% de glicerol. Transferencia semiseca a 271 mA durante 30 minutos.

## Western blot.

Se realizó un ensayo de Western Blot con los sueros de los pacientes con diagnóstico de alergia a frutas (manzana, plátano, pera o durazno) con el objetivo de poder encontrar proteínas responsables de la alergia a frutas. Se obtuvieron complejos de antígeno-anticuerpo con pesos moleculares descritos en la tabla. En las figuras 21, 22 y 23 se observan proteínas de alto y bajo peso molecular encontrados en los sueros de los pacientes.

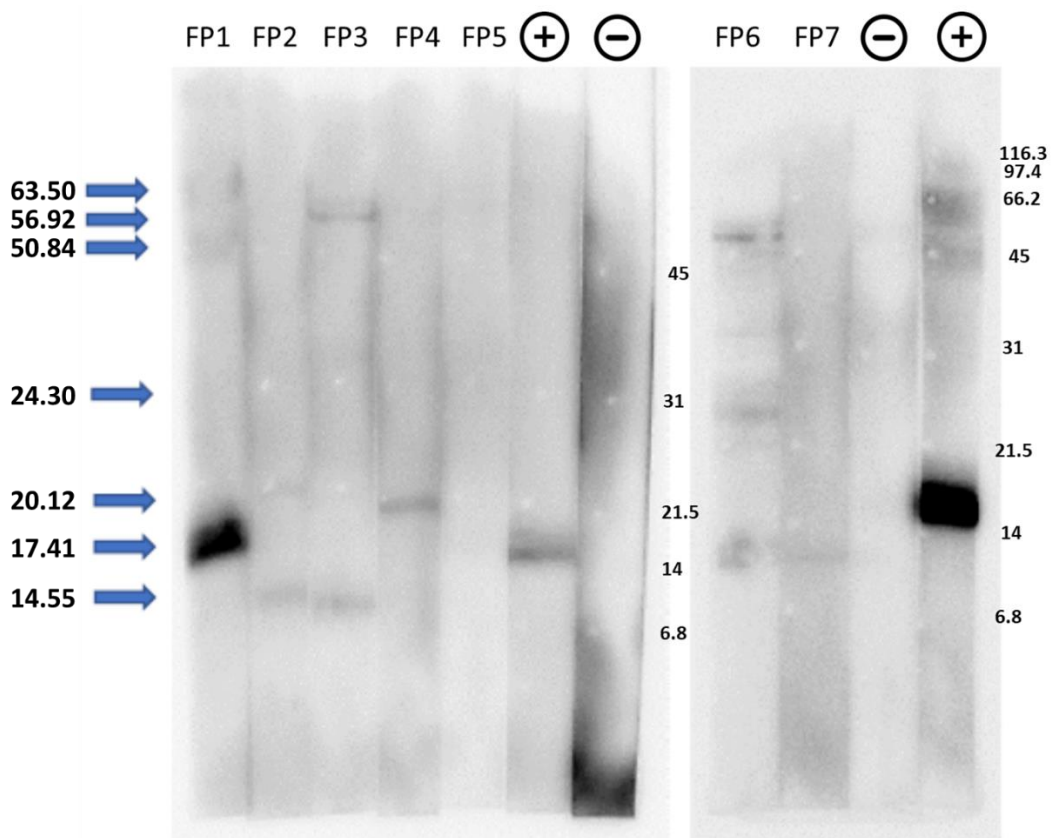


Figura 21. Western Blot realizado a los seis primeros pacientes con diagnóstico de alergia a frutas. El carril con el signo de (+) es el control positivo que es un paciente con alergia demostrada con anterioridad a las proteínas de manzana (FP18) y el carril con el signo de (-) es el control negativo que es un paciente sin antecedentes de alergia a alguna fruta. Cada carril con la denominación FPX representa una tira con proteínas de manzana que fue retado al suero del paciente FPX, los datos sobre los pacientes se encuentran en la tabla que se encuentra en material y métodos.

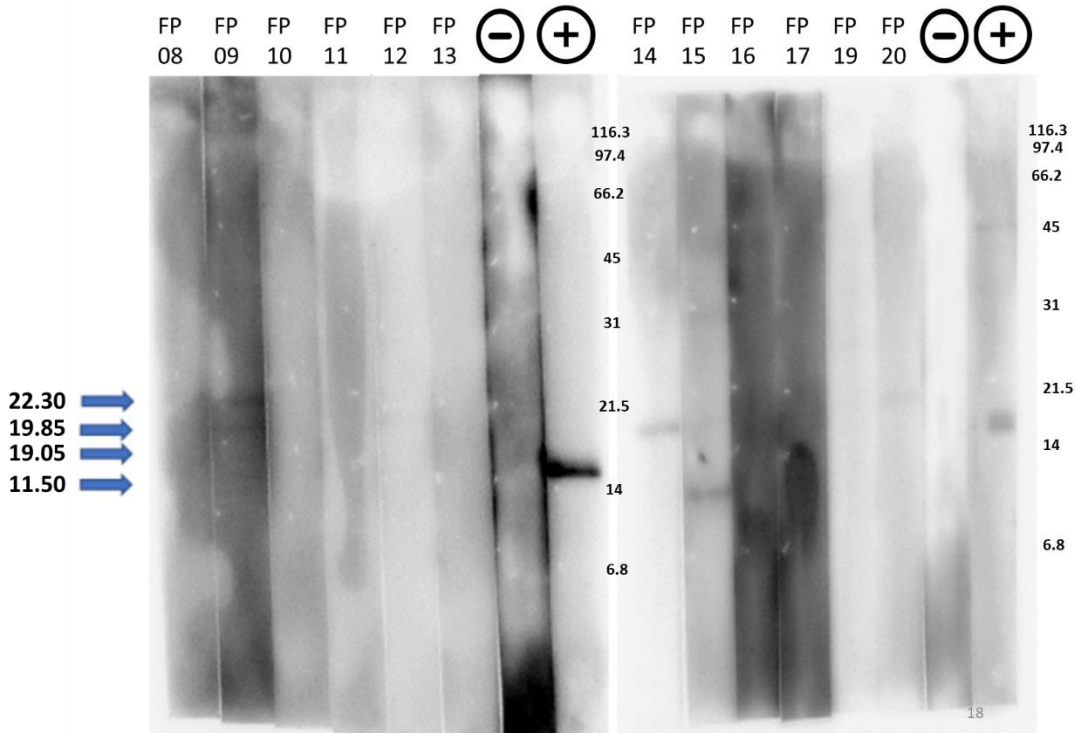


Figura 22. Western Blot realizado a los seis primeros pacientes con diagnóstico de alergia a frutas. El control positivo es un paciente con alergia demostrada a las proteínas de manzana (FP18) y el control negativo es un paciente sin antecedentes de alergia a alguna fruta.

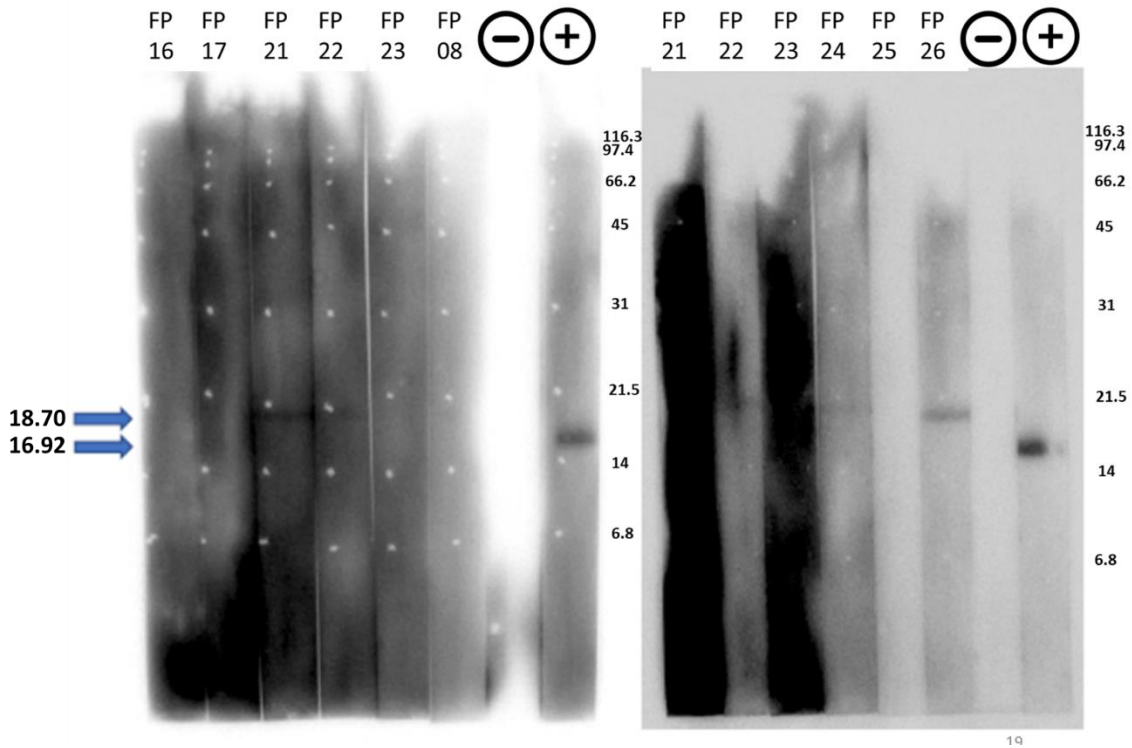


Figura 23. Western Blot realizado a los seis primeros pacientes con diagnóstico de alergia a frutas. El control positivo es un paciente con alergia demostrada con anterioridad a las proteínas de manzana (FP18) y el control negativo es un paciente sin antecedentes de alergia a alguna fruta.



La figura 23 muestra una repetición de pacientes a los que se tenía duda por haber salido muy sucios en el primer análisis, en donde podemos observar que los pacientes FP21, FP22, FP24 y FP26 con diagnóstico clínico de alergia, presentan bandas con un peso molecular de 18.7 kDa. En los pacientes FP2, FP3, FP6, FP7 y FP15, se observa una banda con un peso molecular aproximado de 11.5 kDa. Los pacientes FP1 y FP19 presentan bandas de complejos antígeno-anticuerpo con un peso molecular de 63.50 y 60.143 kDa. Los pacientes FP1 y FP6 presentan bandas de proteínas inmunoreactivas con un peso molecular de 50.84 kDa. Los pacientes FP6 y FP9 presentan bandas con un peso molecular de 24.3 kDa. En las muestras de los pacientes FP4, FP9, FP14, FP21, FP22, FP24 y FP26, se observa una banda de complejo proteína-anticuerpo con un peso molecular de 18.7 kDa. Finalmente, en las muestras FP2, FP3, FP6, FP7 Y FP15 se observa una banda con un peso molecular de 11.41 kDa.

Tabla 6. Peso molecular de las principales bandas de complejo proteína-anticuerpo. M, manzana; PI, plátano.

kDa (WB)	Paciente	Diagnóstico
63.50	FP1 y FP19	M, PI
60.22	FP1 y FP19	M, PI
50.84	FP1 y FP6	M, PI
24.30	FP6 y FP9	M, PI
18.70	FP4, FP9, FP14, FP21, FP22, FP24 y FP26	M, D
16.53	FP1, FP19	M, PI
11.50	FP2, FP3, FP6, FP7 y FP15	M

La tabla 6 resume los complejos de antígeno-anticuerpo encontrados en cada paciente con diagnóstico de alergia a frutas en el estudio de western blot de una dimensión.

### **Espectrometría de masas.**

Se realiza una nueva extracción de proteínas la cual es sometida a un proceso de electroforesis de dos dimensiones con la finalidad de separar mediante peso molecular y punto isoeléctrico las proteínas inmunorreactivas identificadas en el western blot con los sueros de los pacientes realizado en geles de una dimensión y así tener un parámetro extra para la identificación mediante espectrometría de masas utilizando un pool de los pacientes de la tabla 6 (FP1, FP19, FP4, FP9, FP14, FP21, FP22, FP24 y FP26) y conseguir identificar de con mayor precisión las proteínas con peso molecular de 18.433 y 16.501 kDa, obteniendo los siguientes resultados.

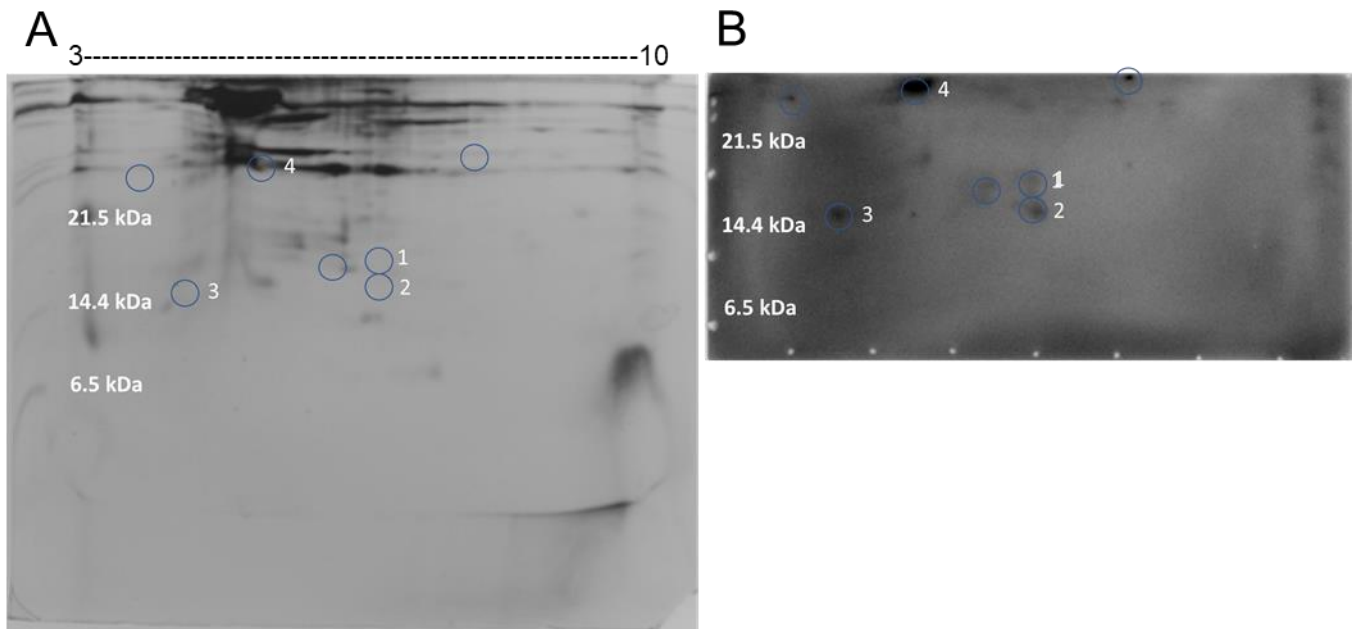


Figura 24. Gel y Western blot 2D de las proteínas extraídas de la manzana. A. Gel de dos dimensiones teñido con Coomassie coloidal, se observan en círculos azules posibles proteínas alergénicas comparadas con el Western blot. B. Western blot de las proteínas inmunorreactivas utilizando un pool de pacientes con un diagnóstico y confirmación mediante western blot de una dimensión de alergia a manzana.

Se deciden tomar los puntos encerrados en un círculo azul debido al peso molecular que tienen y los resultados obtenidos en el análisis del western blot.

Mediante el análisis de espectrometría de masas realizado a los puntos que se obtuvieron mediante el análisis con western blot, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Proteínas encontradas mediante el análisis de espectrometría de masas.

Spot	Proteína	Código de Uniprot	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
1	Mal d 1.02	Q9S7M5	17.54	5.62
2	<i>Nucleoside-diphosphate kinase</i>	A0A498JEZ2	15.27	6.74
3	Uncharacterized protein 1	A0A498HLF4	12.04	4.21
4	Glutathione Transferase	A0A498HW70	27	5.33

El primer spot muestra una proteína ya identificada con anterioridad en las alergias producidas por la manzana denominada como Mal d 1.02 (Q9S7M5) que tiene un peso molecular de 17.54 kDa y un punto isoeléctrico de 5.62 que empata con los datos encontrados en el gel de dos dimensiones, lo que indica que parte de nuestra población es sensible a dicha proteína. El segundo spot muestra una proteína denominada como *nucleoside diphosphate kinase* (A0A498JEZ2) que tiene un peso molecular de 15.27 kDa y un punto isoeléctrico de 6.74. El tercer spot muestra una proteína sin caracterizar (A0A498HLF4) que tiene un peso molecular de 12.04 kDa y un punto isoeléctrico de 4.21.

El cuarto spot muestra una proteína conocida como glutathione transferase (A0A498HW70) que tiene un peso molecular de 27 kDa y un punto isoeléctrico de 5.33.

**Análisis bioinformático de las proteínas de manzana identificadas como posibles nuevos alérgenos.**

Spot 1 Mal d 1.02 (Q9S7M5)

Es una proteína ya identificada previamente en manzana y reconocida como alergeno por la base de datos allergome.com. La figura 25 muestra el espectro de masas obtenido de la proteína y la figura 26 un alineamiento de uno de los péptidos obtenidos con la secuencia de la proteína Mal d 1.02.

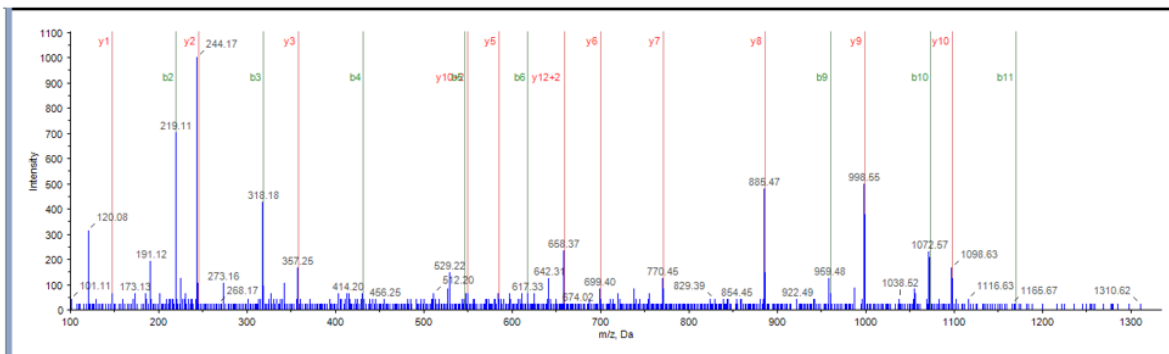


Figura 25. Espectro de masas del Spot 1, Mal d 1.02

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

9S7M5_MALDO_Mal_d_1.02      MGYYTFENEYTS EIPPPRLF KAFVLDADNLI PKIAPQAIKHA EILEGGPGTIKKITFG      60
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida  -----AFVLDADNLI PK-----
                                     *****

9S7M5_MALDO_Mal_d_1.02      EGSQYGVYKHKIDS VDEANYSYAYTLIEGDALTD TIEKVSYETKLVASGSGSIIKSISHY      120
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida  -----

9S7M5_MALDO_Mal_d_1.02      HTKGDVEIKEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLKGH PDAYN      159
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida  -----

```

Figura 26. Alineamiento de uno de los péptidos obtenidos mediante proteinpilot utilizando como referencia la base de datos de Uniprot.org, y el servicio de alineamiento en línea de ClustalOmega.

La figura 27 muestra el alineamiento realizado con la proteína proveniente del polen de abedul Bet v 1, como se puede observar en la figura ambas proteínas guardan una estrecha relación en cuanto al tipo de aminoácidos que los componen.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

tr|Q957M5|Q957M5_MALDO      NGVYTFENEYTS EIPPRLF<AFVLDADN LIPKIAPQAIKHAEILEGDGGPGTIKKITFG      60
tr|O23751|O23751_BETPN     NGVFN YETETTSVIP AARLF<AFILDGDN LVPKVAPQAISSVENIEGNGGGPGTIKKINFP     60
***.:*.* ** *# *****:*.**:*:**:**. . * :**:*:**:**. *

tr|Q957M5|Q957M5_MALDO      EGSQYGYVKHKIDS VDEANYSYAYTLIEGDALTD TIEKVS YET<LVASGSG-SIIKSISH      119
tr|O23751|O23751_BETPN     EGFPFKYVKDRVDEVDHTNF<YNYSVIEGGPVGDTLEKISNEI<IVATPDGGCVLKISN<      120
** : ***.:.:*.**.:*.* **:*:**. : **:*:** * *:*:**. . * .:.:* .:

tr|Q957M5|Q957M5_MALDO      YHTKGDVEI<EEHVKAGKEKAHGLF<LIESYLKGHPDAYN      159
tr|O23751|O23751_BETPN     YHTKGNHEV<AEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYN      160
*****: *:* *:*:**. ** .. *.: :***** . * *****

```

Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Mal d 1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína Bet v 1. Los asteriscos indican el mismo residuo, mientras que los dobles puntos indican un grado de conservación elevado en cuanto a sus propiedades con un valor mayor a 0.5 en la matriz PAM 250. El punto indica un grado de conservación bajo en cuanto a sus propiedades con un valor menor o igual a 0.5 en la matriz PAM 250.

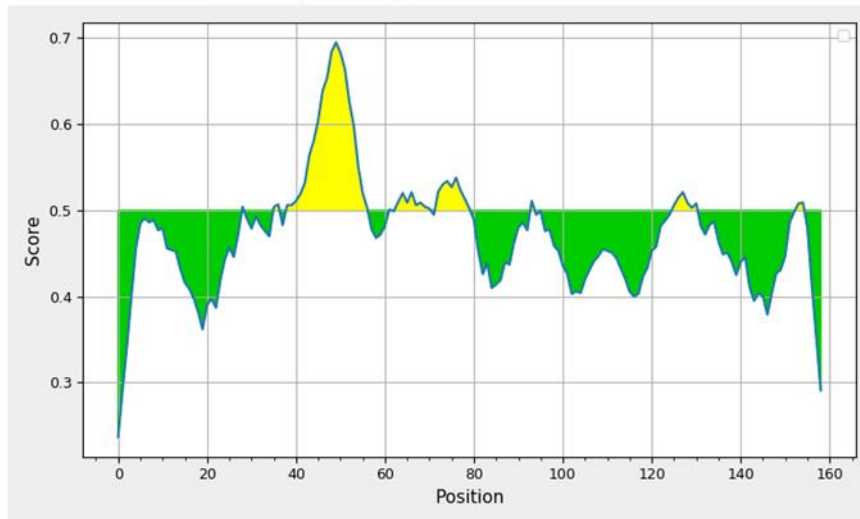
Al analizar las proteínas Mal d 1 de manzana y Bet v 1 del polen de abedul mediante la herramienta de predicción de epítomos que ofrece la “Immune Epitope Database and Analysis Resource” IEDB.org, nos predice una región que se encuentra entre los residuos de aminoácidos que van de los 40 a los 60.

## A Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MGVTTFENEY TSEIPPPRLF KAVLADADNL IPKIAPOAIK HAEILEGGG PGTIKKITFG
61 EGSQYGVV KHKIDSVEEA NYSYAYTLIE GDALDTIEK VSYETKLVAS GSGSIKIS
121 HY HTKGDV EIKEEHVKAG KEKAHGLFKL IESYLKGHDP AYN
```

Center position: 4 Threshold: 0.500



## B Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MGVFNYETET TSVIPAARLF KAFILDGDNL VPKVAPQAI SSVENIEGNGG PGTIKKINFP
61 EGFPPKYV KDRVDEVDHT NFKYNYSVIE GPGVDTLEK ISNEIKIVAT PDGGCVLKIS
121 NK YHTKGN HEVKAEQVKA SKEMGETLLR AVESYLLAHS DAYN
```

Center position: 4 Threshold: 0.500

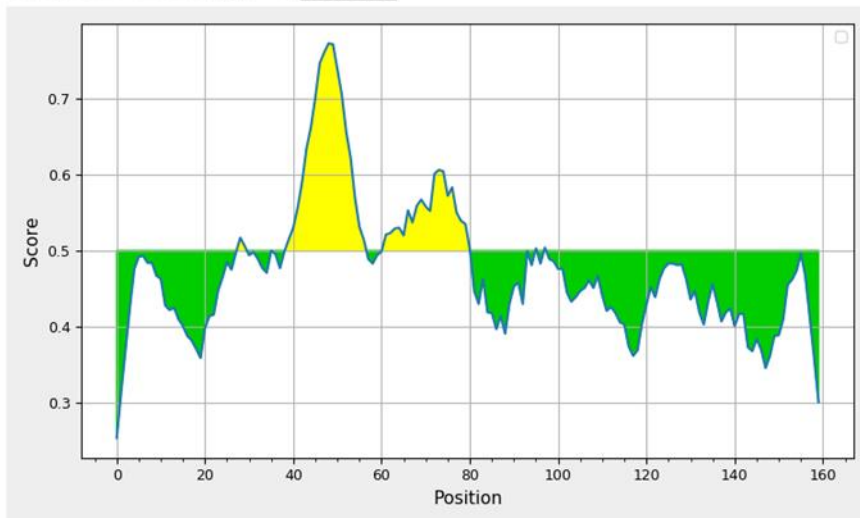


Figura 28. Predicción de epítomos del alérgeno de la manzana Mal d 1.02 (A) y la proteína proveniente del polen de abedul Bet v 1 (B).

## Spot 2 Nucleoside-diphosphate kinase, NDKB (A0A498JEZ2)

La base de datos “Uniprot” clasifica a esta proteína por analogía como una enzima que cataliza la reacción de ATP hacia ADP, participando de esta manera en los procesos de biosintéticos de CTP, GTP y UTP. La figura 29 muestra el espectro de masas obtenido de la proteína y la figura 30 un alineamiento de uno de los péptidos obtenidos con la secuencia de la proteína NDKB.

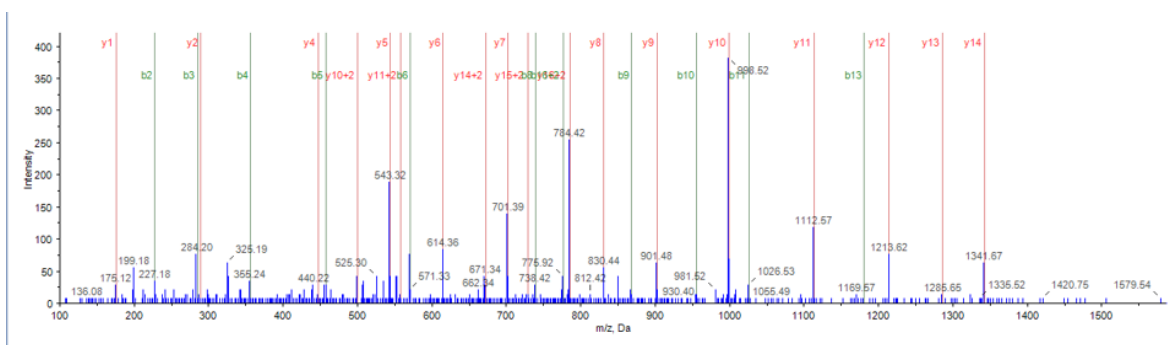


Figura 29. Espectro de masas del Spot 2, Nucleoside-diphosphate kinase.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

A0A498JEZ2_MALDO_Nucleoside_diphosphate_kinase Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	MEQTFIMIKPDGVQRGLVGDIIISRFKKGFKYKGMKFINVDRPFAEKHYEDLSAKPFFSG -----	60 0
A0A498JEZ2_MALDO_Nucleoside_diphosphate_kinase Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	LVDYIISGPVVAMIWEGKNVILTGRKIIGATNPAESAPGTIRGDYAIIEIGRNIHGSDSA -----GDYAIIEIGR----- *****	120 9
A0A498JEZ2_MALDO_Nucleoside_diphosphate_kinase Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	EGARKEIALWFPDGPANWQSSVHHIYE -----	148 9

Figura 30. Alineamiento de uno de los péptidos obtenidos mediante proteinpilot utilizando como referencia la base de datos de Uniprot.org, y el servicio de alineamiento en línea de ClustalOmega.

A pesar de que esta proteína de manzana no se ha reportado como un alérgeno en manzana, un alineamiento mediante la herramienta de la base de datos allergome.org, conocida como “allergome aligner”, determinó que la proteína de manzana tiene un porcentaje de identidad superior a 56%, con un valor de E inferior a  $5 \cdot 10^{-49}$ , con las siguientes proteínas: NDKB de *Epinephelum coioides*, NDKB de



*Ictalurus punctatus* y NDKB de *Brachydanio rerio*. La figura 31, muestra los alineamientos entre las NDKB de las cuatro especies.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

tr|A0A498JEZ2|A0A498JEZ2_MALDO    ---MEQTFIMIKPDGVQVQRLVGDIIISRFEK<GFYKGMKFINVDRPFAEKHYEDLSA<P    56
tr|A8HG21|A8HG21_EPICO          --MSGERTFIAVKPDGVQVQRLIGDII<RFEQKGFKLVAMKFLQPTTEELL<QHYMDL<D<P    58
tr|F1RBS6|F1RBS6_DANRE         MSA<TERTFIAVKPDGVQVQRLMGEII<RFEQKGFRLVAMKFLQASEDLL<QHYIDL<DRP    60
tr|Q9DFC0|Q9DFC0 ICTPU         MAA<AERTFIAIKPDGVQVQRLIGDII<RFEQKGFRLVAMKFLQASEDLL<QHYIDL<DRP    60
      *:*:* :*****:*:*:*:*:* * .:*:*: . : ::* * . :*

tr|A0A498JEZ2|A0A498JEZ2_MALDO    FFSGLVDYIISGPVVMWIEGKNNVILTGRKIIIGATNPAESAPGTIRGDYAIIEIGRNIHIG    116
tr|A8HG21|A8HG21_EPICO          FFSGLIQYMKSGPVVAMWIEGLNWKVTKGRIMLGETNPAASNPGTIRGDFCIEVGRNIHIG    118
tr|F1RBS6|F1RBS6_DANRE         FYPGLVKYMSGCVLAMWIEGLNWKVTKGRVMLGETNPADS<PGTIRGDFCIEVGRNIHIG    120
tr|Q9DFC0|Q9DFC0 ICTPU         FYPGLVKYMSGCVVAMWIEGLNWKVTKGRVMLGETNPADS<PGTIRGDFCIEVGRNIHIG    120
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

tr|A0A498JEZ2|A0A498JEZ2_MALDO    SDSAEGAR<EIALWIFP-DGPNWQSSVHHWIYE    148
tr|A8HG21|A8HG21_EPICO          SDSVASAE<EIGLWIFKPEEVVNYKSCAHSWIYE    151
tr|F1RBS6|F1RBS6_DANRE         SDSVDSANTEISLWIFKPEELVSVFKSQAQWIYE    153
tr|Q9DFC0|Q9DFC0 ICTPU         SDSVESAN<EISLWIFKPEELVSVFKSCAFNWIYE    153
      *** . . . * . * * : . . : * . . * * *

```

Figura 31. Alineamiento múltiple de la secuencia de proteínas de las nucleoside-diphosphate kinases provenientes de *M. domestica*, de *E. coioides*, *I. punctatus* y *B. rerio*. Los asteriscos indican el mismo residuo, mientras que los dobles puntos indican un grado de conservación elevado en cuanto a sus propiedades con un valor mayor a 0.5 en la matriz PAM 250. El punto indica un grado de conservación bajo en cuanto a sus propiedades con un valor menor o igual a 0.5 en la matriz PAM 250.

Adicionalmente, al realizar un análisis de los posibles aminoácidos que pertenecen a un epítipo podemos observar las regiones de epítipo que comparten las diferentes proteínas (figura 32). Se pueden observar en amarillo regiones de 20 a 60, 90 a 110 y de 130 a 140.

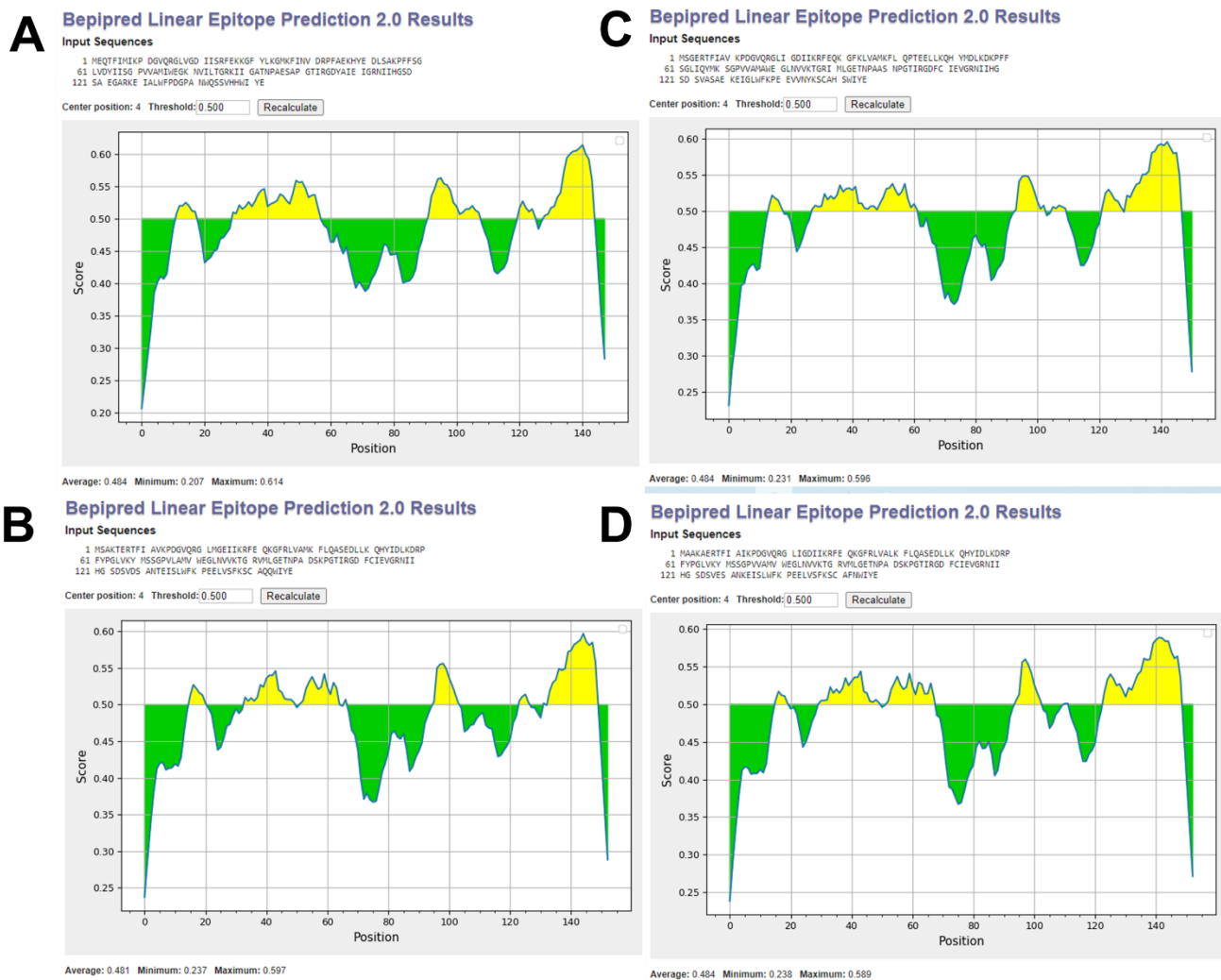


Figura 32. Análisis de región de epítipo aplicado a proteínas nucleoside diphosphate kinase. A. Proveniente de *Malus domestica*. B. Proveniente de *Danio rerio*. C. Proveniente de *Epinephelus coioides*. D. Proveniente de *Ictalurus punctatus*.

### Spot 3 Proteína no caracterizada (A0A498HLF4)

Esta proteína no caracterizada de *M. domestica*, la base de datos de Uniprot le confiere función homóloga de constituyente estructural del ribosoma. La figura 33 muestra el espectro de masas obtenido de la proteína y la figura 34 un alineamiento de uno de los péptidos obtenidos con la secuencia de la proteína no caracterizada.

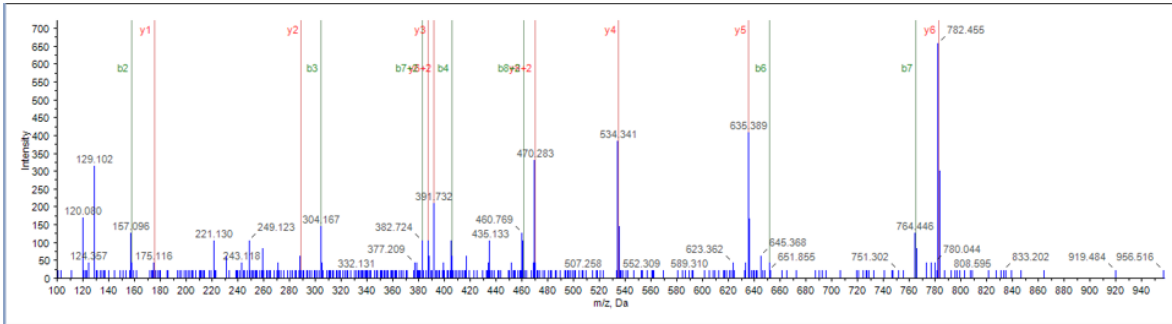


Figura 33. Espectro de masas del Spot 3, proteína no caracterizada.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

A0A498HLF4_MALDO_Uncharacterized_protein	MGVFTFVLRTSGGEWCAKQQNGDLEATAPSTFELQRKLVQSALSSDSSGGVQTSYSPVTP	60
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	-GVFTFVLR-----	8
	*****	
A0A498HLF4_MALDO_Uncharacterized_protein	TSAVFQIVVGGGGGGGAFIGGGATAAAPGGGAAAAEAPAAEKKKEEESDDMGFSLF	120
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	-----	8
A0A498HLF4_MALDO_Uncharacterized_protein	D 121	
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	- 8	

Figura 34. Alineamiento de uno de los péptidos obtenidos mediante proteinpilot utilizando como referencia la base de datos de Uniprot.org, y el servicio de alineamiento en línea de ClustalOmega.

Un alineamiento con la base de datos “allergome aligner”, encontró un 100 % de identidad, con un valor de E de 0.72, con la región COOH terminal del alérgeno Sola I ARP60S del tomate. Un análisis con la herramienta Blastp, mostró que existe similitud entre ambas proteínas, principalmente en la región que va del aminoácido 97 al aminoácido 121 (figura 35). Así mismo, un análisis de la base de datos de WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, demostró que la proteína de manzana presentó una identidad del 40.8 % con la proteína ribosomal ácida 60S de *Prunus dulcis* (almendra, Pru du 5, Q8H2B9).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

tr|A0A498HLF4|A0A498HLF4_MALDO      MGV-FTFVLRITSGGEWCAKQNGDLEATAPSTFELQRKLVQSSALSSDSSGGVQTSYSPV-      58
EMBOSS_001                          M<VIASVYLLAVLGGNT-----SPSAADLKILASVGAED-DDRIELLLSQVK      47
* *  ::* . **;                      ;**: !*:: *.. . :* .. : : * *

tr|A0A498HLF4|A0A498HLF4_MALDO      -----TP-TSAVFQVIVGGGGGGGAFI-GGGATAAAPGGGAAAAEAPAAEEK<EEK      108
EMBOSS_001                          G<DITELIAAGREKILASVPSGGGGVAVAVSGGG-G-----AAPAAEEKKEEKVEEK      100
          : . : * **** .. : ***          .* **  *:* ***

tr|A0A498HLF4|A0A498HLF4_MALDO      EESDDDMGFSLFD          121
EMBOSS_001                          EESDDDMGFSLFD          113
          ****

```

Figura 35. Alineamiento de la proteína de manzana no caracterizada (A0A498HLF4) y el alérgeno de tomate Sola I ARP60S (EMBOSS\_001). Los asteriscos indican el mismo residuo, mientras que los dobles puntos indican un grado de conservación elevado en cuanto a sus propiedades con un valor mayor a 0.5 en la matriz PAM 250. El punto indica un grado de conservación bajo en cuanto a sus propiedades con un valor menor o igual a 0.5 en la matriz PAM 250.

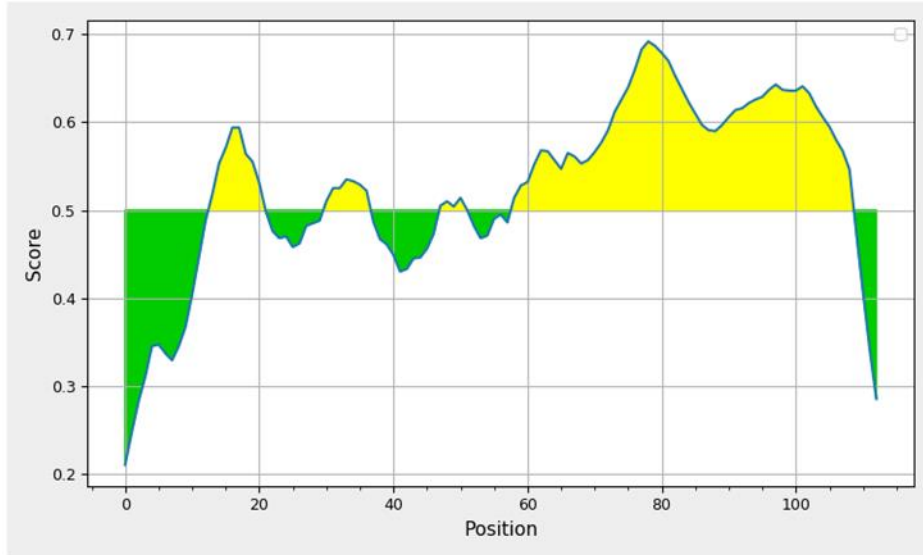
Al analizar las proteínas Sola I ARP60S y la no caracterizada de manzana mediante la herramienta de predicción de epítomos que ofrece la “Immune Epitope Database and Analysis Resource” IEDB.org, nos predice una alta probabilidad de que la región que comparten sea una zona de un posible epítomo, podemos observar en amarillo las regiones donde comparten. (figura 36).

## A Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MKVIASYLELLA VLGGNTSPSA ADLKKILASV GAEADDDRIE LLLSQVKGKD ITELIAAGRE
61 KLASVPSGGG GGVAVAVS GGGGAAAPAA EEKKEEKKVE EKEESDDDMG FSLFD
```

Center position: 4 Threshold:



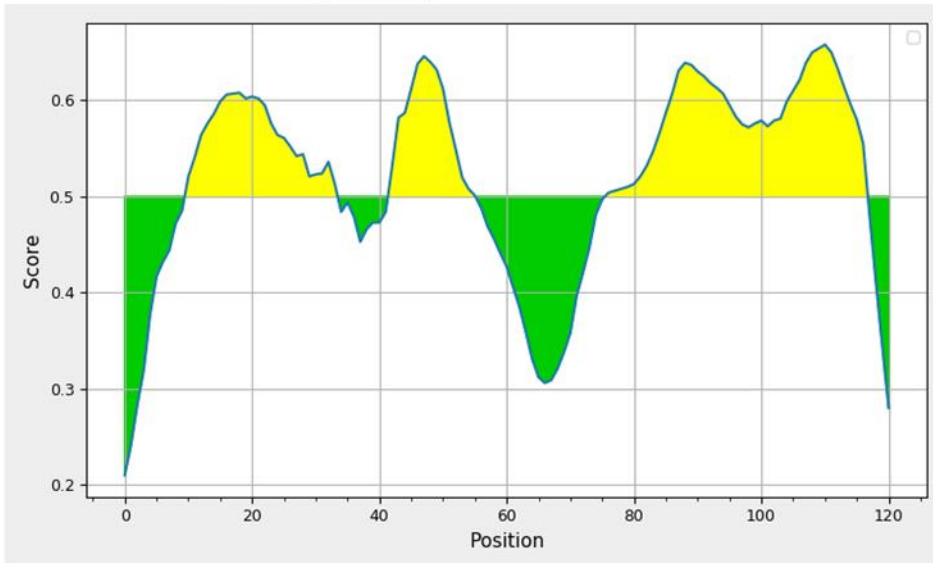
Average: 0.524 Minimum: 0.210 Maximum: 0.692

## B Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MGVFTFVLRT SGGEWCAKQQ NGDLEATAPS TFEQRKLVQ SALSSDSSGG VQTSYSPVTP
61 TSAVFQIVIG GGGGGGAF IGGGATAAAP GGGAAAAAEA PAEEKKEEK EESDDDMGFS
121 LFD
```

Center position: 4 Threshold:



Average: 0.519 Minimum: 0.210 Maximum: 0.658

Figura 36. Predicción de epítomos del alérgeno de tomate Sola I ARP60S (A) y la proteína proveniente de manzana sin caracterizar (B)

En este análisis, las regiones amarillas muestran los residuos que tienen una mayor probabilidad de ser epítomos. El análisis se realizó con la herramienta Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0. En las gráficas se puede observar que ambas proteínas tienen un área en común en el COOH terminal con probabilidad de tener un epítomo.

```

Manzana      MG-VFTFVLRITSGGEWCA<QQNGDLEATAPSTFELQKRLVQSALSSDSSGGVQTSYSP-- 57
Asp_f_8     MKHLAAYLLLAGN-----TSPSEDKAVLSSVGIADAE-ERLNKLI AELE 47
Fus_c_1     MKHLAAYLLGLGGN-----TSPSAADVKAVLTSVGIADAE-DRLNKLISELE 47
Alt_a_5     MKHLAAYLLGLGGN-----TSPSAADVKAVLESVGI EADS-DRLDKLISELE 47
Sola_I_ARP60S MKVIASYLLAVLGGN-----TSPSAADLK<ILASVGA EADD-DRIELLSQV< 47
Pru_du_5    MKVVAAYLLAVLGGN-----TTPSAEDLKDILG SVGAETDD-DRIQLLLSEV< 47
* : :::* .*:          *: *: ::: * . . !* . :: :

Manzana      -----VTPTSAVFQVI VGGGGGGGAFIGGGATAAAPGGGAAAAAEAPAAEEKKEE<EE 110
Asp_f_8     GKDLQELIAEGST<LASVPSG-GAAAAAPAA----AGAAAGGAA--APAAEE<KEEEEKEE 100
Fus_c_1     GKDIQQLIAEGSE<LASVPSG-GAGGAS--G----GAAAAGGAA--EEAKEEEKEEEEKEE 98
Alt_a_5     GKDINELIASGSE<LASVPSG-GAGGAAASG---GAAAAGGSAQAEEAPEAAKEEEEKEE 102
Sola_I_ARP60S GKDITELIAAGRE<LASVPSG-GGGVAVAV----SGGGGAAAPAAEEKKEE<KVEEKEE 102
Pru_du_5    GKDITELIASGRE<LASVPSG-GGAVAVAAP---GAGAGAAAPAAAEPEK<EEKVEEKED 102
          ::      : : .* *.. .      .. ..::      * ****;

Manzana      SDDDMGFSLFD 121
Asp_f_8     SDEDMGFGLFD 111
Fus_c_1     SDEDMGFGLFD 109
Alt_a_5     SDEDMGFGLFD 113
Sola_I_ARP60S SDDDMGFSLFD 113
Pru_du_5    TDDDMGFSLFD 113
          :*:****.***

```

Figura 37. Alineamiento múltiple de la proteína de manzana no caracterizada (manzana) y diferentes alérgenos ya reportados en la literatura, los asteriscos indican el mismo residuo, mientras que los dobles puntos indican un grado de conservación elevado en cuanto a sus propiedades con un valor mayor a 0.5 en la matriz PAM 250. El punto indica un grado de conservación bajo en cuanto a sus propiedades con un valor menor o igual a 0.5 en la matriz PAM 250.

La figura 37 muestra un alineamiento múltiple mediante la herramienta “clustal omega” con las secuencias de alérgenos conocidos como Fus c 1, Alt a 5, Asp f 8, Pru du 5 y Sola I ARP60. El resultado muestra la existencia de una gran identidad entre las secuencias en sus extremos COOH terminal.

### Spot 4 Glutathione transferase A0A498HW70.

Por homología, Uniprot describe a la proteína del Spot 4 con actividad catalítica de glutathione transferase. La figura 38 muestra el espectro de masas obtenido de la proteína y la figura 39 un alineamiento de uno de los péptidos obtenidos con la secuencia de la proteína glutathione transferase.

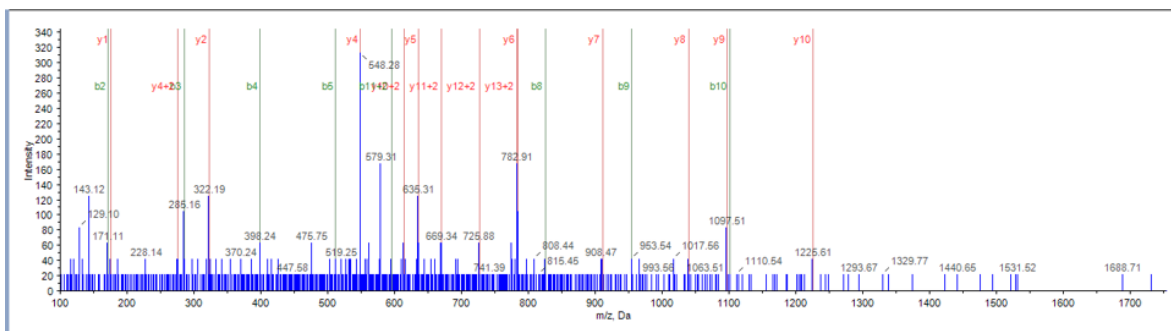


Figura 38. Espectro de masas del Spot 3, glutathione transferase.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

A0A498HW70_MALDO_Glutathione_transferase	MITNDKMEAQEVEVEVEAQAATESGDQIKLYSYWRSSCSYRVRIALNLKGLKYEYKAVN	60
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	-----AVN	3
	***	
A0A498HW70_MALDO_Glutathione_transferase	LLKGEQFSPEFRKLNVPVGVVPLVDGDTLVADSFALIMHLEEKYPQHLLPPDLQKRAIN	120
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	LLKGEQFSPEFR-----	15
	*****	
A0A498HW70_MALDO_Glutathione_transferase	YQAANIVSSSIQPLQLNLAVLKYLEEKVSPDEKIEWKGFHIGKGFSALEELLNNHAGKYAT	180
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	-----	15
A0A498HW70_MALDO_Glutathione_transferase	GDEVYVADLFLAPQVYTAIRFLDQMTQFPLLARLHEAYKKIPAFLDIPEKQPDAPSP	238
Secuencia_de_aminoácidos_obtenida	-----	15

Figura 39. Alineamiento de uno de los péptidos obtenidos mediante proteinpilot utilizando como referencia la base de datos de Uniprot.org, y el servicio de alineamiento en línea de ClustalOmega. Esta enzima tendría la capacidad de unir un grupo R al grupo tiol del glutatión, confiriéndole una gran utilidad en los procesos metabólicos de los aminoácidos de la familia de los aromáticos y el proceso metabólico del glutatión; su localización se predice que sería citoplásmica. Al realizar un alineamiento con “allergome aligner” se encuentra similitud con el alérgeno de ácaro Der p 8 (figura 40).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

tr|A0A498HM70|A0A498HM70_MALDO      MITNDKMEAEQEVEVEEAQAATESGDCQIKLYSYWRSSCSYRVRIALNL<GLKYEY<AVN      60
tr|Q2YFE3|Q2YFE3_DERPT              -----MSKPIFYHHPFSGPCRTVS-TVA<ILNVDMEM<KLD      35
                                     .: * * : . *      . : . : * * : :

tr|A0A498HM70|A0A498HM70_MALDO      LLKGEQFSPEFRKLNPGYVPLVLDGDTLVADSFAIL-MH-LEEKYPQHPLLPDLOKRA      118
tr|Q2YFE3|Q2YFE3_DERPT              LLT<EHLNPEFLKVNPFHKVPTFVDSGDFVDESRIAMYLVESRKPDSFLYPKNDLK<R      95
** . : . : ** * : ** . * : * : * : * : * : . : * : * : * : * : * :

tr|A0A498HM70|A0A498HM70_MALDO      INYQA-----ANIVSSSIQPLQNLAVLKYLEEKVSPDEKIEWVKFHIGK---GFSALEEL      170
tr|Q2YFE3|Q2YFE3_DERPT              IQIDRWLHYDINLSTTISAPM--FCVF---RGH-----QVQDYQVEQKQKTKLTDGV      143
* : :      * : : : * : : * : . :      : : : : : : : : : : : : * : : :

tr|A0A498HM70|A0A498HM70_MALDO      LNNHAGKYATGDEVYVYAD-LFL--APQVYTAIRFQLDMTQFPLLARLHEAY<KIPAFLEA      227
tr|Q2YFE3|Q2YFE3_DERPT              MQSFEQKFLTGADQFTLADIAMYFSLNTMEVYP<YFKFDDYPN---LKSWMYHRVAEAL<-      199
: : . : * : * : : : : : : : . : : : : : : : * : . : * : : :

tr|A0A498HM70|A0A498HM70_MALDO      IPE<QPDAPSP-----                238
tr|Q2YFE3|Q2YFE3_DERPT              --QYDTEGTIPKAIETM<QFIQQRAAEAKEH      228
: : : . *

```

Figura 40. Alineamiento de glutathione transferase de manzana contra el alérgeno Der p 8. los asteriscos indican el mismo residuo, mientras que los dobles puntos indican un grado de conservación elevado en cuanto a sus propiedades con un valor mayor a 0.5 en la matriz PAM 250. El punto indica un grado de conservación bajo en cuanto a sus propiedades con un valor menor o igual a 0.5 en la matriz PAM 250.

El análisis de predicción de epítomos de la glutathione transferase de manzana y Der p 8, se observa en la figura 41 A. De manera relevante, en la figura 40 se observa el alineamiento de ambas secuencias de aminoácidos, en donde se muestran ambas secuencias comparadas y los sitios en donde comparten similitud.

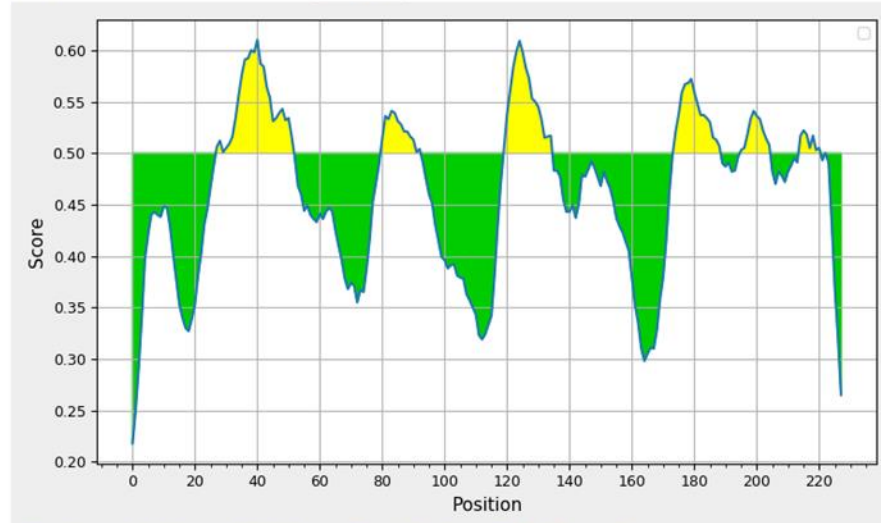


## A Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MSKPIFYYP FSGPCRTVST VAKILNDME MKKLDLLTKE HLNPEFLKVN PFHKVPTFVD
61 SDGFVWDE SRVIAMYLVE SRKPSDFLYP KNDLKKRIQI DRWLHYDINL STTISAPMFC
121 VF RGHQVQ DYQVEQKQET LKTLQVQMS FEGKFLTQAD QFTLADIAMY FSLNTEVYVP
181 KYFK FDDY PNLKSHYHRV AEALKQYDTE GTIPKAIETH KQFIQQRRAE AEKH
```

Center position: 4 Threshold: 0.500

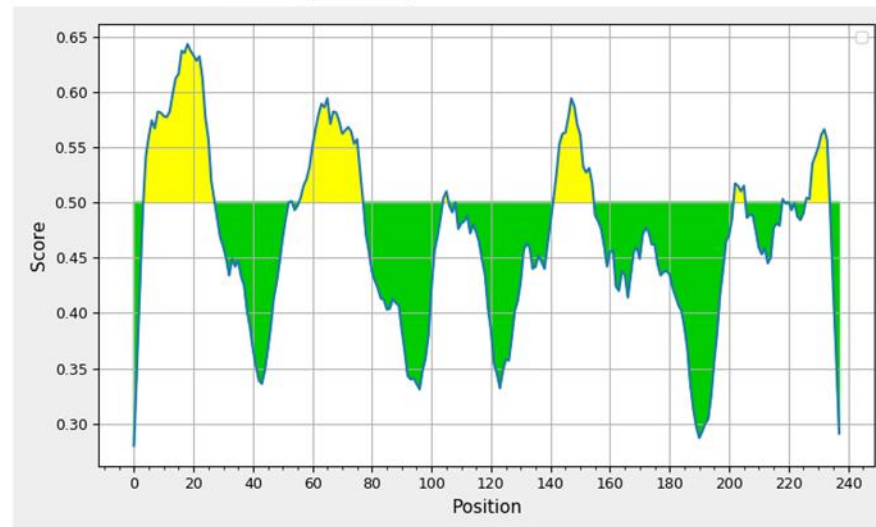


## B Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

### Input Sequences

```
1 MITNDKMEAQ EVEVEEAQA ATESGDQIQ LYSYWRSSCS YRVRIALNLK GLKYEYKAVN
61 LLKGEQFS PEFRKLNQV YVPVLVDGDT LVADSFALM HLEEKYQHP LLPDLQKRA
121 IN YQAANI VSSSIQPLQN LAVLKYLEEK VSPDEKIEW KFHIGGFSA LEELLNHAG
181 KYAT GDEV YMADLFLAPQ VYTAIRFQLD MTQFP LLARL HEAYKTIKPAF LDAIPEKQPD
241 APSP
```

Center position: 4 Threshold: 0.500



Average: 0.468 Minimum: 0.280 Maximum: 0.643

Figura 41. Posibles regiones de epítipo del alérgeno de ácaro Der p 8 (A) y la proteína putativa de manzana, glutathione transferase (B).

## Discusión.

### **Población.**

Existen estudios donde se destaca que la población pediátrica es idónea para la realización de este tipo de análisis porque por lo general, es en la etapa infantil donde encontramos una mayor predisposición a la alergia (Ebisawa *et al.*, 2013; Scurlock and Jones, 2018; Wong *et al.*, 2018; Zarif, 2020). Además de que se conoce que en la etapa infantil se pueden obtener mejores resultados para la aplicación de las inmunoterapias (Kim *et al.*, 2019; Wong and Lomas, 2019; Abrams, Chan and Sicherer, 2020). La importancia de que los pacientes presenten un cuadro de enfermedad atópica con sus familiares aumenta la probabilidad de presentar un cuadro clínico de alergia; el 30% de los familiares con atopia comparten un cuadro de alergia con los pacientes (Young, 1991; Stepanovic *et al.*, 2019).

### Extracción de proteínas.

La figura 16 muestra una cantidad suficiente de proteínas para poder detectar interacciones específicas entre las proteínas de manzana y los IgE de los pacientes con alergia mediante un ensayo con western blot, ya que el límite de detección del azul de Coomassie coloidal es de 10 a 20 ng mientras que el límite de detección del ensayo con Luminol del Western blot es de 1 a 3 picogramos, además de que es una técnica que ha sido utilizada para la detección de alérgenos de frutas en diferentes estudios realizados en países diferentes a México (Lucas *et al.*, 2007; Marzban *et al.*, 2008; Maghuly, Marzban and Laimer, 2009; Cardona *et al.*, 2018).

El método de extracción de proteínas es adecuado para satisfacer los objetivos del proyecto porque logró extraer un intervalo amplio de proteínas con diferentes pesos moleculares y puntos isoelectricos para el cribado de las proteínas alergénicas que afectan a nuestra cohorte de pacientes pediátricos mexicanos.

### **Transferencia de proteínas.**

El método de transferencia de proteínas es adecuado para satisfacer los objetivos del proyecto porque lograron transferirse proteínas tanto de bajo como de alto peso molecular, con diversos puntos isoelectricos. El método de tinción con rojo de Ponceau fue útil para evaluar el método de transferencia utilizado en este trabajo. Su límite de detección es de 250 nanogramos (Harper and Speicher, 2001).

Adicionalmente, la figura 19B muestra dos tiras recortadas de una membrana de PVDF que se tiñeron con el colorante amido black, donde se pueden observar con mayor facilidad proteínas con un peso molecular menores a 6.8 kDa. Esto se debe a que el límite de detección de la técnica de tinción con amido Black es de 50 ng (Harper and Speicher, 2001), siendo cuatro veces superior a la técnica de tinción con rojo de Ponceau. Este resultado confirma que la técnica de transferencia fue la adecuada para el cribado realizado sobre las proteínas alergénicas que afectan a nuestra cohorte, incluyendo el intervalo de proteínas alergénicas con un característico peso molecular menor a 30 kDa reportadas en diferentes bases de datos (Lei and Grammer, 2019).

La figura 20A muestra un gel sin transferir donde se observan proteínas con pesos moleculares de 6.8-200 kDa y que son transferidas con éxito porque el gel teñido con Coomassie coloidal que tiene un límite de detección de 10 a 20 ng según las

guías de espectrometría de masas de Taplin de Harvard (Harper and Speicher, 2001; *Guidelines | Taplin Mass Spectrometry Facility*, no date) ya no muestra bandas de proteínas con un peso molecular inferior a los 30 kDa (figura 20B) sugiriendo que éstas migraron hacia la membrana de PVDF por la transferencia.

### **Western Blot.**

El método de Western Blot que utilizamos en este trabajo usando como bloqueador leche descremada al 5%, resultó adecuado para satisfacer los objetivos del proyecto, porque en las muestras control, no se observaron proteínas que reaccionaran con los sueros de pacientes control (figuras 21, 22 y 23) observándose señal únicamente en con los sueros de pacientes pediátricos diagnosticados con alergia.

Un resultado relevante fue observar la presencia de una banda con el mismo peso molecular en diferentes pacientes, apoya la idea de que esta cohorte de pacientes podría compartir proteínas en común como alérgenos. Como lo muestra la tabla 6, hay pacientes con diagnóstico de alergia a manzana y plátano (FP4, FP9, FP14, FP21, FP22, FP24 y FP26) que presentaron una banda con un peso molecular de 18.7 kDa.

Otro resultado relevante fue la detección de proteínas alérgicas en pacientes con diagnóstico diferente a la alergia en manzana, sugiriendo una proteína o algún dominio dentro de alguna proteína que presenta reactividad cruzada o que los pacientes están por desarrollar una alergia a la manzana.

### **Análisis estructural y funcional.**

Se detectaron posibles proteínas alergénicas con pesos moleculares diferentes a los que se encuentran reportados en la base de datos Allergome (Ma *et al.*, 2006; Smole *et al.*, 2008, p. 2; Pagliarani *et al.*, 2013, p. 1; Ahammer *et al.*, 2017; Groth *et al.*, 2021). Se realizaron western blot de geles 2D, utilizando muestras de pacientes que mostraban bandas de proteínas con el mismo peso molecular. La figura 24 muestra un escaneo de un gel y una membrana revelada del western blot, misma que nos permite reconocer el sitio donde cortaremos para obtener las proteínas inmunorreactivas. Se seleccionaron cuatro spots de proteínas que se cortaron y procesaron para su posterior análisis mediante espectrometría de masas. A continuación, se discuten los resultados de cada spot.

#### Spot 1 Mal d 1.02 (Q9S7M5)

Proteína de importancia peculiar, ya que pertenece al grupo de las proteínas tipo Bet v 1, grupo que se encuentra relacionado con el árbol de abedul y por consiguiente, con el polen que produce. En el campo de la alergia, Mal d 1.02 se ha reportado como un isoalérgeno (Pagliarani *et al.*, 2013), también como un alérgeno principal en la comunidad del este y el norte de Europa, donde se identificó a esta proteína como una isoforma de Mal d 1 (Puehringer *et al.*, 2003). En un estudio se ha observado diferencias en la alergenicidad de cada isoforma; las diferencias dependieron de la concentración y expresión de los mismos en el fruto al que pertenecen, así como la población o los pacientes a quienes se les retó (Sancho *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Romer *et al.*, 2020). En nuestro estudio se trabajó con manzanas de la variedad *red Delicious*, obtenidas en México en una de las maneras

a través de las cuales la población mexicana tiene acceso a ellas como es la compra en un mercado o supermercado por lo que no necesariamente provienen de México, sugiriendo que la variante Mal d 1.02 es un tipo de alérgeno común en la población pediátrica mexicana. Se ha descrito que las proteínas del tipo Mal d 1 tienen una estrecha relación como panalérgenos con las proteínas Bet v 1 que son las que se encuentran en el polen de abedul así como la relación que tiene con el alérgeno del polen de abedul (Son *et al.*, 1999; Geroldinger-Simic *et al.*, 2013; Kinaciyan *et al.*, 2018). También se ha observado que los genes de Mal d 1.01 y Mal d 1.02 tienden a estar más conservados (Gao *et al.*, 2008).

Como se puede observar en la figura 27 las proteínas Bet v 1 y Mal d 1.02 comparten una gran similitud estructural y en la figura 28 en el análisis de región de epítipo, la región amarilla muestra que las proteínas de alérgeno de manzana, como las provenientes de polen de abedul comparten una región epítipo en la región amarilla, como es de esperarse puesto que la proteína de manzana ya se encuentra reportada como panalérgeno con la proteína del polen de abedul (Fritsch *et al.*, 1998, p. 1; Odongo *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2016, p. 1)

#### Spot 2 Nucleoside-diphosphate kinase, NDKB (A0A498JEZ2)

Como se puede observar en la figura 31, la proteína proveniente de *M. domestica* tiene una similitud con otras proteínas reportadas previamente como alérgenos de peces, apoyando el papel de esta proteína como alérgeno de la población pediátrica mexicana y como un posible panalérgeno con las proteínas a las cuales se les desarrollo el alineamiento.

Adicionalmente, en la figura 32 podemos observar que comparten las mismas regiones de epítopo lo que da más fuerza a la teoría de su posible relación como panalérgenos.

#### Spot 3 Proteína no caracterizada (A0A498HLF4)

En la figura 35 se observa el alineamiento realizado con una proteína ya reportada como alérgeno en donde se observan similitudes principalmente en las regiones finales, esta información nos brinda una noción sobre su posible papel como panalérgeno del tomate y su participación en la alergia alimentaria en pacientes pediátricos mexicanos. La región amarilla es precisamente donde se denota la predicción de epítomos (figura 36). Estos alérgenos ya habían sido evaluados con anterioridad por un grupo de España (López-Matas *et al.*, 2011) donde se reportaba un nuevo alérgeno encontrado en el tomate Sola I ARP60S y que fue comparado con otras proteínas alergénicas para defender su papel como alérgeno alimentario (figura 37). De este modo, esta información da sustento para considerar esta proteína como el inicio de futuros estudios que confirmen el papel de la proteína de manzana no caracterizada en las alergias de la población pediátrica mexicana.

#### Spot 4 Glutathione transferase A0A498HW70.

Proteína que uniprot describe con actividad catalítica, tiene la capacidad de unir un grupo R al tiol del glutatión, esto le confiere una gran utilidad en los procesos metabólicos de los aminoácidos de la familia de los aromáticos y el proceso metabólico del glutatión, se localiza en el citoplasma. Al realizar un alineamiento con “allergome aligner” se encuentra similitud con Der p 8 y al realizar un alineamiento como lo muestra la figura 40, donde podemos observar una gran similitud con este

alérgeno. El análisis de predicción de epítomos de la glutathione transferase de manzana y Der p 8, identificó una región de epítopo para la proteína Der p 8 a nivel de los residuos de aminoácidos 28 al 51 (figura 41 A). De manera relevante, en la figura 40 se observa el alineamiento de ambas secuencias de aminoácidos, en donde se muestra que en la región 28 a 51 de la proteína Der p 8 existe una gran similitud con la secuencia de aminoácidos de la proteína glutathione transferasa en los residuos de aminoácidos de 58 a 80 (figura 41 B).

Por lo general, la mayoría de los alérgenos tienen una tendencia a ser parte de los metabolitos secundarios de las plantas tal como lo es la glutathione transferasa, y una de las funciones de los metabolitos secundarios es el de la protección de la planta misma, tal como lo menciona el estudio de en donde se muestra que una actividad elevada de la enzima glutathione transferasa en conjunto con otras enzimas tienen la función de producir resistencia ante agentes externos como los insectos (Karoly *et al.*, 1996; Monteiro *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021).

La similitud que tiene con el alérgeno Der p 8, es de particular importancia porque la proteína pertenece a la familia de la glutatión transferasa, entre ellas, Bla g 5, la glutatión transferasa que pertenece a las cucarachas y que ya se encuentra reportada como un alérgeno.



Otros alérgenos de glutatión transferasa son el mencionado Der p 8 y Blo t 8 pertenecientes *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* que son glutatión S transferasas en áreas tropicales y sub-tropicales y que también se encuentran reportadas como alérgenos glutatión S transferasa, esta información da sustento a la idea de que la glutatión S transferasa proveniente de manzana en población pediátrica mexicana está funcionando como un alérgeno. (Mueller *et al.*, 2015).

Las enzimas glutatión s transferasas comprenden una superfamilia ubicua de enzimas que cataliza el ataque nucleofílico al reducir glutatión en compuestos no polares que contienen átomos de carbono, nitrógeno, o azufre electrofílico. Tienen un papel fisiológico en la desintoxicación de xenobióticos (fármacos, insecticidas y herbicidas) y compuestos endógenos en casi todos los organismos vivos. La glutatión S transferasa de los ácaros del polvo doméstico *D. pteronyssinus* ha sido clonado, secuenciado, e identificado como alérgeno principal. Las glutatión S transferasas nativas y recombinantes han sido purificadas de *D. pteronyssinus* y es conocido como Der p 8. Esos alérgenos se han encontrado a una alta frecuencia dentro de sujetos alérgicos, pero sus títulos de reactividad de IgE son muy bajos. Se demostró que la glutatión S transferasa de ácaro es un alérgeno con reactividad cruzada con la glutatión S transferasa en *D. pteronyssinus* y la de cucaracha, sugiriendo un papel de panalérgeno. La glutatión S transferasa también ha demostrado tener reactividad alérgica en *Blattella germanica* Bla g 5, artrópodos y hongos (Liao *et al.*, 2013).

En otro estudio se muestra que, además de la reactividad cruzada existente en cucarachas, ácaros y hongos, se menciona una reactividad cruzada proveniente del polen de abedul. Se ha identificado una proteína en el polen de abedul de 27 kDa que pertenece a la familia de las glutatión transferasas (Deifl *et al.*, 2014). La familia de las glutatión S transferasas representan una superfamilia de enzimas bien conservada y multifuncional, y se encuentran presentes en virtualmente todos los organismos desde las bacterias hasta el hombre. Estas enzimas catalizan la detoxificación de reactivos endógenos o xenobióticos mediante la conjugación del glutatión a los sustratos electrofílicos principales. Los homólogos de glutatión S transferasa en los ácaros del polvo doméstico (Der p 8 y Bla g 5) han sido identificados como alérgenos relevantes. Por ejemplo, 40-96% de los pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico demostraron tener respuestas de IgE a Der p 8 y del 30-70% de los individuos alérgicos a la cucaracha muestran IgE específica contra Bla g 5 (Huang *et al.*, 2006). Otra glutatión S transferasa, Alt a 13, ha sido identificada como el principal alérgeno en *Alternaria alternata*. La reactividad cruzada de IgE entre glutatión S transferasas proveniente de ácaros, cucarachas, helmintos y hongos ha sido reportado (Santiago *et al.*, 2012; Zakzuk, Lozano and Caraballo, 2021).

Recientemente, la glutatión S transferasa en trigo *Triticum aestivum* también se ha identificado como un alérgeno (Deifl *et al.*, 2014). Aunado a esto, se sabe de la existencia de reactividad cruzada entre la proteína de la manzana reconocida como alérgeno Mal d 1 y la del polen de abedul Bet v 1, por lo que no sería inapropiado pensar en la participación de otra proteína diferente que tiene una participación

como panalérgeno con otros alérgenos por el simple hecho de pertenecer a la superfamilia de las glutatión S transferasas y una glutatión S transferasa proveniente de la manzana, se podría tratar de los primeros casos reportados de la glutatión S transferasa en manzana (Fritsch *et al.*, 1998, p. 1, 1998, p. 1; Son *et al.*, 1999, p. 1; Odongo *et al.*, 2015, p. 1; Kinaciyan *et al.*, 2018, p. 1)

Los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas y el análisis bioinformático, sugieren que las proteínas de manzana que no han sido reportadas como alérgenos, podrían tener un papel en la alergenicidad de la población pediátrica mexicana, siendo está una aproximación a estudios que se realizan en diferentes partes del mundo. Se necesitan estudios a futuro donde se pueda comprobar de manera más precisa la alergenicidad y la identidad de las posibles proteínas encontradas. Por ejemplo, estudios de punción cutánea en los pacientes que se detectó la alergia mediante una proteína diseñada de manera recombinante. Lo anterior, apoyado con estudios de western blot, normales y con competencia, que es un estudio donde compete el contenido de IgE sensibilizado de los pacientes con una proteína que tiene regiones de similitud con las proteínas a las que está sensibilizado. Además, podría incluirse un análisis de activación de basófilos detectado por citometría de flujo para tener más certeza de que las proteínas encontradas son las responsables de las manifestaciones clínicas reportadas por los pacientes que presentan la patología del estudio realizado. Estudios que se encuentran postulados en las bases de datos ya que se actualizan constantemente. En un futuro, se espera que estos estudios formen parte del inicio de una medicina molecular más personalizada. Además, que se tenga la posibilidad de mejorar el

tratamiento mediante inmunoterapia o la generación de kits de detección de proteínas alergénicas en la población mexicana, modificando el diagnóstico y la terapéutica de una manera impresionante, acompañadas de la tecnología de la biología molecular y la proteómica con la finalidad de mejorar la calidad de vida de los pacientes con alergia, y ser un parteaguas en la investigación de la diversidad de población que existe alrededor del mundo.

## Conclusiones

En las manzanas consumidas en México, se encuentran posibles proteínas alergénicas como; “nucleoside diphosphate kinase”, “glutathione transferase” y una proteína no caracterizada, que no se habían reportado con anterioridad, pero que tienen similitudes con proteínas alergénicas provenientes de otra fuente, en cuanto a secuencia y predicción de epítomos. Además, dentro de la población pediátrica mexicana alérgica a las manzanas, pueden encontrarse anticuerpos dirigidos contra una proteína alergénica reportada con anterioridad: Mal d 1. La alergia contra esta proteína podría ser predominante de la población pediátrica mexicana.

## Perspectivas.

Se necesitan estudios a futuro para poder complementar de la información arrojada por esta tesis, por ejemplo, estudios de punción cutánea en los pacientes que se detectó la alergia mediante la utilización de una proteína recombinante, aunado a estudios de western blot de competencia en donde compite el contenido de IgE sensibilizado de los pacientes con varias proteínas de distintas fuentes que tienen regiones de similitud con las proteínas a las que está sensibilizado. Además de un

análisis de activación de basófilos con un citómetro de flujo. En un futuro se espera que esta clase de estudios formen parte del inicio de la medicina personalizada y se tenga la posibilidad de la mejora en el tratamiento mediante inmunoterapia al emplear proteínas recombinantes basadas en los resultados de los estudios o la generación de kits de detección de proteínas alergénicas para la población mexicana u otra población en específico, mejorando el diagnóstico y la terapéutica de una manera impresionante.

## Referencias.

Abrams, E.M., Chan, E.S. and Sicherer, S. (2020) 'Peanut Allergy: New Advances and Ongoing Controversies', *Pediatrics*, 145(5), p. e20192102. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2102>.

Aguilar-Jasso, D. *et al.* (2018) 'Perfil clínico de pacientes pediátricos con diagnóstico de alergia alimentaria en el noroeste de México', *Revista Alergia México*, 65(3), pp. 233–241. Available at: <https://doi.org/10.29262/ram.v65i3.355>.

Ahammer, L. *et al.* (2017) 'Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), pp. 1606–1612. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05752>.

Akdis, C.A. *et al.* (1998) 'Role of interleukin 10 in specific immunotherapy.', *Journal of Clinical Investigation*, 102(1), pp. 98–106.

Alessandri, S. *et al.* (2012) 'High-Throughput NMR Assessment of the Tertiary Structure of Food Allergens', *PLoS ONE*, 7(7), p. e39785. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039785>.

Anvari, S. *et al.* (2019) 'IgE-Mediated Food Allergy', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 57(2), pp. 244–260. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8710-3>.

Arasi, S. *et al.* (2018) 'The future outlook on allergen immunotherapy in children: 2018 and beyond', *Italian Journal of Pediatrics*, 44, p. 80. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0519-4>.

Aslam, B. *et al.* (2017) 'Proteomics: Technologies and Their Applications', *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), pp. 182–196. Available at: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.

Azamar-Jácome, A.A. *et al.* (2017) 'Perfil clínico-epidemiológico del síndrome de alergia oral en población de 6 a 18 años', *Revista Alergia México*, 64(2), pp. 142–152. Available at: <https://doi.org/10.29262/ram.v64i2.235>.

Bahna, S.L. (2008) 'Reflections on current food allergy controversies: specific IgE test application, patch testing, eosinophilic esophagitis, and probiotics', *Allergy and Asthma Proceedings*, 29(5), pp. 447–452. Available at: <https://doi.org/10.2500/aap.2008.29.3150>.

Bartra, J. *et al.* (2009) 'From pollinosis to digestive allergy', *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 19 Suppl 1, pp. 3–10.

Benedé, S. *et al.* (2016) 'The rise of food allergy: Environmental factors and emerging treatments', *EBioMedicine*, 7, pp. 27–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.012>.

Breiteneder, H. (2004) 'Thaumatin-like proteins – a new family of pollen and fruit allergens', *Allergy*, 59(5), pp. 479–481. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00421.x>.

Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A', *Analytical Biochemistry*, 112(2), pp. 195–203.

Cardona, E.E.G. *et al.* (2018) 'Novel low-abundance allergens from mango via combinatorial peptide libraries treatment: A proteomics study', *Food Chemistry*, 269, pp. 652–660. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.113>.

Cardona, V. *et al.* (2020) 'World allergy organization anaphylaxis guidance 2020', *The World Allergy Organization Journal*, 13(10), p. 100472. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100472>.

Cech, N.B. and Enke, C.G. (2001) 'Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals', *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), pp. 362–387. Available at: <https://doi.org/10.1002/mas.10008>.

Chung, B.Y. *et al.* (2010) 'Diagnostic Usefulness of the Serum-Specific IgE, the Skin Prick Test and the Atopy Patch Test Compared with That of the Oral Food Challenge Test', *Annals of Dermatology*, 22(4), pp. 404–411. Available at: <https://doi.org/10.5021/ad.2010.22.4.404>.

Cox, L. (2011) 'Overview of Serological-Specific IgE Antibody Testing in Children', *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(6), p. 447. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11882-011-0226-3>.

De Martinis, M. *et al.* (2019) 'Food Allergies and Ageing', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20225580>.

De Martinis, M. *et al.* (2020) 'New Perspectives in Food Allergy', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21041474>.

Deifl, S. *et al.* (2014) 'Glutathione-S-Transferase: A Minor Allergen in Birch Pollen due to Limited Release from Hydrated Pollen', *PLoS ONE*, 9(10), p. e109075. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109075>.

Delgado Gómez, H.O. *et al.* (2018) *Perfil proteómico de extractos de proteínas en plátano (Musa paradisiaca) y pera (Pyrus communis)*.

Demoly, P. *et al.* (2014) 'International Consensus on drug allergy', *Allergy*, 69(4), pp. 420–437. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.12350>.

Devdas, J.M. *et al.* (2018) 'Food Allergy in Children: An Overview', *Indian Journal of Pediatrics*, 85(5), pp. 369–374. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2535-6>.

Dolch, A. *et al.* (2019) 'IL-10 signaling in dendritic cells is required for tolerance induction in a murine model of allergic airway inflammation', *European Journal of Immunology*, 49(2), pp. 302–312. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.201847883>.

Domon, B. and Aebersold, R. (2006) 'Mass Spectrometry and Protein Analysis', *Science*, 312(5771), pp. 212–217. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1124619>.

Ebisawa, M. *et al.* (2013) 'Pediatric allergy and immunology in Japan', *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 24(7), pp. 704–714. Available at: <https://doi.org/10.1111/pai.12117>.

Eiwegger, T. *et al.* (2019) 'Recent developments and highlights in food allergy', *Allergy*, 74(12), pp. 2355–2367. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.14082>.

Finegold, I. (2007) 'Immunotherapy: when to initiate treatment in children', *Allergy and Asthma Proceedings*, 28(6), pp. 698–705. Available at: <https://doi.org/10.2500/aap.2007.28.3053>.

*Food Allergy | World Allergy Organization* (no date). Available at: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/food-allergy> (Accessed: 21 May 2019).

Francis, J.N., Till, S.J. and Durham, S.R. (2003) 'Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(6), pp. 1255–1261. Available at: <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1570>.

Fritsch, R. *et al.* (1998) 'Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(4 Pt 1), pp. 679–686. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(98\)70287-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(98)70287-8).

Fujita, H. *et al.* (2012) 'Mechanisms of Immune Tolerance to Allergens', *New Trends in Allergy and Atopic Eczema*, 96, pp. 30–38. Available at: <https://doi.org/10.1159/000331868>.

Gao, Z. *et al.* (2008) 'Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity', *BMC Plant Biology*, 8, p. 116. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-116>.

Gepp, B. *et al.* (2016) 'Monitoring the epitope recognition profiles of IgE, IgG1, and IgG4 during birch pollen immunotherapy', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5), pp. 1600-1603.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.022>.

Geroldinger-Simic, M. *et al.* (2013) 'Oral exposure to Mal d 1 affects the immune response in patients with birch pollen allergy', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), pp. 94–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.039>.

Gomez, F. *et al.* (2014) 'High Prevalence of Lipid Transfer Protein Sensitization in Apple Allergic Patients with Systemic Symptoms', *PLoS ONE*, 9(9), p. e107304. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107304>.

Groth, S. *et al.* (2021) 'Selenium biofortification of different varieties of apples (*Malus domestica*) - Influence on protein content and the allergenic proteins Mal d 1 and Mal d 3', *Food Chemistry*, 362, p. 130134. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130134>.

*Guidelines | Taplin Mass Spectrometry Facility* (no date). Available at: <https://taplin.med.harvard.edu/guidelines> (Accessed: 7 December 2021).

Hao, G. *et al.* (2016) 'High correlation of specific IgE sensitization between birch pollen, soy and apple allergens indicates pollen-food allergy syndrome among birch pollen allergic patients in northern China', *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17(5), pp. 399–404. Available at: <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500279>.

Harper, S. and Speicher, D.W. (2001) 'Detection of proteins on blot membranes', *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 10, p. Unit 10.8. Available at: <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1008s00>.

Hassan, A.K.G. and Venkatesh, Y.P. (2015) 'An overview of fruit allergy and the causative allergens', *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 47(6), pp. 180–187.



Heeringa, J.J. *et al.* (2020) 'Induction of IgG2 and IgG4 B-cell memory following sublingual immunotherapy for ryegrass pollen allergy', *Allergy*, 75(5), pp. 1121–1132. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.14073>.

Himly, M. *et al.* (2016) *Immune Frailty and Nanomaterials: The Case of Allergies, Current Bionanotechnology (Discontinued)*. Available at: <http://www.eurekaselect.com/142776/article> (Accessed: 21 May 2019).

Huang, C.H. *et al.* (2006) 'Characterization of glutathione S-transferase from dust mite, Der p 8 and its immunoglobulin E cross-reactivity with cockroach glutathione S-transferase', *Clinical & Experimental Allergy*, 36(3), pp. 369–376. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02447.x>.

Huertas, A.J. *et al.* (2014) 'Profilin sensitisation in a Mediterranean population', *Allergologia et Immunopathologia*, 42(5), pp. 387–394. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.09.005>.

Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986) 'Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis', *Plant Physiology*, 81(3), pp. 802–806. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>.

Iweala, O.I., Choudhary, S.K. and Commins, S.P. (2018) 'Food Allergy', *Current Gastroenterology Reports*, 20(5), p. 17. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0624-y>.

Karoly, null *et al.* (1996) 'Monooxygenase, Esterase, and Glutathione Transferase Activity Associated with Azinphosmethyl Resistance in the Tufted Apple Bud Moth, *Platynota idaeusalis*', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55(2), pp. 109–121. Available at: <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0040>.

Kim, E.H. *et al.* (2019) 'Long-term sublingual immunotherapy for peanut allergy in children: Clinical and immunologic evidence of desensitization', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(5), pp. 1320-1326.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.030>.

Kinaciyan, T. *et al.* (2018) 'Efficacy and safety of 4 months of sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 and Bet v 1 in patients with birch pollen-related apple allergy', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(3), pp. 1002–1008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.036>.

Kobayashi, Y. *et al.* (2016) 'Allergy to fish collagen: Thermostability of collagen and IgE reactivity of patients' sera with extracts of 11 species of bony and cartilaginous fish', *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 65(4), pp. 450–458. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.012>.

Krebitz, M. *et al.* (2003) 'Plant-based Heterologous Expression of Mal d 2, a Thaumatin-like Protein and Allergen of Apple (*Malus domestica*), and its

Characterization as an Antifungal Protein', *Journal of Molecular Biology*, 329(4), pp. 721–730. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00403-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00403-0).

Kucuksezer, U.C. *et al.* (2013) 'Mechanisms of immune tolerance to allergens in children', *Korean Journal of Pediatrics*, 56(12), pp. 505–513. Available at: <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.12.505>.

Kurien, B.T. and Scofield, R.H. (2006) 'Western blotting', *Methods*, 38(4), pp. 283–293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>.

Lei, D.K. and Grammer, L.C. (2019) 'An overview of allergens', *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(6), pp. 362–365. Available at: <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4247>.

Liao, E.-C. *et al.* (2013) 'Identification of Allergenic Component Tyr p 8 from *Tyrophagus putrescentiae* and Cross-Reactivity with Der p 8', *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 20(4), pp. 506–512. Available at: <https://doi.org/10.1128/CVI.00633-12>.

López Pérez, G. *et al.* (2009) 'Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México', *Revista alergia México*, 56(3), pp. 72–79.

López-Matas, M.A. *et al.* (2011) 'Acidic ribosomal protein 60S: A new tomato allergen', *Food Chemistry*, 127(2), pp. 638–640. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.145>.

Lou, W. *et al.* (2012) 'Responses of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) and IL-10-secreting type I T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children', *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 23(2), pp. 140–149. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01249.x>.

Lucas, J.S.A. *et al.* (2007) 'Kiwifruit allergy: actinidin is not a major allergen in the United Kingdom', *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 37(9), pp. 1340–1348. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02776.x>.

Ma, Y. *et al.* (2006) 'Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component-resolved diagnosis of apple allergy', *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 36(8), pp. 1087–1096. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02541.x>.

Maghuly, F., Marzban, G. and Laimer, M. (2009) 'Functional genomics of allergen gene families in fruits', *Nutrients*, 1(2), pp. 119–132. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu1020119>.

Maleki, S.J. *et al.* (2000) 'The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4), pp. 763–768. Available at: <https://doi.org/10.1067/mai.2000.109620>.

Martínez-Aguilar, J. and Molloy, M.P. (2019) 'Targeted Mass Spectrometry of S100 Proteins', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1929, pp. 663–678. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6\\_41](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6_41).

Martinis, M.D. *et al.* (2020) 'New Perspectives in Food Allergy', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21041474>.

Marzban, G. *et al.* (2005) 'Fruit cross-reactive allergens: a theme of uprising interest for consumers' health', *BioFactors (Oxford, England)*, 23(4), pp. 235–241. Available at: <https://doi.org/10.1002/biof.5520230409>.

Marzban, G. *et al.* (2008) 'Mapping of fruit allergens by 2D electrophoresis and immunodetection', *Expert Review of Proteomics*, 5(1), pp. 61–75. Available at: <https://doi.org/10.1586/14789450.5.1.61>.

Monteiro, L.B. *et al.* (2020) 'Evaluation of Resistance Management for the Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) to Insecticides in Brazilian Apple Orchards', *Journal of Economic Entomology*, 113(3), pp. 1411–1418. Available at: <https://doi.org/10.1093/jee/toaa023>.

Mueller, G.A. *et al.* (2015) 'Analysis of glutathione S-transferase allergen cross-reactivity in a North American population: relevance for molecular diagnosis', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 136(5), pp. 1369–1377. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.015>.

Muraro, A. *et al.* (2014) 'EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy', *Allergy*, 69(8), pp. 1008–1025. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.12429>.

National Academies of Sciences, E. *et al.* (2016) *Potential Genetic and Environmental Determinants of Food Allergy Risk and Possible Prevention Strategies, Finding a Path to Safety in Food Allergy: Assessment of the Global Burden, Causes, Prevention, Management, and Public Policy*. National Academies Press (US). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK435937/> (Accessed: 13 January 2022).

Nony, E. *et al.* (2016) 'Proteomics for Allergy: from Proteins to the Patients', *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(9), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0642-5>.

Odongo, L. *et al.* (2015) 'Bet v 1- and Bet v 2-Associated Plant Food Sensitization in Uganda and Germany: Differences and Similarities', *International Archives of Allergy and Immunology*, 167(4), pp. 264–269. Available at: <https://doi.org/10.1159/000439533>.

Ontiveros, N. *et al.* (2016) 'Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study', *Allergologia Et Immunopathologia*, 44(6), pp. 563–570. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.03.003>.

Pagliarani, G. *et al.* (2013) 'A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes', *BMC Plant Biology*, 13, p. 51. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-51>.

Pecora, V. *et al.* (2018) 'How to actively treat food allergy', *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 18(3), pp. 248–257. Available at: <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000450>.

Peters, R.L., Allen, K.J., *et al.* (2013) 'Skin prick test responses and allergen-specific IgE levels as predictors of peanut, egg, and sesame allergy in infants', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4), pp. 874–880. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.05.038>.

Peters, R.L., Gurrin, L.C., *et al.* (2013) 'The natural history of IgE-mediated food allergy: can skin prick tests and serum-specific IgE predict the resolution of food allergy?', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), pp. 5039–5061. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph10105039>.

Pomés, A. *et al.* (2018) 'WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language', *Molecular Immunology*, 100, pp. 3–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.003>.

Puehringer, H.M. *et al.* (2003) 'MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1', *Gene*, 321, pp. 173–183. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00822-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00822-9).

Radauer, C. *et al.* (2006) 'Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis', *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 36(7), pp. 920–929. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02521.x>.

Renz, H. *et al.* (2018) 'Food allergy', *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, p. 17098. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>.

Ridolo, E. *et al.* (2017) 'How to fit allergen immunotherapy in the elderly', *Clinical and Molecular Allergy: CMA*, 15, p. 17. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12948-017-0075-2>.

Romer, E. *et al.* (2020) 'Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes', *Scientific Reports*, 10(1), p. 9144. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66051-4>.

Sampson, H.A. (2004) 'Update on food allergy', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), pp. 805–819; quiz 820. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.014>.

Sánchez-Villalobos, J.Y. *et al.* (2020) 'The effectiveness and safety of subcutaneous immunotherapy for inhalable allergens in patients with respiratory allergies after one year of treatment', *Revista alergía México*, 67(4), pp. 309–315. Available at: <https://doi.org/10.29262/ram.v67i4.758>.

Sancho, A.I. *et al.* (2006) 'Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), pp. 5917–5923. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf060880m>.

Santiago, H. *et al.* (2012) 'Molecular mimicry between cockroach and helminth glutathione S-transferases promotes crossreactivity and cross-sensitization', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(1), pp. 248-256.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.045>.

Savage, J. and Johns, C.B. (2015) 'Food Allergy: Epidemiology and Natural History', *Immunity and allergy clinics of North America*, 35(1), pp. 45–59. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.09.004>.

Sayes, E.N.B. and C.M. (2017) 'Environmental Factors Contribute to the Onset of Food Allergies', *Journal of Environmental Science and Public Health*, 1(1), pp. 27–43.

Scurlock, A.M. and Jones, S.M. (2018) 'Advances in the approach to the patient with food allergy', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(6), pp. 2002–2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.1008>.

Shi, H.-Z. and Qin, X.-J. (2005) 'CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma', *Allergy*, 60(8), pp. 986–995. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00844.x>.

Sicherer, S.H. and Sampson, H.A. (2014) 'Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), pp. 291–307; quiz 308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>.

Smole, U. *et al.* (2008) 'Mal d 2, the Thaumatin-Like Allergen from Apple, Is Highly Resistant to Gastrointestinal Digestion and Thermal Processing', *International Archives of Allergy and Immunology*, 147(4), pp. 289–298. Available at: <https://doi.org/10.1159/000144036>.

Soares-Weiser, K. *et al.* (2014) 'The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis', *Allergy*, 69(1), pp. 76–86. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.12333>.

Son, D.Y. *et al.* (1999) 'Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen', *European Journal of Nutrition*, 38(4), pp. 201–215. Available at: <https://doi.org/10.1007/s003940050063>.

Stepanovic, B. *et al.* (2019) 'An update on allergy and anaphylaxis in pediatric anesthesia', *Paediatric Anaesthesia*, 29(9), pp. 892–900. Available at: <https://doi.org/10.1111/pan.13703>.

Tovey, E.R. and Baldo, B.A. (1989) 'Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 19(2–3), pp. 169–183.

Valenta, R. *et al.* (1991) 'Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals', *Science (New York, N.Y.)*, 253(5019), pp. 557–560. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1857985>.

Valle Rodríguez, I., Huerta López, J.G. and Huerta Hernández, R.E. (2017) 'Alergia a alimentos', *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 26(1), pp. 5–15.

Varga, J.M. and Ceska, M. (1972) 'Characterization of allergen extracts by polyacrylamide gel isoelectrofocusing and radioimmunosorbent allergen assay. II. Dog and cat allergens', *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 42(3), pp. 438–453.

Vieths, S. *et al.* (1994) 'Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen', *Allergy*, 49(4), pp. 262–271.

Wachholz, P.A., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2005) 'Detection of Allergen-Specific IgE Antibody Responses', *Journal of Immunotoxicology*, 1(3), pp. 189–199. Available at: <https://doi.org/10.1080/15476910490919140>.

Wachholz, P.A. and Durham, S.R. (2004) 'Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited', *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4(4), pp. 313–318. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.all.0000136753.35948.c0>.

Walker, J.M. (1996) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Science & Business Media.

Wong, A.G. and Lomas, J.M. (2019) 'Allergy Testing and Immunotherapy', *Pediatrics in Review*, 40(5), pp. 219–228. Available at: <https://doi.org/10.1542/pir.2018-0126>.

Wong, G.W.K. *et al.* (2018) 'Pediatric allergy and immunology in China', *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 29(2), pp. 127–132. Available at: <https://doi.org/10.1111/pai.12819>.

Xu, L.-Z. *et al.* (2020) 'Chimeric specific antigen epitope-carrying dendritic cells induce interleukin-17(+) regulatory T cells to suppress food allergy', *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 50(2), pp. 231–243. Available at: <https://doi.org/10.1111/cea.13528>.

Young, E. (1991) 'Atopy, allergy and the alimentary canal', *The Proceedings of the Nutrition Society*, 50(2), pp. 299–303. Available at: <https://doi.org/10.1079/pns19910039>.

Yu, W., Freeland, D.M.H. and Nadeau, K.C. (2016) 'Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy', *Nature reviews. Immunology*, 16(12), pp. 751–765. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.111>.

Zakzuk, J., Lozano, A. and Caraballo, L. (2021) 'Allergological Importance of Invertebrate Glutathione Transferases in Tropical Environments', *Frontiers in Allergy*, 2. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/falgy.2021.695262> (Accessed: 4 February 2022).

Zarif, A. (2020) 'Advances in Food Allergy Treatment', *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 93(5), pp. 749–758.

Zhao, Y.-W. *et al.* (2021) 'Genome-Wide Analysis of the Glutathione S-Transferase (GST) Genes and Functional Identification of MdGSTU12 Reveals the Involvement in the Regulation of Anthocyanin Accumulation in Apple', *Genes*, 12(11), p. 1733. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes12111733>.

## Anexos.

### **Desarrollo de una proteína recombinante.**

Con la finalidad de mejorar el diagnóstico y la terapéutica de las alergias alimentarias, la siguiente parte del proyecto es el desarrollo de una proteína recombinante de alguna de las nuevas proteínas identificadas, particularmente la que se repite en más muestras como una primera aproximación.

Para poder lograr esta tarea se necesita la extracción del RNA de la manzana para poder trabajar con los genes responsables de la síntesis de las proteínas alergénicas.

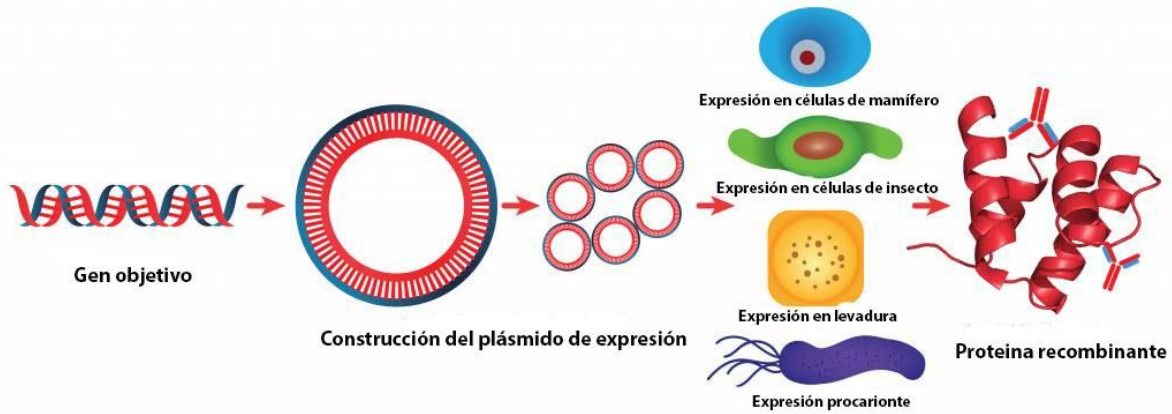


Figura 42. Esquema sobre el desarrollo de una proteína recombinante.

La figura 42 muestra el esquema del desarrollo a seguir para la producción de una proteína recombinante.

### Extracción de RNA.

Con la finalidad de poder desarrollar una proteína recombinante de los alérgenos identificados en el presente proyecto, se realiza la extracción del RNA a partir de la pulpa de la manzana. Se utiliza un método utilizado previamente para la extracción del DNA del durazno, el cual fue probado para la extracción del RNA de la manzana (*Malus domestica*), basado en un buffer de extracción de CTAB y la precipitación selectiva de RNA con LiCl.

Se utiliza un buffer de extracción que contiene:

2.5% CTAB

2% PVPP

25mM EDTA

2m NaCl

100mM Tris-HCl



## 5% $\beta$ -mercaptoetanol

El material de trabajo debe ser esterilizado en autoclave dos veces previo a la realización del método. A continuación, se describe el método.

1. Se cortan aproximadamente 4g de pulpa de manzana de la variedad Red Delicious y se pulverizan con mortero de acero inoxidable con adición de nitrógeno líquido.
2. El polvo fino resultante se añade a 6 microtubos con capacidad de 2mL y se le añaden 500  $\mu$ L de buffer de extracción, el procedimiento se realiza en hielo.
3. La muestra se incuba a 65°C con agitación de 500rpm durante 30 min.
4. Posteriormente, la muestra se centrifuga a 16,000 x  $g/10^{\circ}\text{C}/8$  min.
5. La fase superior se recupera y se coloca en un microtubo nuevo de 1.7mL.
6. A la muestra se le añade un volumen equivalente (el volumen que se obtiene es aproximadamente 750 $\mu$ L) de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agita por inversión manual cuidadosamente 15 veces y se centrifuga a 16,000 x  $g/10^{\circ}\text{C}/8$  min.
7. La fase superior se recupera y se coloca en un microtubo nuevo de 2 mL.
8. Se le adiciona un volumen equivalente de cloroformo (el volumen aproximado que se obtiene es aproximadamente 700 $\mu$ L) y se le añade un volumen de una solución que contiene fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agita unas 15 veces por inversión manual.
9. La muestra se incuba durante 10 min en hielo y se centrifuga a 16,000 x  $g/10^{\circ}\text{C}/8$  min.

10. Posteriormente, la fase superior se transfiere a un microtubo de 1.7mL nuevo, al cual se le añade un volumen (~650µL) de una solución que contiene cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla por inversión manual gentilmente 15 veces y se centrifuga a 16,000 x g/10°C/8 min.
11. La fase superior se recupera y se coloca en 4 microtubos de 1.7mL nuevos, se les añade un volumen de NaCl 5M (volumen aproximado 500µL) y un volumen de alcohol isopropílico (~500µL), se agita gentilmente por inversión manual 15 veces y se incuba a -20°C durante 3 días.
12. Al término de la incubación, el botón se mediante centrifugación a 16,000 xg/10°C/20 min y se le añaden 600µL de buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) y 300µL de una solución que contenga LiCl 10M para obtener una concentración final de LiCl de 3.3M. Se agita gentilmente por inversión manual 15 veces y se incuba 3 días a 4°C.
13. El botón se recupera por centrifugación a 16,000xg/10°C/30 min.
14. Se realizan tres lavados de 200µL con etanol al 70% enfriado previamente a -20°C.
15. La muestra se centrifuga a 16,000xg/10°C/20 min.
16. Finalmente, los tubos se decantan y se dejan secar dentro de una campana de flujo laminar durante 30 minutos.
17. El botón resultante se resuspende en 10µL de agua DEPC.

Para corroborar la integridad del RNA extraído se corre un gel agarosa al 1%.

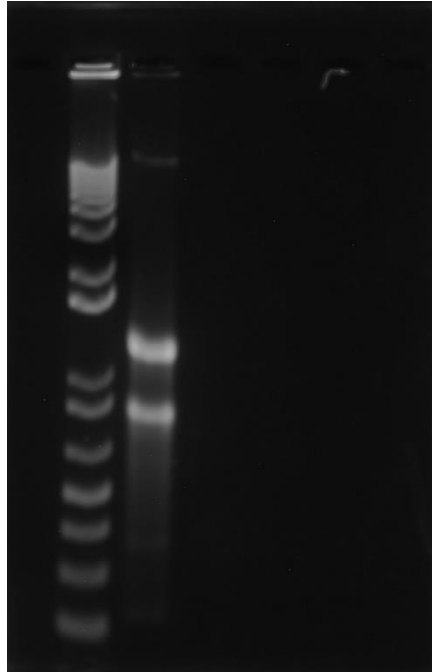


Figura 43. RNA extraído de la pulpa de la manzana.

#### **Obtención del cDNA.**

#### **Obtención del cDNA.**

Mediante la utilización de la enzima transcriptasa inversa RevertAid (Thermo Scientific, No. Cat. EP0441) se realiza la conversión de los mRNA hacia cDNA, para una futura amplificación de un gen en particular. La figura 44 muestra un gel de agarosa donde se observa el probable cDNA obtenido a partir de este procedimiento.

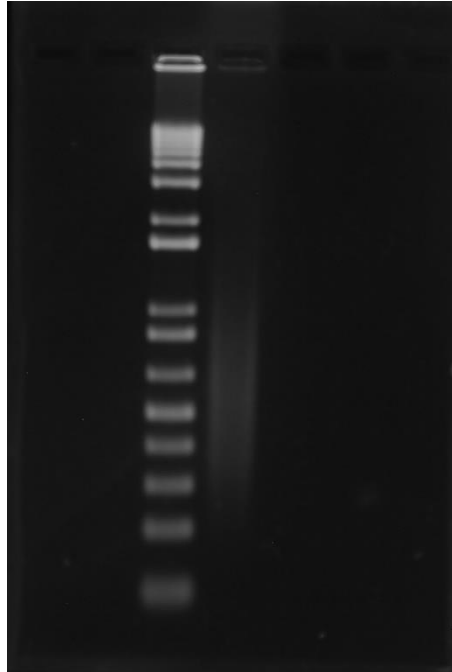


Figura 44. Gel de agarosa al 1% donde se carga el cDNA obtenido mediante el método descrito

El siguiente paso es corroborar la integridad del cDNA amplificado mediante la utilización de un gen “housekeeping” el cual puede ser GADPH que se expresa en manzana y que se ha visto ser estable.