



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS**  
**“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**

**Caracterización de alérgenos del polen de fresno  
mediante co-inmunoprecipitación**

## **TESIS**

PARA OBTENER EL:  
GRADO DE ESPECIALISTA  
EN  
**ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

PRESENTA:  
**JOSÉ FERNANDO LAZARINI RUIZ**

TUTOR DE TESIS  
LUIS M. TERÁN JUÁREZ

ASESOR DE TESIS  
JUAN CARLOS VIZUET DE RUEDA



TLALPAN, CIUDAD DE MÉXICO  
06 de Octubre 2023



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**

Al Dr. Luis M. Terán sin usted, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado. Sus consejos fueron siempre útiles, las ideas para escribir lo que hoy he logrado.

A mis maestros de especialidad, al Doctor Fernando Ramírez y el Doctor Gandhi Pavón, sus conocimientos rigurosos y precisos, a ustedes mis profesores, les debo mis conocimientos. Donde quiera que vaya, los llevare conmigo en mi transitar profesional. Gracias por su paciencia, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia.

Al Doctor Juan Carlos Vizuet de Rueda, gracias por ayudarme en la realización de esta tesis y por siempre presionarme a ser mejor.

Al doctor Josaphat Montero y a mis compañeros de laboratorio Israel, Raúl y Armando, por apoyarme en la realización de experimentos para esta tesis.

A mi esposa Scarlett gracias por apoyarme, por aguantarme y por ser siempre la roca que me sostiene y el motor que me impulsa a cumplir mis sueños te amo.

A mis padres Juan y Carmen, mis hermanos Juan, Ericka y Vero que estuvieron siempre a mi lado y han sido mis mejores guías de vida. Hoy que concluyo mis estudios, les dedico a ustedes este logro, una meta más conquistada.

Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

Mis compañeros residentes y amigos de esta especialidad tan increíble, por fin culminamos esta aventura y no puedo dejar de recordar cuantas mañanas y horas de trabajo nos juntaron a lo largo de nuestra formación. Nos toca cerrar un capítulo en esta historia de vida, gracias por su apoyo y constancia, al estar en las horas más difíciles, por compartir horas de estudio. Gracias por estar ahí.

---

Dr. Juan Carlos Vázquez García  
Titular de la Dirección de Enseñanza

---

Dra. María del Carmen Cano Salas  
Titular de la Subdirección de Enseñanza

---

Dra. Dayanna Lorelly Álvarez Monter  
Titular del Departamento de Formación de Posgrado

---

Dr. Luis Manuel Terán Juárez  
Profesor Titular de la Especialidad de Alergia e Inmunología clínica

---

Dr. Juan Carlos Vizuet de Rueda  
Asesor de Tesis

# ÍNDICE

1	Marco teórico.....	2
1.1	Alergia.....	2
1.1.1	Antecedentes históricos.....	2
1.1.2	Fisiopatología.....	3
1.1.3	Polinosis.....	7
1.2	Lamiales.....	9
1.2.1	Oleáceas.....	9
1.3	Método de identificación de nuevos alérgenos.....	15
1.3.1	Identificación por geles 2D.....	16
1.4	Co-inmunoprecipitación.....	18
2	Antecedentes.....	20
3	Planteamiento del problema.....	21
4	Justificación.....	21
5	Hipótesis.....	22
6	Objetivos.....	22
6.1	Objetivo general.....	22
6.2	Objetivos específicos.....	22
7	Metodología.....	22
7.1	Consideraciones éticas.....	22
7.2	Tipo y diseño de estudio.....	23
7.3	Población.....	23
7.4	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	24
7.4.1	Inclusión.....	24
7.4.2	Exclusión.....	25
7.4.3	Eliminación.....	25
7.5	Recolección del polen.....	25
7.6	Extracción de proteínas.....	25
7.7	Cuantificación de proteínas.....	26
7.8	Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida.....	27
7.9	Co-inmunoprecipitación.....	27
7.9.1	Pre-clareo.....	27

7.9.2	Inmunoprecipitación .....	27
7.9.3	Elución:.....	29
7.10	Análisis por Espectrometría de Masas .....	29
7.11	Búsqueda de proteínas.....	30
8	Resultados.....	30
8.1	Primer Co-IP .....	32
8.2	Segunda Co-IP.....	39
9	Discusión .....	45
10	Conclusiones .....	50
11	Perspectivas a futuro.....	50
12	Bibliografía .....	52

# **Caracterización de alérgenos del polen de fresno mediante co-inmunoprecipitación**

## **Resumen**

La prevalencia de la rinitis alérgica en el mundo se estima en casi un 40%, mientras que 241 millones de personas a nivel mundial tienen diagnóstico de asma. En México el árbol del fresno es el principal polen reportado causante de sensibilización en nuestra población. En las bases de datos se reporta un alérgeno del fresno (Ole e-1 like) aunque en la literatura existen otras proteínas de unión a IgE como ortólogos de la principal oleacea estudiada, el ligustrum. La manera tradicional de encontrar nuevos alérgenos es por medio de geles 2D, esta técnica tiene desventajas, como el costo y que es una técnica operador-dependiente. Se utilizó una técnica llamada co-inmunoprecipitación, la cual se basa en identificar complejos antígeno-anticuerpo unidos a una perla de agarosa para después realizar lavados y por espectrometría de masas tener el reporte de proteínas. Se utilizó el suero de 9 pacientes que se dividieron en: pacientes con sensibilidad a todas las plantas de la familia oleaceae, pacientes con sensibilidad a fresno y pacientes sin atopia. Se realizaron dos ensayos de co-inmunoprecipitación. Se encontró el principal alérgeno de las Oleáceas por lo que se decidió repetir la co-inmunoprecipitación con los siguientes cambios: se incrementó 4 veces la cantidad de proteínas, se cambió el orden de incubación del suero y los extractos proteicos y se pasaron los sueros por columnas de exclusión molecular con la finalidad de enriquecer y limpiar la cantidad de IgE. Se encontraron 3 proteínas que no se encuentran descritas en el fresno, pero sí en el olivo: superóxido dismutasa, poligalaturonasa y ciclofilina. Estas se encuentran como Ole e 5, Ole e 14 y Ole e 15, este trabajo nos da la pauta para catalogar estas proteínas como ortólogos del olivo en el fresno y poder nombrarlas como Fra e 5, Fra e 14 y Fra e 15. Se reportaron 5 proteínas más que ya están reconocidas como alérgenos en otras especies. Se realizó alineamiento entre las secuencias reportadas y las que ya existen en bases de datos y modelado en 3D de enolasa y la tioredoxina en las que se encontró una gran similitud. Esto da la pauta para reconocer estas proteínas como alérgenos del fresno.

# **Caracterización de alérgenos del polen de fresno mediante co-inmunoprecipitación**

## **1 Marco teórico**

### **1.1 Alergia**

#### **1.1.1 Antecedentes históricos**

La primera reacción alérgica que se conoce en la historia es la muerte del faraón egipcio Menes por la picadura de una abeja en el 2641 ac, en 1981 el médico británico John Bostok acuña el término fiebre del heno a los síntomas nasales y oculares que ocurren en el verano. Clemen Von Pirquet en 1906 fue el primero en utilizar el término “Alergia” (Ravindra et al., 2022). En 1919 el Dr. Ramírez encontró a un paciente con anemia aplásica que había tenido un ataque de asma mientras se encontraba andando a caballo, el paciente había recibido previamente una transfusión y el donador era alérgico a los caballos (Ravindra et al., 2022; J. Wang et al., 2023).

En 1921 Pusnitz y Kütsner fueron capaces de sensibilizar la piel de sujetos sanos con resultados positivos en pruebas cutáneas, a este método lo llamaron PK (Johansson, 2016). Unos años después, en 1937, Daniel Bovet sintetizó los primeros antihistamínicos, con lo que inicia una nueva era en el tratamiento de las enfermedades alérgicas; por este descubrimiento recibió el Premio Nobel en 1957 (Ravindra et al., 2022).

No fue hasta 1966 cuando Kimishige y Tiruko Iszhaka, y gracias a los descubrimientos de Ramirez, Pusnitz y Kütsner, logran sintetizar por primera vez la inmunoglobulina E (IgE) (Ravindra et al., 2022; J. Wang et al., 2023). En 1989 el epidemiólogo Strachan redacta la hipótesis de la higiene, en la que señala que la reducción en la frecuencia de las infecciones contribuye directamente al incremento



en la frecuencia de enfermedades autoinmunes e hipersensibilidades (Johansson, 2016; Ravindra et al., 2022; J. Wang et al., 2023). Esta hipótesis fue una base para estudiar la fisiopatología de las enfermedades alérgicas desde el punto de vista de la inmunología y la infectología. Existe una gran cantidad de alérgenos en el medio ambiente, entre los principales se encuentra el polen de los árboles y pastos, proteínas de los ácaros del polvo, las cucarachas y caspa o saliva de mamíferos como los gatos y perros (Bach, 2018; Ravindra et al., 2022).

La prevalencia de la rinitis alérgica (RA) en el mundo se estima en casi un 40%, mientras que 241 millones de personas a nivel mundial tienen diagnóstico de asma (J. Wang et al., 2023). En América se encontró que un 54.5% de los habitantes presentan síntomas de enfermedad alérgica (Johansson, 2016; J. Wang et al., 2023). La alergia al polen es considerada como un importante problema de salud pública que provoca morbilidad y afecta posteriormente la calidad de vida del paciente (J. Wang et al., 2023). En las últimas décadas, la prevalencia de alergia al polen ha aumentado debido a la urbanización, la contaminación del aire y el cambio climático, especialmente en áreas urbanas (Pavón-Romero et al., 2022a; Stern et al., 2020; J. Wang et al., 2023).

Para entender el mecanismo fisiopatológico de la alergia lo podemos dividir en dos fases, la primera es la sensibilización alérgica la cual puede tener un componente familiar y la segunda fase que es una reexposición al alérgeno (Wise et al., 2023). Que un paciente sea capaz de desarrollar una respuesta mediada por linfocitos, inmunoglobulina E (IgE) y mastocitos es heredada por pacientes atópicos, la segunda fase (Skoner, 2001).

### **1.1.2 Fisiopatología**

La sensibilización inicia con la exposición a diferentes concentraciones de alérgenos durante períodos prolongados de tiempo, esto ocasiona que en nuestro organismo haya interacción entre las células presentadoras de antígenos a los linfocitos T

CD4+ (Figura 1). Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), como los macrófagos y las células dendríticas, capturan el alérgeno. Estos transmiten señales que liberen interleucinas (IL) IL-5, IL-9, IL-13 y otras citocinas TH2. Estas citocinas conducen a diversos procesos proinflamatorios (Skoner, 2001). Una vez que los linfocitos T CD4+ han sido activados por la presentación de antígeno y han liberado citocinas, se inicia el proceso de cambio de isotipo, que es la conversión de anticuerpos de un isotipo a otro. En el contexto de la alergia, el cambio de isotipo es a inmunoglobulina E (IgE) (Skoner, 2001; Wise et al., 2023).

Una vez que el paciente se encuentra sensibilizado, sigue la siguiente fase que es la reexposición (Figura 1). Esta fase inicia con la liberación de alarminas (IL-25, IL33 y TSLP) y aumenta el número de mastocitos recubiertos de IgE que atraviesan el epitelio respiratorio y que son capaces de reconocer el alérgeno depositado en las mucosas y comenzar con la desgranulación (Skoner, 2001; Wise et al., 2023). Los productos liberados en la desgranulación incluyen mediadores preformados como la histamina y la triptasa (Wise et al., 2023). A su vez los mastocitos secretan varios mediadores inflamatorios que no se encuentran en los gránulos como la prostaglandina D2 (PGD2) y los leucotrienos LTC4, LTD4 y LTE4. Estos mediadores hacen que los vasos sanguíneos se filtren y produzcan el edema de las mucosas y haya un aumento de secreciones (síntomas característicos en enfermedades atópicas) (Skoner, 2001). Las glándulas secretan compuestos antimicrobianos que van a dilatar los vasos sanguíneos. Estos mediadores también estimulan los nervios sensoriales, que transmiten las sensaciones de picor y congestión nasal, y reclutan reflejos sistémicos como los estornudos o la tos (O'Hehir et al., 2017; Skoner, 2001; Wise et al., 2023).

Los linfocitos T-helper son los coordinadores de la respuesta inflamatoria crónica a los alérgenos (Wise et al., 2023). Las citocinas liberadas por los linfocitos TH2 y otras células pueden circular hasta el hipotálamo y resultar en fatiga, malestar, irritabilidad y déficits neurocognitivos que comúnmente se observan en pacientes con RA y asma (O'Hehir et al., 2017; Skoner, 2001).

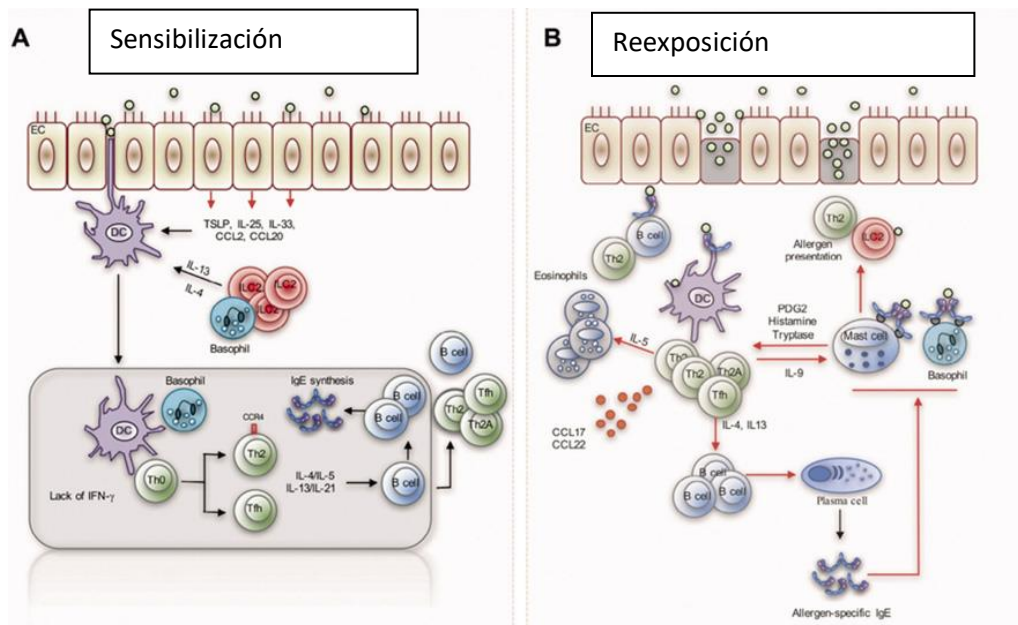


Figura 1. Esquema donde se representan las dos fases de la fisiopatología de la alergia. **(A)** Sensibilización a nuevos alérgenos en contacto con la mucosa se secretan alarminas (IL-25, IL33, TSLP), que junto a la IL-13 e IL-4 son las responsables de que las células presentadoras de antígeno inicien una respuesta TH2 para que se pueda realizar el cambio de isotipo de la inmunoglobulina por las células B. **(B)** Durante la exposición posterior a alérgenos, el reconocimiento facilitado por IgE de alérgenos a través de Fc $\epsilon$ R1 en células dendríticas y Fc $\epsilon$ R2 en células B amplifica el desarrollo de respuestas TH2 a alérgenos inhalados, con la liberación de histamina. (Tomado de Shamji & Durham, 2017).

La IL-4 y la IL-13 desempeñan un papel crucial en la síntesis de IgE mediante el cambio de isotipo de los linfocitos B (Kelly & Grayson, 2016; O'Hehir et al., 2017).

### 1.1.2.1 Inmunoglobulina E

La inmunoglobulina E (IgE) se asocia principalmente con enfermedades alérgicas y juega un papel en la respuesta inmunitaria excesiva o inapropiada a antígenos (Kelly & Grayson, 2016). Después de que se ha generado la IgE específica para un antígeno en particular, si el huésped se expone nuevamente a ese antígeno, esto

desencadena la típica reacción de hipersensibilidad inmediata tipo I (Kelly & Grayson, 2016; O’Hehir et al., 2017).

La IgE al igual que el resto de las inmunoglobulinas está conformado por dos cadenas pesadas idénticas y por dos cadenas ligeras idénticas de aminoácidos. Las cadenas ligeras carecen de los dominios transmembranales. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por una serie específica de puentes disulfuro. (O’Hehir et al., 2017). Cada cadena pesada o cadena ligera tiene dos dominios principales, denominados región constante (C) y una región variable (V). Cada dominio es responsable de una función especializada (Geha et al., 2003; Kelly & Grayson, 2016) (Figura 2A).

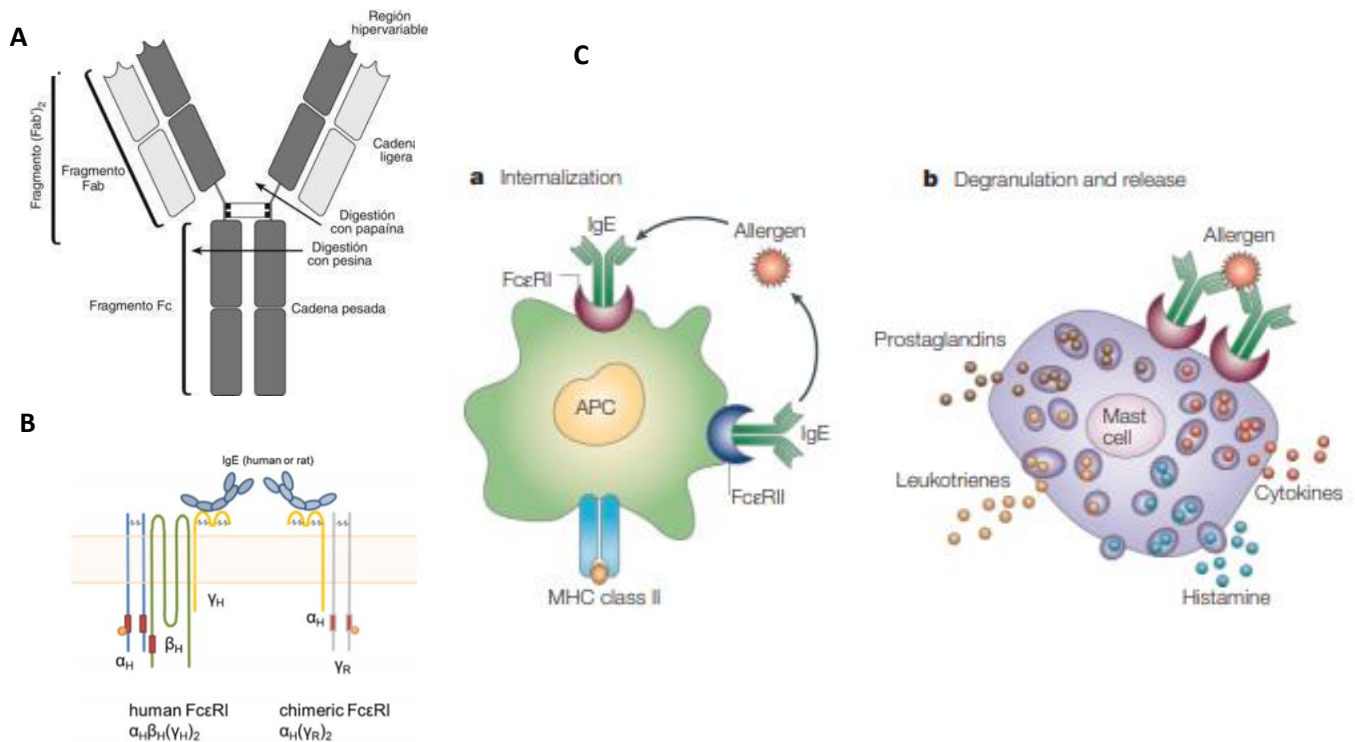


Figura 2. Estructura de la IgE, su receptor y papel en las células APC y MC. (A) Estructura de la IgE. Se puede observar la región variable en la parte superior de las cadenas ligeras de color gris claro y la región constante con color más oscuro. (B) Receptores identificados de la IgE humana. (C) Reconocimiento de los antígenos por la IgE anclado a los receptores de los mastocitos, el reconocimiento de la IgE por la FcεRI de la célula presentadora de antígeno al entrar en contacto

por un alérgeno y la posterior degranulación por parte de los mastocitos donde se liberan prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e histamina. (Tomado de O’Hehir et al., 2017; Ramos-Bello & Llorente, 2009).

Existen dos receptores identificados para la IgE, que son el FcεRI y CD23 (también conocido como FcεRII) (Figura 2B). El receptor FcεRI es de alta afinidad para la IgE, y su estructura está compuesta por un tetrámero, específicamente por las subunidades αβγ2, presente en mastocitos y basófilos. Mientras tanto, en otras células del sistema inmune como monocitos, células dendríticas, eosinófilos y plaquetas, FcεRI se presenta como un trímero, concretamente αγ2 (Geha et al., 2003).

El receptor FcεRII, el cual es un receptor de baja afinidad por la IgE, interactúa con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase II para facilitar el procesamiento de antígenos. CD23 también tiene un correceptor, CD21, que estimula la síntesis de IgE cuando se une a la forma trimérica de CD23 e inhibe la síntesis de IgE cuando se une a CD23 monomérico (Geha et al., 2003; Kelly & Grayson, 2016; O’Hehir et al., 2017).

La IgE humana tiene un peso molecular de 190 kD y una vida media en torrente sanguíneo de 2 días, los alérgenos inhalados activan los mastocitos sensibilizados al ser reconocidos por la IgE que está unida a la superficie celular, lo que da lugar a la liberación de varios mediadores broncoconstrictores, como los cisteinil leucotrienos (cis-LT) y la PGD2 (Kelly & Grayson, 2016; O’Hehir et al., 2017) (figura 2C).

### **1.1.3 Polinosis**

El término polinosis fue introducido por Bostock en 1819 para describir la alergia al polen, la cual es una enfermedad estacional que aparece junto con la floración de los cereales y de las praderas (fiebre del heno) (Terán et al., 2009). El polen es uno

de los principales aeroalérgenos. Es el gametofito masculino de las plantas con semilla, conocidas como espermatofitas, que se dividen en dos categorías: las gimnospermas y las angiospermas. Las semillas de estas plantas desempeñan un papel esencial al proteger al embrión de condiciones desfavorables para el crecimiento y facilitar su dispersión lejos de la planta madre. Esta característica confiere a las espermatófitas la capacidad de colonizar y adaptarse a una amplia variedad de hábitats diferentes (Gilles et al., 2009; Smith et al., 2014; Terán et al., 2009).

Los granos de polen juegan un papel importante en las enfermedades alérgicas, ya que contienen material antigénico que puede desencadenar reacciones alérgicas en algunas personas (Smith et al., 2014). Los alérgenos más destacados son las proteínas y polipéptidos, pero también los polisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas pueden tener este efecto. Los lípidos también desempeñan un papel importante en los granos de polen, forman una parte significativa de la exina y el exudado del polen (Gilles et al., 2009). En particular, los mediadores lipídicos asociados al polen (PALMs) son cruciales para la fertilización de la planta, ya que ayudan al tubo polínico a atravesar el estigma (Gilles et al., 2009; Smith et al., 2014).

En un estudio realizado en el 2020 por Pavón et al. en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en la Ciudad de México se encontró que los polenes con mayor prevalencia de sensibilización en México son árboles de la familia Oleaceae: *Fraxinus excelsior* (18%), *Olea europaea* (15%) y *Ligustrum lucidum* (14.2%). Seguidos de *Betula verrucosa* (14.2%), *Quercus alba* (14%), *Quercus rubra* (14%), *Juniperus californica* (12.1%), *Juniperus virginiana* (10.1%), *Cupressus arizonica* (9.8%) y *Alnus verrucosa* (9.6%) (Pavón-Romero et al., 2022b) (Figura 3).

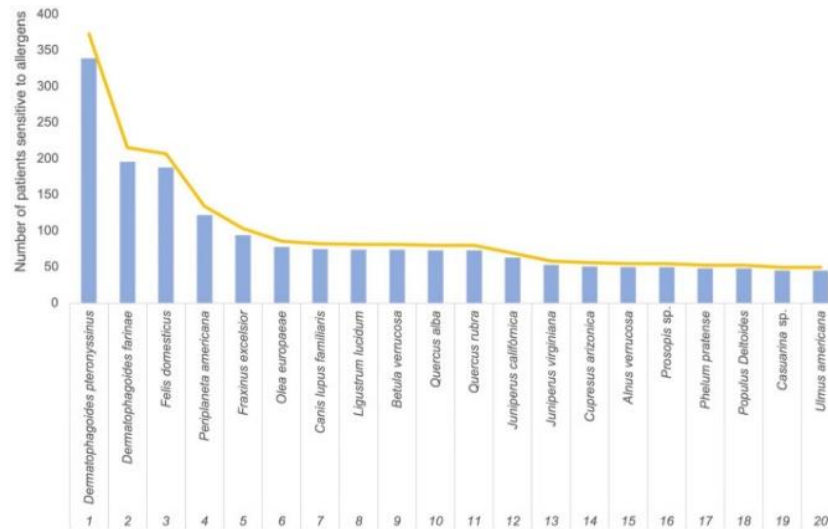


Figura 3. Principales especies que generan alergia en la CDMX. La principal sensibilización a aeroalérgenos en la prueba de punción cutánea. (Tomada de Pavón-Romero et al., 2022b).

## 1.2 Lamiales

Los lamiales (eudicotiledóneas/asterídeas) son uno de los mayores órdenes de plantas con flores, con representantes que se encuentran en todo el mundo. Se compone de 23 familias: Acanthaceae, Bignoniaceae, Byblidaceae, Calceolariaceae, Carlemanniaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Linderniaceae, Martyniaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Paulowniaceae, Pedaliaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Plocospermataceae, Schlegeliaceae, Scrophulariaceae, Stilbaceae, Tetrachondraceae, Thomandersiaceae, Verbenaceae (Schäferhoff et al., 2010). Los miembros de los lámiales se encuentran en una variedad de hábitats, desde regiones templadas hasta tropicales y abarcan una amplia gama de formas de vida, incluyendo árboles, arbustos, hierbas y algunas lianas (Schäferhoff et al., 2010).

### 1.2.1 Oleáceas

La familia Oleaceae es una familia de plantas con una amplia distribución en todo el mundo. Esta familia incluye alrededor de 600 a 900 especies pertenecientes entre 25-35 géneros diferentes (Liccardi et al., 1996). Los miembros más conocidos de esta familia son el olivo (*Olea europaea*), la lila (*Syringa spp.*), el trueno (*Ligustrum spp.*) y el fresno (*Fraxinus spp.*). Estas especies tienen relevancia clínica, siendo *Olea europea* la más importante, su polen es considerado uno de los aeroalérgenos más destacados dentro de la familia Oleaceae (Liccardi et al., 1996). Sumando a que en Europa es el árbol con mayor distribución y por ende uno de los más estudiado (Bousquets et al., 1985).

En España la alergia al polen de olivo representa un importante problema de salud durante la temporada de polinización. Aunque el olivo es el aeroalérgeno más importante dentro de esta familia, en México no se cuenta con una amplia distribución de este árbol (Figura 4) y se ha encontrado que la reactividad cruzada es alta entre los miembros de la familia Oleaceae (Bousquets et al., 1985; Weber, 2001, 2013).

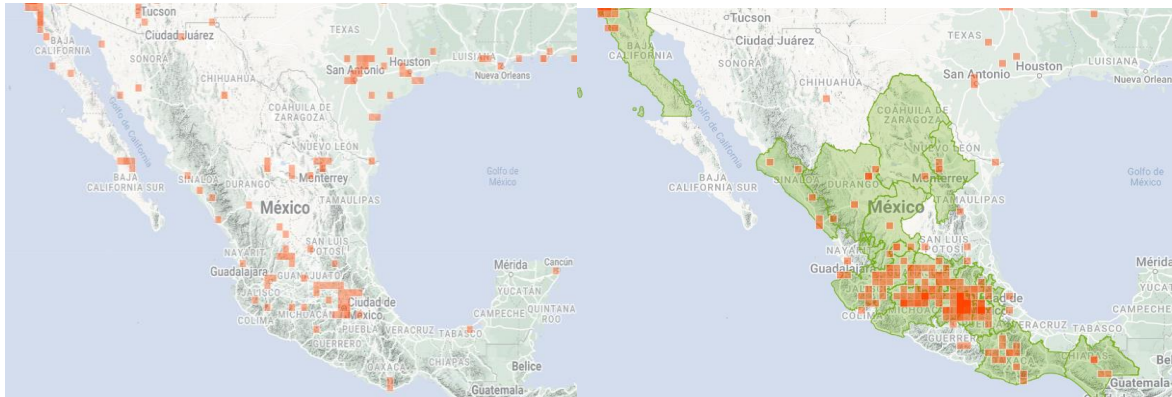


Figura 4. Mapa de distribución en México del fresno (imagen izquierda) y del olivo (imagen derecha). (Tomada de [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/53-oleac1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/53-oleac1m.pdf)).

### 1.2.1.1 Fresno

El género *Fraxinus*, conocido comúnmente como fresno, incluye alrededor de 45 a 65 especies diferentes que se distribuyen en diversas regiones del hemisferio norte, principalmente en América del Norte (Figura 4), Europa y Asia (Comisión Nacional



Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad (CONABIO). El fresno es una especie perennifolia o caducifolia que puede alcanzar una altura de 15 a 20 metros, llegando incluso a los 30 metros, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1 metro. Su copa es compacta y redondeada hacia la punta, proporcionando una sombra densa. Las hojas son pinnaticompuestas, opuestas y sueltas, con una longitud de 20 a 30 centímetros. Contiene folíolos que son ovado-lanceolados, con un margen entero o ligeramente serrado hacia la punta. El tronco del árbol es recto y presenta ramas ascendentes. La corteza externa es de color gris claro a café oscuro, agrietada y con placas cuadrangulares. Las flores son unisexuales y se encuentran en panículas estaminadas y pistiladas, con racimos estaminados cortos y densos, y racimos pistilados de unos 5 centímetros de largo. Las flores son diminutas, de color verde a rojizo y carecen de pétalos, teniendo un cáliz campanulado. El fruto es una sámara elongada y alada, que contiene una sola semilla y crece en racimos densos de 15 a 20 centímetros de largo. La semilla tiene un cuerpo rollizo de 2.5 a 6 centímetros de largo por 0.6 centímetros de ancho, con un ala oblonga a espatulada, delgada, lisa y de color amarillo a café (Figura5) (Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad (CONABIO)).



Figura 5. Imagen del árbol del Fresno, hojas y frutos, granos de polen visto por microscopía electrónica. (Tomada de [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/53-oleac1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/53-oleac1m.pdf)).

La temporada de polinización del fresno puede variar según la ubicación geográfica y las condiciones climáticas locales, pero generalmente ocurre en primavera. En México la polinización se lleva a cabo durante todo el año, pero es mayor en temporada de invierno (Figura 6) (Calderon-Ezquerro et al., 2018). El aumento de las temperaturas como el incremento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> tienen el efecto de aumentar la producción de polen. Se ha identificado incrementos en la cantidad de polen y en la duración de la temporada de polen a lo largo del tiempo, siendo estos cambios frecuentemente asociados con variaciones en la temperatura (Calderon-Ezquerro et al., 2018; Smith et al., 2014; Terán et al., 2009).

Con el efecto invernadero del calentamiento global además del aumento en la contaminación y por lo tanto de partículas PM<sub>2.5</sub> se describe que las polinizaciones son más frecuentes en el caso del fresno encontrándose durante todo el año (Calderon-Ezquerro et al., 2018; Pavón-Romero et al., 2022b).

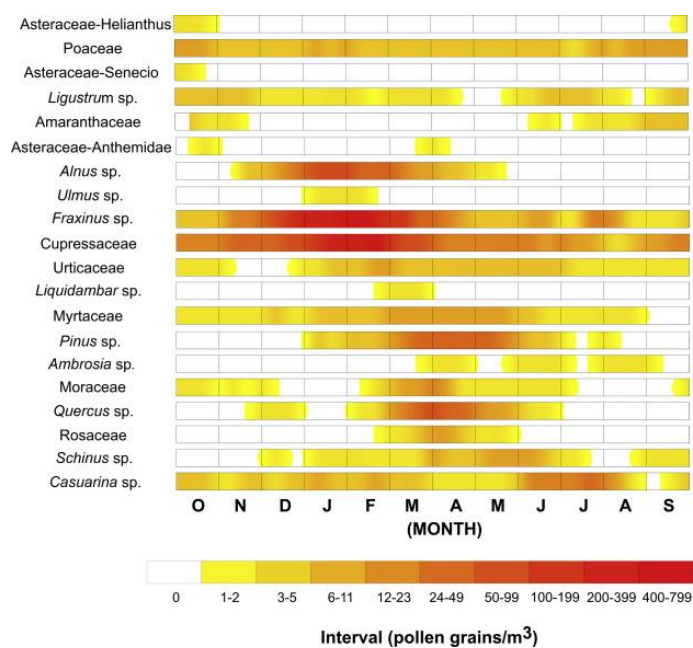


Figura 6. Calendario polínico de la Ciudad de México. Se puede observar la polinización de *Fraxinus* sp. durante todo el año, con un pico en los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero. (Tomada de [www.slaai.blogspot.com/2019/03/polen-en-la-atmosfera-de-mexico-y-su.html](http://www.slaai.blogspot.com/2019/03/polen-en-la-atmosfera-de-mexico-y-su.html)).

### 1.2.1.1.1 Alérgenos del fresno

El fresno cuenta con un alérgeno (Fra e 1) reconocido por la organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) (WHO & IUIS, n.d.). Aunque se han encontrado y descrito 9 alérgenos que aún no se encuentran en la base de datos de la WHO (Asturias et al., 1997). El alérgeno Fra e 1 es reconocido como el principal alérgeno con una incidencia de casi un 90% según la WHO (WHO & IUIS, n.d.). Este alérgeno es similar a Ole e 1 de olivo, se expresa durante el desarrollo de la antera, se almacena en el retículo endoplásmico rugoso y participa en el crecimiento del tubo polínico. Fra e 1 muestra una alta identidad de secuencia de aminoácidos con otros alérgenos reconocidos como Ole e 1, Syr v 1, and Lig v 1, olivo, lili y trueno respectivamente (Barderas et al., 2005) (Figura 7).

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	273 bits(699)	3e-101	Compositional matrix adjust.	126/145(87%)	135/145(93%)	0/145(0%)
Fra e 1	1	EDIPQPPVSQFHIQGQVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLRLQCKDKENGDVTFTEVGYTR				60
Ole e 1	1	EDVPQPPVSLFYVQGQVYCDTCRAGFITELSEFIQAGVRLQCKDKENGKVTFTTEVGYTR				60
Fra e 1	61	AEGLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWAKPSLKFILNTVNGTTRTVNPL				120
Ole e 1	61	AEGLYSMVIERDHKNEFCEIVLLSSSRKDCDEIPTEGWVKPSLKFILNTVNGTTRTINPL				120
Fra e 1	121	GFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM		145		
Ole e 1	121	GFFKKEVLPKCPQVYNKLGMYPPNM		145		

Figura 7. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de Ole e 1 y Fra e 1, en el que se muestra una identidad del 87%.

La mayoría de los estudios sobre alergenicidad y reactividad cruzada con especies de la familia Oleaceae se han realizado utilizando sueros de pacientes sensibilizados en áreas mediterráneas. En estas poblaciones se ha encontrado que muchas personas con alergias presentan sensibilidad tanto al polen de fresno como al de olivo (Weber, 2013). La sensibilización al polen de fresno en estas áreas mediterráneas se debe principalmente a la reactividad cruzada con alérgenos

presentes en el polen de olivo, que es la principal causa de alergia relacionada con Oleaceae en estas regiones. Por otro lado, en áreas de Europa Central y Norte donde el fresno crece ampliamente, este árbol podría ser el principal responsable de las alergias relacionadas con la familia Oleaceae (Barderas et al., 2005; Hemmer et al., 2000; Niederberger et al., 2002). Mas y colaboradores en 2014 lograron identificar proteínas de fresno reactivas con anticuerpos y las denominaron como: Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 11 y Fra e 12, de acuerdo con los homólogos del olivo (Mas et al., 2014).

El alérgeno Fra e 2 es una profilina, está presente en todas las células eucariotas y tiene un tamaño aproximado de 12-15 kDa. Juega un papel importante en la organización del citoesqueleto y en la transducción de señales dentro de la célula. Actúa como una proteína que se une a la actina y regula la dinámica de los filamentos de actina durante procesos esenciales como el movimiento celular, la citocinesis y la señalización celular (Asturias et al., 1997; WHO & IUIS, n.d.). Fra e 3 es una polcalcina, está involucrada en regular los niveles de calcio para facilitar la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico. Esto se debe a la presencia de otras proteínas de unión al calcio en el polen que también desempeñan un papel en estos procesos (Ledesma et al., 1998; WHO & IUIS, n.d.). Fra e 7 es una proteína de transferencia de lípidos no específicas, ha sido identificada en varias plantas y se sugiere que está involucrada en la transferencia de lípidos entre membranas celulares. Estas proteínas son conocidas por su capacidad de unir y transportar lípidos (grasas) en las células vegetales (Tejera et al., 1999; WHO & IUIS, n.d.).

Fra e 9 es una proteína 1,3- $\beta$ -glucanasa, está ampliamente distribuida en plantas superiores, pero su función biológica aún no está clara. Aunque han sido descritas como proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) debido a su inducción en respuesta por patógenos. Otras han sido encontradas como enzimas (PR-like) expresadas durante procesos fisiológicos y de desarrollo de plantas saludables, tales como germinación, senescencia, fertilización y respuestas a condiciones ambientales (Huecas et al., 2001; WHO & IUIS, n.d.). Fra e 11 es una enzima metilesterasa de pectina (PME). Algunos miembros de esta familia se utilizan

comúnmente como estabilizadores en la industria alimentaria, son enzimas presentes en todas las plantas (Huecas et al., 2001). Se ha demostrado que las PME's están involucradas en el desarrollo de las plantas durante el proceso de maduración y crecimiento, a través de la alteración de la pared celular (WHO & IUIS, n.d.). Catalizan la demetilesterificación de los componentes de homogalacturonano de la pectina, liberando metanol como producto de reacción. La pectina es un polisacárido metilado heterogéneo que constituye aproximadamente el 35% del peso seco de las paredes celulares de dicotiledóneas. La pectina está involucrada en el control del grosor de la pared y la adhesión celulares. La desmetilación de la pectina por las PME's cambia notablemente la carga de la molécula de pectina, exponiendo grupos carboxilo negativos que pueden ser entrecruzados por calcio, regulando así las propiedades mecánicas y químicas de la pared celular de la planta (Huecas et al., 2001; WHO & IUIS, n.d.).

Finalmente, Fra e 12, que es una reductasa de isoflavona, tiene como función principal catalizar la reducción de los éteres bencílicos en el monolignol, un componente esencial de la lignina. Durante esta reacción ayuda a modificar y estabilizar los monolignoles, permitiendo su polimerización para formar la compleja estructura de la lignina (Castro et al., 2015). La lignina es una molécula altamente heterogénea, y la diversidad de monolignoles generados por estas enzimas contribuye a la variabilidad en la estructura y propiedades de la lignina en diferentes tejidos y especies vegetales. Además de proporcionar resistencia y rigidez a las plantas, la lignina también juega un papel importante en la defensa contra patógenos y en la adaptación a condiciones ambientales adversas (Nakamura & Teshima, 2013; WHO & IUIS, n.d.).

### **1.3 Método de identificación de nuevos alérgenos**

La forma tradicional de diagnosticar alergias es mediante las pruebas cutáneas (SPT, por sus siglas en inglés). Es un método confiable para diagnosticar enfermedades alérgicas mediadas por IgE en pacientes con rinoconjuntivitis, asma,

urticaria, anafilaxia, eczema atópico y sospecha de alergia a alimentos y medicamentos (Antunes et al., 2009). Además, esta técnica proporciona evidencia de sensibilización, es mínimamente invasivo, económico y con resultados disponibles de inmediato (Oppenheimer & Nelson, 2006).

La interpretación del SPT utiliza la presencia y el grado de reactividad cutánea. Cuando se introducen alérgenos en la piel, los anticuerpos IgE específicos, unidos a los receptores en la superficie de los mastocitos se entrecruzan al ocurrir esto, los mastocitos se degranulan, se libera histamina y otros mediadores (Carr & Saltoun, 2012). Esto produce una respuesta de roncha y enrojecimiento que se puede cuantificar. Se pueden probar muchos alérgenos diferentes simultáneamente, debido a que la reacción resultante a un alérgeno específico está localizada en el área inmediata de la prueba de punción cutánea (Antunes et al., 2009; Carr & Saltoun, 2012; Oppenheimer & Nelson, 2006).

Para identificar nuevos alérgenos es necesario caracterizarlos individualmente, el método tradicional es mediante geles proteicos de 2 dimensiones (2D) (Mani et al., 2015).

### **1.3.1 Identificación por geles 2D**

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) es un método desarrollado hace más de dos décadas. Esta técnica permite una alta resolución de los componentes individuales de los extractos proteicos. La primera dimensión (enfoco isoelectrofocal) se lleva a cabo utilizando geles con un gradiente de pH fijo para separar las proteínas según su punto isoeléctrico (pI). Posteriormente, las proteínas se separan según sus masas relativas en una segunda dimensión mediante un gel en condiciones desnaturizantes. La tinción del gel 2D ya proporciona una imagen visual que permite estimar la calidad de resolución, el número de puntos y la cantidad de proteína en cada punto (Mani et

al., 2015; Nakamura & Teshima, 2013; W. Wang et al., 2003). Las proteínas se transfieren eléctricamente a membranas de polivinilideno fluorado (PVDF) y se incuban con el suero de pacientes sensibles. Esto permite detectar proteínas que se unen a la IgE en el suero de los pacientes empleando un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa que reconoce a la IgE humana (Mani et al., 2015; W. Wang et al., 2003). Los spots inmunorreactivos se cortan y se mandan a analizar individualmente por espectrometría de masas (Mani et al., 2015).

#### **1.3.1.1 Desventajas de la identificación por geles 2D**

Las principales desventajas de identificar potenciales alérgenos con esta técnica es que se puede obstaculizar la separación de proteínas de baja abundancia. El análisis de muestras complejas es difícil debido a la gran cantidad de proteínas esperadas y a la amplia variación en las concentraciones y que se analizan alérgenos desnaturalizados, no nativos (W. Wang et al., 2003). Existen isoformas de las proteínas que podemos ver el spot en el mismo peso molecular, pero se ve en distinto punto isoeléctrico. Cuando las proteínas tienen modificaciones como la fosforilación puede cambiar su peso molecular, afectando el análisis por geles 2D (Mani et al., 2015).

Cada spot que se va a mandar a secuenciar es elegido por el investigador existen algunos de estos spots que no son muy claros, por lo que se vuelve subjetivo y operador dependiente.

#### **1.3.1.2 Espectrometría de masa**

Los espectrómetros de masas están compuestos por tres elementos básicos: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector de iones (Domon & Aebersold, 2006). Las mediciones de espectrometría de masas se realizan generalmente con moléculas ionizadas en fase gaseosa, lo que implica una

necesidad de transferir las moléculas desde una fase líquida o sólida al estado gaseoso (Cramer, 2005).

La técnica de espectrometría de electrospray (ESI) se basa en generar una fina neblina de iones mediante una corriente eléctrica en una entrada de espectrómetro de masas a presión atmosférica. Se ionizan las moléculas directamente desde una solución, lo que permite su fácil integración con métodos de separación líquida. Se reduce el flujo del líquido utilizado para crear el electrospray, lo que resulta en una generación más eficiente de iones (Domon & Aebersold, 2006; W. Wang et al., 2003).

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) por trampa de iones ESI da la posibilidad de obtener no solo información sobre la masa, sino también sobre la secuencia. Un sistema de datos para MS es el poder computacional (hardware y software) dedicado específicamente a la adquisición de datos espectrométricos de masas, su procesamiento y análisis posterior de datos de manera efectiva y automatizada (Domon & Aebersold, 2006). La información de secuencia que contiene los espectros MS/MS se compara con bases de datos de secuencias de proteínas completas utilizando diferentes algoritmos (Cramer, 2005; Domon & Aebersold, 2006).

#### **1.4 Co-inmunoprecipitación**

La co-inmunoprecipitación (Co-IP) es un método utilizado para enriquecer o purificar grupos de proteínas de una mezcla compleja utilizando un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido. Mediante la Co-IP se puede aislar no solo el antígeno de interés, sino también cualquier proteína o ligando que esté unido a él (Tan & Yammani, 2022). La Co-IP es una poderosa herramienta en la investigación proteómica y ha sido utilizada para estudiar diversas cuestiones biológicas, como la identificación de proteínas diana, la caracterización de complejos proteicos y la elucidación de vías de señalización. Su aplicación ha sido fundamental en el



descubrimiento de biomarcadores y en la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a diversas enfermedades (Lin & Lai, 2017). Ayuda a identificar proteínas desconocidas mediante su interacción con una proteína conocida que sirve para inmunoprecipitar al complejo proteico. La forma habitual es conjugando la proteína con agarosa o con perlas magnéticas (Evans & Paliashvili, 2022).

El protocolo básico de la Co-IP es similar al de la inmunoprecipitación, la inmunoprecipitación utiliza un anticuerpo que se une a una proteína conocida para aislar esa proteína, en la Co-IP se utilizan complejos proteicos (Tan & Yammani, 2022). Es crucial optimizar las condiciones de unión y lavado para preservar las interacciones entre la proteína de interés y sus proteínas asociadas, así como las interacciones entre el anticuerpo y la proteína señuelo. Además, es importante considerar la posibilidad de que las interacciones entre las proteínas puedan ser afectadas por las condiciones experimentales y si se hace la interacción con proteínas en su estado nativo o desnaturalizado (Evans & Paliashvili, 2022; Lin & Lai, 2017; Tan & Yammani, 2022). Aunque en este tipo de experimentos lo habitual es inmunoprecipitar proteínas en su estado nativo.

La inmunoprecipitación es uno de los métodos más ampliamente utilizados para la detección y purificación de antígenos (Tan & Yammani, 2022). Una proteína objetivo-específica forma un complejo inmunológico y luego se precipita, quedando inmovilizada la proteína que se une a los anticuerpos; cualquier otra proteína que se una de manera inespecífica se elimina mediante lavados. Finalmente, el antígeno y el anticuerpo, si no está unido de manera covalente a la agarosa/perlas, se eluyen del soporte (Figura 8) (Lin & Lai, 2017). Las proteínas eluidas se pueden analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Evans & Paliashvili, 2022).

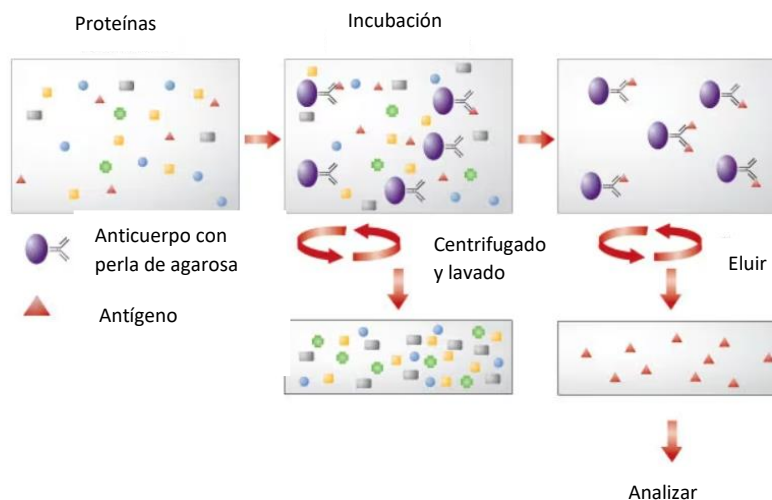


Figura 8. Resumen esquemático de un ensayo de inmunoprecipitación estándar. Se emplean extractos proteicos totales al cual se agrega el anticuerpo conjugado, existe la interacción antígeno anticuerpo, para después lavar y eluir la muestra; por último, se analiza. (Tomado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>).

## 2 Antecedentes

No se ha encontrado ningún artículo científico ni reporte en la literatura revisada, previo a realizar esta tesis, donde hayan caracterizado alérgenos mediante Co-IP. En el grupo de trabajo del Departamento de Investigación en Alergia e Inmunogenética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” se han llevado a cabo diferentes estudios en donde se han encontrado nuevos alérgenos, pero usando los métodos tradicionales.

En el 2015 Blessy y colaboradores realizaron un estudio en el que caracterizaron proteínas de unión a IgE en el suero de pacientes sensibles al trueno. La metodología que se utilizó fue por la separación de las proteínas en geles 2D y haciendo Western blot empleando el suero de los pacientes sensibles. Cada uno de estos posibles alérgenos encontrados se mandaron a secuenciar por MS, obteniendo como resultado 7 proteínas, entre las que destacaron: profilina, enolasa,

Fra e 9 (beta-1,3-glucanasa), poligalacturonasa específica del polen y alanin aminotransferasa (Mani et al., 2015). En un trabajo más reciente en nuestro grupo de trabajo se han caracterizado por la misma técnica 23 proteínas de *Ligustrum spp.* reconocidas por IgE (en publicación).

### **3 Planteamiento del problema**

La forma de identificación de potenciales alérgenos presentes en el polen de plantas es el mismo utilizado desde hace más de dos décadas, como se mencionó previamente algunas de las limitaciones de realizar la identificación con geles 2D son:

- Durante la extracción y resolución en geles de poliacrilamida las proteínas quedan en su estructura primaria, en otras palabras, están desnaturalizadas. Estas proteínas en su estado no nativo no son como se encuentran en la naturaleza cuando son reconocidas por el sistema inmune.
- Se debe realizar un análisis de espectrometría de masas por cada spot que reconocido por la IgE de los pacientes. Por lo que la selección de los spots se puede volver en algunos casos muy subjetiva cuando el spot no es muy claro.
- La lectura y el envío de cada spot reconocido por la IgE de los pacientes es operador dependiente.
- El costo del análisis de cada spot por MS lo hace una técnica nada económica.
- En el desarrollo de esta técnica es laborioso y consume mucho tiempo entre cada paso metodológico.

### **4 Justificación**

La Co-IP se puede utilizar como técnica alternativa para identificar posibles alérgenos de una manera más rápida, económica y con la posibilidad de usar

proteínas en su estado nativo. Con un análisis de MS se pueden identificar todos los posibles alérgenos que son reconocidos por la IgE de los pacientes sensibles. Aunado a que no existen reportes hasta el momento en que dicha técnica se haya empleado para este propósito.

## **5 Hipótesis**

La co-inmunoprecipitación es un método que se puede utilizar en la caracterización de alérgenos del polen del fresno.

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Estandarizar la técnica de Co-IP para caracterizar proteínas de unión a IgE en el polen del árbol fresno.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Determinar el mejor método de extracción de proteínas del polen del fresno.
- Reclutamiento de pacientes sensibles a fresno y obtención de su suero.
- Realizar la Co-IP y mandar a secuenciar las proteínas por MS.
- Determinar las proteínas identificadas como posibles alérgenos.

## **7 Metodología**

### **7.1 Consideraciones éticas**

Se consideraron las determinaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012 del expediente clínico, la cual establece los criterios científicos, éticos, tecnológicos y administrativos obligatorios en la elaboración, integración, uso, manejo, archivo, conservación, propiedad, titularidad y confidencialidad del expediente clínico.

Se tomó en cuenta lo estipulado en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC), emitidas en 1994 por la Conferencia Internacional de Armonización. Asimismo, lo establecido en la versión vigente del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud 2014, y en la Declaración de Helsinki, considerando aspectos éticos que garantizan la dignidad y el bienestar de la persona sujeta a investigación. Se contó con la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” con el proyecto aprobado B07-21.

## **7.2 Tipo y diseño de estudio.**

Estudio descriptivo, experimental, transversal, prospectivo. Casos y controles.

## **7.3 Población**

Se utilizó el suero de pacientes del servicio de alergia e inmunología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, bajo el protocolo B07-21 aprobado por el comité de ética. Se seleccionaron 6 pacientes con síntomas de RA que presentaron sensibilidad únicamente a fresno, 2 pacientes con síntomas de RA sensibilidad al grupo de oleáceas con las que se cuenta extracto para realización de pruebas cutáneas (fresno, olivo y trueno), un paciente sin datos de enfermedad atópica (dermatitis, rinitis alérgica o asma) y sin sensibilidad demostrada.

Para demostrar la sensibilidad alérgica se realizaron pruebas de punción cutánea (SPT, por sus siglas en inglés) con extractos alergénicos de la empresa ALK Abelló, se tomó como positivo cualquier roncha  $\geq 3$  mm respecto a control positivo 20 minutos posterior a punción.

Las características de los pacientes se describen en la tabla 1.

ID	Sexo	Diagnóstico	SPT (+)
1	F	RA, Asma	<i>Fraxinus excelsior</i>
2	M	RA, Asma	<i>Fraxinus excelsior</i>
3	F	RA	<i>Fraxinus excelsior</i>
4	M	RA, Asma, DA	<i>Fraxinus excelsior</i>
5	F	RA	<i>Fraxinus excelsior</i>
6	M	RA	<i>Fraxinus excelsior</i>
7	M	RA	<i>Fraxinus excelsior, Ligustrum vulgare, Olea europaea</i>
8	M	RA	<i>Fraxinus excelsior, Ligustrum vulgare, Olea europaea</i>
9	M	-	-

Tabla 1. Características, diagnóstico y sensibilización por pruebas cutáneas de los pacientes elegidos para el estudio.

## 7.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

### 7.4.1 Inclusión

- Pacientes sensibilizados al polen de *Fraxinus spp.*

- Pacientes sensibilizados al polen de *Fraxinus spp.*, *Ligustrum spp.* y *Olea spp.*
- Pacientes sin sensibilización alérgica y sin diagnóstico o cuadro clínico de enfermedad alérgica.

#### **7.4.2 Exclusión**

- Sueros de pacientes en tratamiento con antihistamínicos, corticosteroides y/o inmunoterapia alérgeno-específica.
- Suero de pacientes menores de edad.

#### **7.4.3 Eliminación**

- Retiro del paciente de forma voluntaria del protocolo.
- Muestra sanguínea no viable.

#### **7.5 Recolección del polen**

Se utilizaron muestras de inflorescencias de *Fraxinus spp.* presente en la Ciudad de México recolectadas en el mes de febrero del 2021. Se dejó secar a temperatura ambiente en bolsas de papel. Se obtuvieron anteras por un tamiz normal y se separaron con un tamiz de prueba estándar USA (150  $\mu$ m).

#### **7.6 Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas se llevó a cabo con dos diferentes métodos: extracción de proteínas por fenol que utiliza el protocolo descrito por Faurobert y colaboradores (Faurobert et al. 2007.) y extracción mecánica usando un homogeneizador.

Por el método de extracción empleando fenol se colocó 70 mg de polen en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó 1 ml de fenol equilibrado y se mezcló a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 6,776 RCF a 4°C

durante 5 minutos, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 4 volúmenes de acetona fría y se dejó incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. La pastilla que se formó se lavó 4 veces con 800  $\mu\text{l}$  de acetona fría y finalmente se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de buffer de rehidratación RH (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, 1% inhibidores de proteasa) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para la extracción proteica mecánica se utilizó un homogeneizador de la marca Wheaton de 5 ml el cual estuvo frío durante su uso. Se usaron 50 mg de polen de fresno, se agregó 1 ml de solución de precipitación (20% de TCA, 0.2% DTT, en acetona fría) y se homogeneizó manualmente dando 250 golpes hasta romper el polen. Se observaron muestras al microscopio para validar que el polen se haya roto. Después se agregó 500  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (Tris- HCL 50mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Triton X100 0.5%) se dejó incubar por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó durante 20 minutos a 1,020 RCF, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de solución acetona fría al 80%, se repitió el lavado 3 veces y se dejó secar la pastilla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el polen con 600  $\mu\text{l}$  de buffer RH, se incubó durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  y se utilizó un sonicador magnasonic para homogenizar la muestra durante 10 minutos se recuperó el sobrenadante, se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **7.7 Cuantificación de proteínas**

Una vez obtenidas las proteínas se utilizó el método de Bradford para cuantificarlas. Se cargaron 5  $\mu\text{l}$  de los extractos proteicos y se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de reactivo Bradford (Bio-Rad, 5000201), atemperado para evitar la formación de precipitados, y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 595 nm en un Bio-Rad iMark (Microplate Reader) y se compararon los datos obtenidos con una curva estándar para determinar la concentración.



## **7.8 Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida**

Se corrieron 20 µg de las proteínas en geles de poliacrilamida al 13% (SDS-PAGE) y un marcador de peso molecular (Bio-Rad, 1610373). Se dejó correr a 15 mA constantes durante 60 min. Posteriormente se tiñó con azul de Coomassie por 24 horas. Se lavaron los geles con agua y se colocó en solución para desteñir (30% metanol, 10% ácido acético). Se analizó cada gel con un equipo Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System Universal Hood III.

## **7.9 Co-inmunoprecipitación**

Para realizar la Co-IP se utilizó el protocolo de inmunoprecipitación de Abcam con algunas modificaciones. La técnica se divide en los siguientes pasos (Figura 9):

### **7.9.1 Pre-clareo**

La finalidad del pre-clareo es reducir las uniones no específicas entre la IgE y las proteínas. Se agregaron 100 µl de perlas de agarosa conjugada con anti-IgE (Santa Cruz Biotechnology, sc-53346), se dejó incubar en agitación a 4°C durante 30 minutos con ~800 µg de extractos proteicos totales de polen. Se centrifugó a 10,976 RCF a 4°C durante 2 minutos y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo para ocuparlo en las Co-IPs.

### **7.9.2 Inmunoprecipitación**

Para la Co-IP se emplearon sueros de pacientes, los cuales se dividieron en 3 grupos y en 4 tipos de sueros:

1. Pacientes polisensibles, se utilizaron los sueros de los pacientes 7 y 8 (tabla1).

2. Pacientes monosensibles, se utilizaron los sueros de los pacientes 1 al 6 (tabla 1).

3. Pacientes sin sensibilidad alérgica comprobada ni enfermedad atópica.

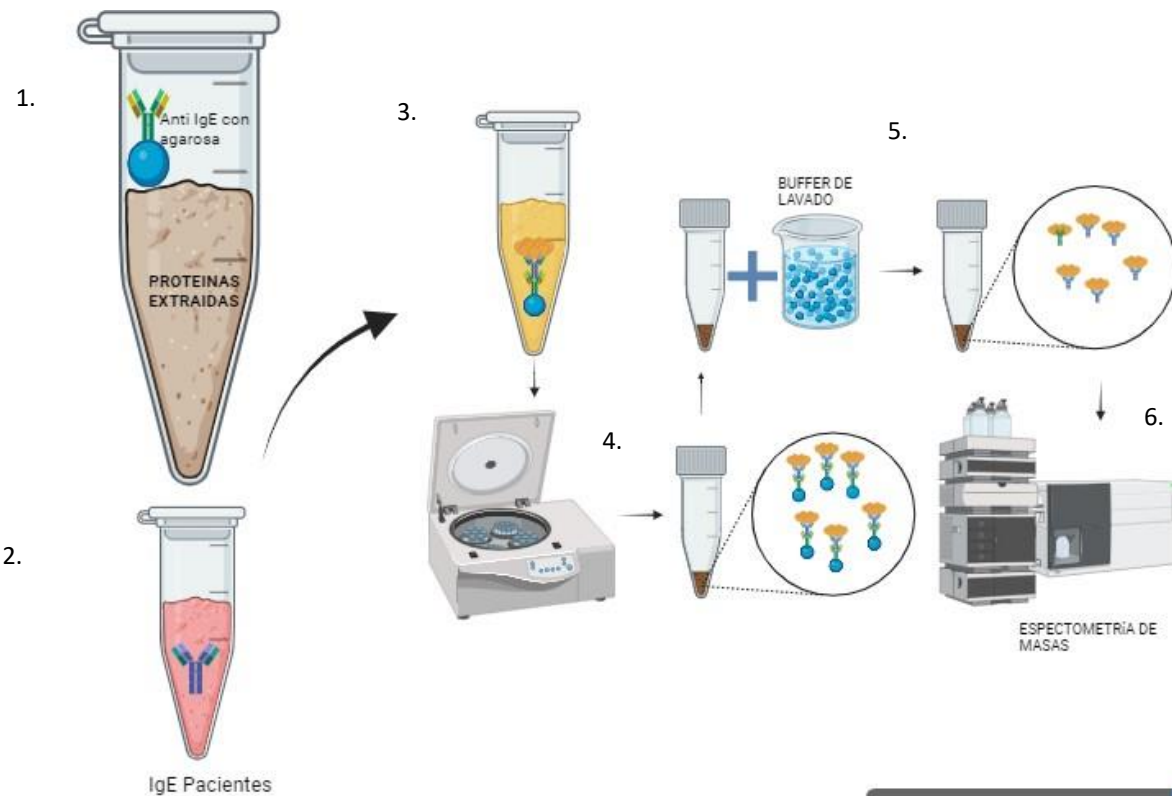
En un primer experimento de Co-IP se tomaron 50 µg de proteínas y se incubaron con 50 µl de suero de pacientes, se incubó cada muestra a 4°C en rotación durante 1 hora. Posteriormente, se agregó 100 µl de perlas conjugadas anti-IgE (Santa Cruz Biotechnology, sc-53346) a cada inmunoprecipitación y se incubó la mezcla a 4°C en agitación durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 896 RCF a 4°C por 2 min. y se removió el sobrenadante (proteínas no unidas), y se procedió a realizar lavados del complejo agarosa-IgE-proteínas para quitar las uniones inespecíficas con los siguientes buffers: Buffer de lavado bajo en sal (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 150 mM), Buffer de lavado alto en sal (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 500 mM); y un último lavado con Buffer TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA 1mM). Después de cada lavado se dejó incubar en agitación a 4°C durante 15 minutos y se centrifugó 896 RCF a 4°C, para quedarnos con la pastilla de agarosa que incluye los complejos proteicos reconocidos por la IgE de los pacientes.

En un segundo experimento de Co-IP se decidió emplear 200 µg de extractos proteicos, lo cual es 4 veces más que el primer experimento. Así mismo, debido a la gran cantidad de proteínas detectadas del suero por MS (ver resultados) se decidió limpiar el suero con columnas de exclusión molecular AMICON de 100 kDa (Millipore, UFC510024). Estas columnas eliminarán proteínas por debajo de 100 kDa, por lo que las IgE estarán en mayor proporción. Una muestra de suero de pacientes polisensibles se normalizaron los niveles de proteína usando el kit ProteoMiner (BioRad, 1633003). Por último, se cambió la secuencia de incubación, primero incubando el suero de los pacientes con las perlas de agarosa conjugadas con anti-IgE humano. El resto de la técnica se realizó como previamente se describió.

### 7.9.3 Elución:

Se lavaron las perlas obtenidas con buffer de pre-urea (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EGTA, 75 mM KCl) y se centrifugó a 10,976 RCF 4°C y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se agregó 100 µl buffer de elución (8M urea, 20 mM Tris-HCl pH 7 y 100 mM NaCl) se mantuvo en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se volvió a centrifugar en las condiciones previas y los sobrenadantes se guardaron a -70 °C.



Created in BioRender.com bio

Figura 9. Metodología utilizada para realizar la co-immunoprecipitación. 1. Incubación de proteínas extraídas del polen, con anti-IgE conjugada con perlas de agarosa. 2. Sueros de pacientes. 3. Complejo inmunológico. 4. Extracción del complejo inmunológico con perlas de agarosa. 5. Lavado y elución 6. Envío a espectrometría de masas. (Creado con biorender.com).

### 7.10 Análisis por Espectrometría de Masas

Las 4 muestras se analizaron por espectrometría de masas (MS) en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM), CINVESTAV Zacatenco, CDMX. Los espectros fueron adquiridos en el espectrómetro de masas utilizando ionización de nanoelectrospray (nanoESI) en el modo de adquisición de datos independiente (DIA) a través de Multiplexed MS/MS (MSE) con la siguiente configuración: 2.75 kV en el emisor capilar, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el desplazamiento de fuente, temperatura de fuente de 70°C, 0.5 bar para el gas de flujo nanoflow y 150 L/h para el flujo de gas de purga.

### **7.11 Búsqueda de proteínas**

De las secuencias de aminoácidos reportadas por espectrometría de masas, se buscó en la base de datos de nomenclatura de alérgenos de la organización mundial de la salud (WHO) ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), y en las bases de datos [www.allergenonline.org](http://www.allergenonline.org) y [www.allergome.org](http://www.allergome.org). Con las proteínas reportadas se realizó una búsqueda en la herramienta de alineamiento local básico (BLAST) por sus siglas en inglés, disponible en la librería de medicina nacional (NIH) ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.com](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.com)). Se realizó la búsqueda de dominios de las proteínas en PROSITE (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>). De las proteínas ya identificadas como alérgenos de realizamos modelamientos 3D con AlphaFold 2 y se hicieron alineamientos con el programa PyMOL.

## **8 Resultados**

Como primer parte se realizaron extracciones proteicas de polen de fresno por la técnica de extracción por fenol y homogeneizador. Las proteínas se cuantificaron por Bradford obteniendo los siguientes resultados (tabla 2).

Muestra	Método de extracción	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Fresno 1	Fenol	1.50
Fresno 2	Fenol	3.04
Fresno 3	Homogeneizador	2.57
Fresno 4	Homogeneizador	1.09
Fresno 5	Homogeneizador	2.33
Fresno 6	Homogeneizador	0.710

Tabla 2. Cuantificación de proteínas de polen de fresno por Bradford con dos métodos distintos de extracción.

Se corrieron 10  $\mu\text{g}$  de cada una de estas extracciones en un gel SDS-PAGE al 13% (Figura 9). Se obtuvieron bandas proteicas entre los 10 kDa hasta aproximadamente los 200 kDa.

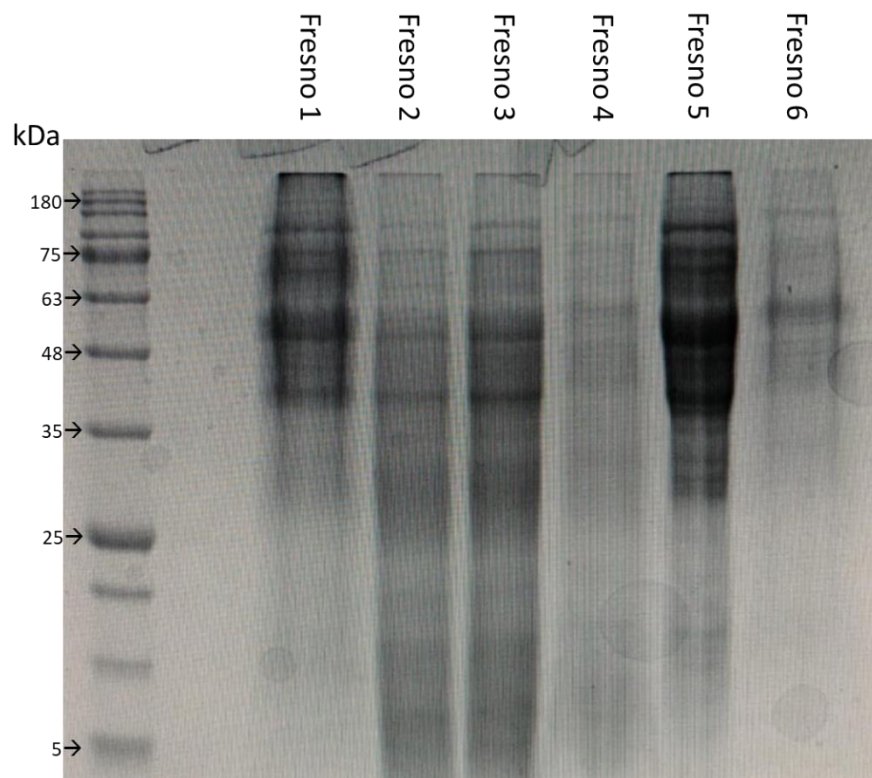


Figura 10. Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida realizada con extractos proteicos totales extraídos del polen del fresno con dos métodos. Gel SDS-PAGE al 13%.

Al tener estos resultados se decidió juntar las muestras para tener una mayor homogeneidad entre los distintos pesos moleculares, ya que un método de extracción favorecía a las proteínas de bajo peso molecular y otra técnica las de mayor peso. Así mismo, esto favoreció para tener una mayor cantidad de proteínas para hacer la Co-IP. A esta mezcla se le denominó fresno mix y se llevó a cabo otra cuantificación de proteínas por Bradford (tabla 3).

Muestra	Método de extracción	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Fresno Mix	Fenol y homogeneizador	1.530

Tabla 3. Cuantificación por Bradford del mix de proteínas de fresno.

## 8.1 Primer Co-IP

Se procedió a hacer una primer Co-IP usando los sueros de los pacientes sensibles y como control negativo suero de pacientes sanos. Recordando que en este primer experimento se pusieron primero a interaccionar los extractos proteicos con el suero de los pacientes, para luego ser atrapados con la anti-IgE humana conjugada con agarosa. Se obtuvieron en su mayoría anotaciones por MS de las proteínas presentes en el suero de los pacientes, y únicamente 9 proteínas del polen. Estas 9 proteínas fueron el resultado de restar las proteínas inmunoprecipitadas de manera inespecífica por el suero de los pacientes sanos. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas que se unieron a IgE reportadas por la MS se muestran en la tabla 4.

ID muestra	Descripción	Secuencia en MS	Proteína encontrada con BLAST
1	Os01g0835000 protein	AVMAETMLEATLQYQSSQK EELECLVRDGLPMALR	TBC1 domain family member 8B-like isoform X1
2	Os04g0384332 protein	TLEVAVGMELELSTLEVAVGMELELS	ATP-binding cassette, ABC transporter-type domain profile
3	Homeobox protein knotted-1-like 3	SSSFLQR	TRANSKETOLASE_2
4	Homeobox protein knotted-1-like 3	LPGDTTSVLK IDAQLAQSQHVVAK TGGGENKNDGGGATAADGVVSWQNAR	Proteína de dominio ELK
5	Uncharacterized protein	EVNHDQVNSQSPPIHSLTNAPQVK	E3 ubiquitin- ligase RHF1A
6	26S proteasome regulatory subunit 7B	IDPSVTMMTVEEKPDVTYNDVGGCK	AAA-protein family signature
7	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	VTPQPGVPPEEAGAAVAEESSTGTWTTVWTDGL TSLDRYK	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
8	Auxin canalization protein	GTDLFVETPDGDFK	EF-hand calcium-binding domain signature and profile
9	Major pollen allergen Lig v 1		Ole e 1-like

Tabla 4. Proteínas co-inmunoprecipitadas de polen de fresno reportadas por espectrometría de masas. Se incluye una descripción que hace referencia a la base de datos con la que se anotó la proteína, seguida por la secuencia de los péptidos con la que se anotó. Finalmente, la proteína a la que corresponde usando búsqueda de proteínas por BLAST.

Para la proteína 1 reportada por MS con la base de datos de *Oryza sativa* (arroz). Se realizó BLAST en la base datos de miembros de la familia Oleaceae donde se describe como una proteína miembro de la familia del dominio TBC1, este dominio es una GTPasa y fue encontrado analizando su secuencia con PROSITE (Figura 11).

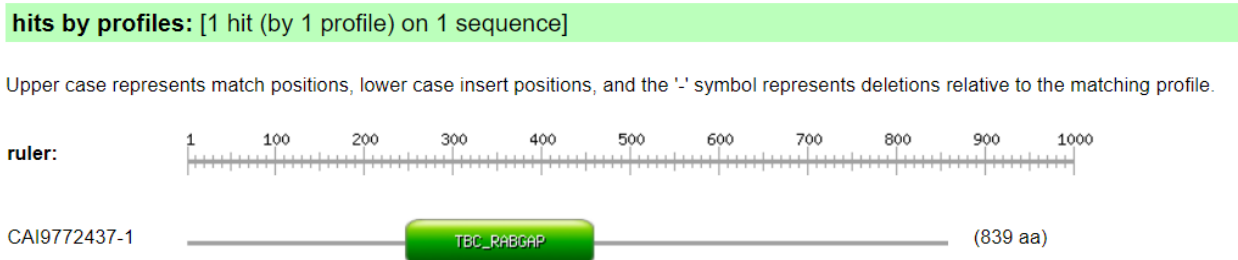


Figura 11. Dominio GTPasa encontrado de la proteína miembro de la familia TBC1 encontrado con PROSITE.

El único dominio de esta proteína es una GTPasa (GAP) TBC/rab, está compuesto por aproximadamente 200 aminoácidos. Está altamente conservado entre especies y se ha encontrado en una amplia variedad de proteínas, desde moléculas de adhesión en plantas hasta en oncogenes de mamíferos. El nombre TBC proviene del nombre de la proteína murina Tbc1, en la cual se identificó por primera vez este dominio debido a su similitud con secuencias en el oncogén tre-2 y los reguladores de la mitosis en levadura, BUB2 y cdc16 (Reczek & Bretscher, 2001). Realizando una búsqueda en las bases de datos no se tiene ningún reporte que la proteína o su dominio GTPasa esté presente en algún alérgeno.



La proteína 2 fue también una proteína anotada con la base de datos del proteoma de arroz. Se buscó en PROSITE los dominios de esta proteína y se encontraron dos dominios transportadores ABC (Figura 12).

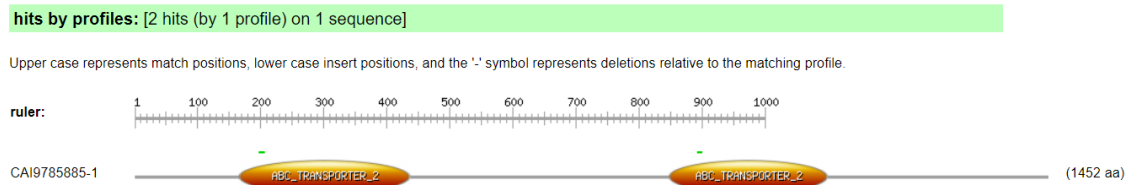


Figura 12. Dominios encontrados correspondientes a transportadores ABC encontrado con PROSITE.

Los transportadores ABC pertenecen a la superfamilia de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés), que utiliza la hidrólisis de ATP para energizar diversos sistemas biológicos (Higgins, 1992). Son sistemas de exportación y están involucrados en la extrusión de sustancias nocivas, la exportación de toxinas extracelulares y la dirigencia de componentes de membrana. Se encuentran en todos los organismos vivos (Higgins, 1992; Saurin et al., 1999). Tampoco existen reportes de algún alérgeno similar o que contengan este dominio catalítico.

La proteína 3 fue anotada con la base de datos del proteoma de *Arabidopsis spp.* Es descrita como una proteína homebox, en la búsqueda de dominios en PROSITE se encontró a la transcetolasa (Figura 13). Esta es una enzima que realiza una reacción reversible en la que transfiere un grupo cetol de dos carbonos desde el xilulosa 5-fosfato a un receptor aldoso, como la ribosa 5-fosfato, para formar sedoheptulosa 7-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Junto con la transaldolasa, esta enzima proporciona un enlace entre las vías glucolítica y de pentosa-fosfato (Fletcher et al., 1992). Esta proteína es un alérgeno que se encuentra en tres especies.

hits by patterns: [1 hit (by 1 pattern) on 1 sequence]

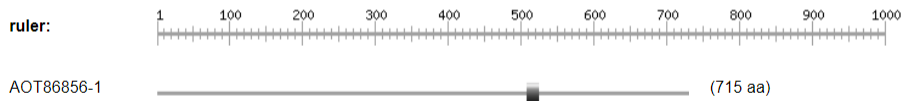


Figura 13. Dominios encontrados correspondientes a transcetolasa encontrado con PROSITE.

La proteína 4 también fue reportada como una proteína en *Arabidopsis thaliana*. Haciendo un análisis de dominios se encontró un dominio Homeobox y un dominio ELK (Figura 14). Al realizar la búsqueda de su ortólogo por BLAST con las siguientes secuencias peptídicas con la que se anotó por MS: LPGDTSVLK, IDAQLAQSQHVVAK, TGGGENKNDGGGATAADGVVSWQNAR se encontró que pertenece a una proteína del dominio ELK.

hits by profiles: [2 hits (by 2 distinct profiles) on 1 sequence]

Upper case represents match positions, lower case insert positions, and the '.' symbol represents deletions relative to the matching profile.

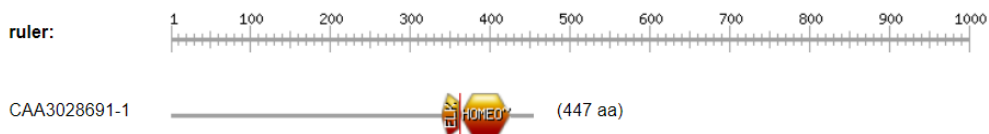


Figura 14. Dominios de la proteína homeobox encontrado con PROSITE

Estas proteínas son reguladores clave tanto del desarrollo de plantas como de animales. En las plantas, los genes homeobox se dividen en varios grupos por secuencias, uno de los cuales es la familia KNOX (de tipo knotted1-homeobox) (Kerstetter et al., 1994). Las proteínas de esta familia comparten otros dominios conservados, el dominio KNOX y el dominio ELK, le dominio ELK también se considera que actúa como un dominio de interacción proteína-proteína, pero el papel preciso de este dominio aún no se ha determinado (Kerstetter et al., 1994;

Sakamoto et al., 1999). Esta proteína no se ha descrito en las bases de datos revisadas como alérgeno.

La proteína 5 fue anotada como una ubiquitin ligasa. Esta proteína también es conocida como E3 ligasa, la cual es una enzima clave en el proceso de ubiquitinación, que es un mecanismo fundamental de regulación de proteínas en la célula eucariota. La ubiquitinación es un proceso mediante el cual se agrega una pequeña proteína llamada ubiquitina a una proteína objetivo-específica (Toma-Fukai & Shimizu, 2021). No se encontró en bases de datos de alérgenos ya reconocidos.

La ubiquitinación es un proceso generalmente asociado a la degradación, es un mecanismo clave para el control de la estabilidad y la vida media de las proteínas en la célula (Toma-Fukai & Shimizu, 2021). Además de la degradación, la ubiquitinación también puede tener otras funciones reguladoras. Por ejemplo, la ubiquitinación puede servir como señal para la internalización de proteínas a través de la endocitosis, y también está involucrada en la regulación de la actividad enzimática, la localización subcelular y las interacciones proteína-proteína (Zheng & Shabek, 2017).

La proteína 6 también encontrada con el proteoma del arroz es una proteína reguladora de la subunidad 26S del proteosoma. Se realizó la búsqueda de dominios en PROSITE, encontrándose un dominio ATPasa (Figura 15).

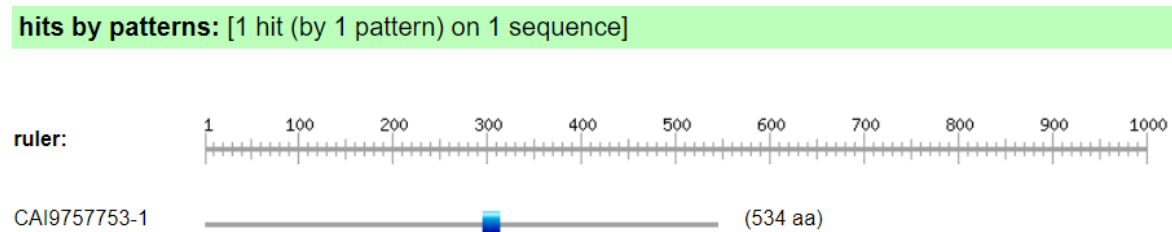


Figura 15. Dominio de la proteína reguladora de la subunidad 26S del proteosoma encontrada con PROSITE.

Esta familia se denomina ahora AAA, que significa ATPasas Asociadas con diversas Actividades celulares. Se encuentra en las subunidades del complejo regulador del proteasoma 26S, que está involucrado en la degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas (Sakamoto et al., 1999).

La proteína 7 fue anotada con el proteoma del arroz y con BLAST como la cadena larga de la Ribulosa bisfosfato carboxilasa. La función de esta enzima es para la asimilación de CO<sub>2</sub>. En circunstancias específicas, pueden actuar como inhibidores de unión fuerte y bloqueando la catálisis (Carmo-Silva et al., 2011).

La proteína 8 fue reportada como una proteína de canalización de auxina al hacer la búsqueda de dominios en PROSITE se encontró un dominio de unión a calcio (Figura 16).

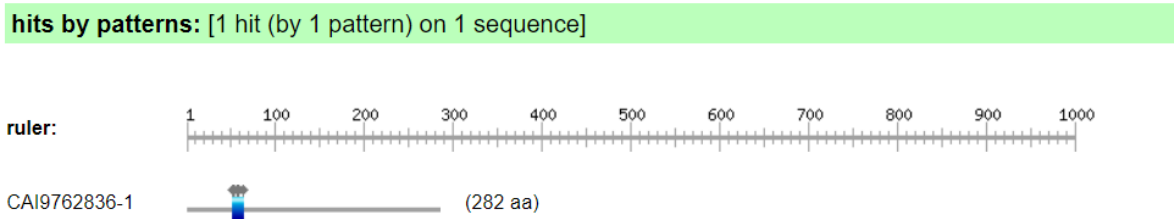


Figura 16. Dominio de la proteína de unión a calcio encontrada con PROSITE.

Muchas proteínas que se unen al calcio pertenecen a la misma familia evolutiva y comparten un tipo de dominio de unión al calcio conocido como EF-hand. La unidad estructural/funcional básica de las proteínas EF-hand suele ser un par de motivos que juntos forman un dominio estable de cuatro hélices en forma de paquete. El emparejamiento de los motivos EF-hand permite la cooperatividad en la unión de iones de Ca<sup>2+</sup> (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

Existen muchas proteínas que contienen regiones EF-hand conocidas: entre las que se encuentran las cinasas de proteínas dependientes de calcio que se encuentran en la mayoría de las plantas, *Salsola Kali* una maleza del orden de los caryophyllales lo contiene en su grupo 2 (Sal k 2). Por último, se encontró al principal alérgeno usando el proteoma de Oleácea, Lig v1. Esta es una proteína llamada Ole e 1-like

que se encuentra en diferentes pólenes de plantas y son alérgenos relevantes en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I. Se denomina alérgeno mayor por tener una alergenicidad mayor del 50%, en el caso de esta familia llega a presentar una alergenicidad del 90%. Se expresa durante el desarrollo de la antera, se almacena en el retículo endoplásmico rugoso y participa en el crecimiento del tubo polínico (Mani et al., 2015). Hasta la fecha, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Inmunología (IUIS) han reconocido oficialmente 15 alérgenos pertenecientes a esta familia de proteínas. Estas proteínas se encuentran exclusivamente en el polen (Wildner et al., 2017).

## **8.2 Segunda Co-IP**

Debido a que en la primer Co-IP únicamente se anotaron de manera diferencial 9 proteínas, incluidas el principal alérgeno de las Oleáceas, ocasionado por el gran número de proteínas de suero que interfirieron en el análisis por MS. Se decidió repetir la Co-IP con los siguientes cambios: Se incrementó 4 veces la cantidad de proteínas por cada Co-IP, se cambió el orden de incubación del suero y los extractos proteicos y se pasaron los sueros por columnas de exclusión molecular con la finalidad de enriquecer y limpiar la cantidad de IgE.

Se reportaron un total de 810 proteínas en promedio por cada tratamiento, incluido el control negativo. El control con suero de pacientes sanos presentó casi la misma cantidad de proteínas que con las muestras con sueros de pacientes sensibles, esto se podría deber al exceso de proteínas empleadas por cada experimento. Estas 810 proteínas representan un proteoma de polen, del cual se pudieron identificar algunos alérgenos ya descritos y algunos nuevos potenciales.

De estas proteínas se encontraron 14 alérgenos que ya se encuentran en la base de datos de la WHO, 11 de estas proteínas son pertenecientes al reino Plantae, 9 de la familia Olaceae y 7 proteínas que ya se han reportado de unión a IgE en sueros de pacientes sensibilizados al fresno (Figura 17).



Figura 17. Diagrama de Venn ampliado que muestra la cantidad de proteínas encontradas en la segunda Co-IP que ya han sido descritas como alérgenos.

En cuanto a los alérgenos que se encuentran en la familia Olaceae se lograron identificar 9 alérgenos: Ole e1-like, profilina, 1 3-beta glucanasa, proteína que contiene el dominio X8, metilesterasa de pectina, isoflavona reductasa, poligalacturonasa y la cilofilina. En la tabla 5 se muestran los alérgenos reportados hasta el momento en especies de oleáceas y los encontrados por MS.

Nombre	<i>Olea europaea</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	<i>Syringa vulgaris</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	MS Co-IP2
Common olive group 1	Ole e 1	Lig v 1	Syr v 1	Fra e 1	Si
Profilin-1	Ole e 2	Lig v 2	Syr v 2	Fra e 2	
Pocalcina	Ole e 3		Syr v 3	Fra e 3	Si
	Ole e 4				
Superoxide dismutase	Ole e 5				Si
	Ole e 6			Fra e 6	
putative non-specific lipid transfer protein	Ole e 7			Fra e 7	
Polcalcin-like protein (4 EF-hands)	Ole e 8				
1 3-beta glucanase	Ole e 9			Fra e 9	Si
X8 domain containing protein	Ole e 10			Fra e 10	Si
Pectin methylesterase	Ole e 11			Fra e 11	Si
Isoflavone reductase	Ole e 12			Fra e 12	Si
Thaumatococin-like protein	Ole e 13				
Polygalacturonase	Ole e 14				Si
Cyclophilin	Ole e 15				Si

Tabla 5. Proteínas reconocidas como alérgenos en la familia oleacea (olivo, trueno, lila y fresno) con las proteínas reportadas por la MS con co-ip.

Los otros 5 alérgenos que se encuentran en las bases de datos consultadas y que se reportaron por espectrometría de masas fueron la proteína de choque térmico 70, enolasa, tioredoxina, isomerasa de disulfido y la fructosa-difosfato aldolasa.

Estas proteínas se buscaron en la base datos de la WHO encontrándose en diferentes especies del reino Plantae, Fungi y Animalia entre las que destacan: *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Ambrosia Artemisiifolia*, *Hevea brasiliensis*, *Tricum aestivum*, *Dermatophagoides farinae*, *Platanus acerifolia* y *Zea Mays* (Tabla 6).

<b>Nombre</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Especie</b>
<b>HSP 70</b>	Asp f 19	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Pen c 19	<i>Penicillium citrinum</i>
	Aed a 8	<i>Aedes aegypti</i>
	Der f 28	<i>Dermatophagoides farinae</i>
	Alt a 3	<i>Alternaria alternata</i>
<b>Enolasa</b>	Asp f 22	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Alt a 6	<i>Alternaria alternata</i>
	Amb a 12	<i>Ambrosia Artemisiifolia</i>
	Cyn d 22	<i>Cynodon dactylon</i>
	Hev b 9	<i>Hevea brasiliensis</i>
	Per a 4	<i>Perilaneta americana</i>
	Pla a 6	<i>Platanus acerifolia</i>
<b>Thioredoxina</b>	Tri a 25	<i>Triticum aestivum</i>
	Asp f 28	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Zea m 25	<i>Zea mays</i>
<b>Disulfide isomerase</b>	Alt a 4	<i>Alternaria alternata</i>
<b>Fructose- biphosphate aldolase</b>	Asp f 36	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Tabla 6. Proteínas reportadas por MS como potenciales nuevos alérgenos en fresno y sus ortólogos en otras especies.

De estas proteínas se seleccionaron dos que se encuentran reconocidas como alérgenos por la WHO del reino Plantae: la enolasa y la tioredoxina. Se realizó un alineamiento de aminoácidos de la enolasa reportada por MS y Pla a 6 (enolasa reconocida como alérgeno de *Platanus acerifolia*), habiendo un 91% de identidad entre ambas secuencias (Figura 18).



Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
842 bits(2174)	0.0	Compositional matrix adjust.	403/444(91%)	426/444(95%)	0/444(0%)
<b>Pla e 6</b>	ATI KAVKARQIFDSRGNPTVEVDVTISDGT LARA AVPSGASTGIYEAL ELRDGGSDYL GK				61
<b>Enolas</b>	ATI +VKARQIFDSRGNPTVEVDV SDGT ARAAVPSGASTG+YEAL ELRDGGSDYL GK				62
<b>Pla e 6</b>	ATI VSVKARQIFDSRGNPTVEVDVCCSDGT FARAAVPSGASTGVYEAL ELRDGGSDYL GK				62
<b>Enolas</b>	GV LKAVENVNAIIGPALIGKDPT EQTKIDNFMVQELDGT VNEWGWCKQKLGANAILAVSL				121
<b>Pla e 6</b>	GV KAV+NVN++I PALIGKDPT Q ++DNFMVQ+LDGT NEWGWCKQKLGANAILAVSL				122
<b>Enolas</b>	GV SKAVDNVNSVIAPALIGKDPTSQAELDNFMVQQLDGT KNEWGWCKQKLGANAILAVSL				122
<b>Pla e 6</b>	AICKAGASVKKIPLYKHIANLSGNKTLVLPVPAFNVINGGSHAGNK LAMQEFMILPVGAT				181
<b>Enolas</b>	AICKAGA +KKIPLY+HIANL+GNK LVLVPAFNVINGGSHAGNK LAMQEFMILP GA				182
<b>Pla e 6</b>	AICKAGAIKKIPLYQHIANLAGNKQLVLPVPAFNVINGGSHAGNK LAMQEFMILPTGAA				182
<b>Enolas</b>	SFKEAMKMGVEVYHHLKAVIKKKYQDATNVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAIAKAGY				241
<b>Pla e 6</b>	SFKEAMKMGVEVYH+LK+VIKKKYQDATNVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAI KAGY				242
<b>Enolas</b>	SFKEAMKMGVEVYHNLKSVIKKKYQDATNVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAIEKAGY				242
<b>Pla e 6</b>	TGKVVIGMDVAASEFYDNKDKTYDLNFK EENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVTDYPIVSIE				301
<b>Enolas</b>	TGKVVIGMDVAASEFY++KDKTYDLNFK EENNDGSQKISGDSLKNVYKSFV++YPIVSIE				302
<b>Pla e 6</b>	TGKVVIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFK EENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVSEYPIVSIE				302
<b>Enolas</b>	DPFDQDDWEHYAKLTAEIGQVQIVGDDLLVTNP KRVDKAIKEKTCNALLLKV NQIGSVT				361
<b>Pla e 6</b>	DPFDQDDWEHYAK+TAEIG+QVQIVGDDLLVTNP RV KAI+EK+CNALLLKV NQIGSVT				362
<b>Enolas</b>	DPFDQDDWEHYAKMTAEIGE QVQIVGDDLLVTNPTRVAKAIQEKSCNALLLKV NQIGSVT				362
<b>Pla e 6</b>	ESIEAVKMSKRAGWGMASHRSGETEDTFIADL SVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQLL				421
<b>Enolas</b>	ESIEAVKMSKRAGWGM SHRSGETEDTFIADL+VGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQLL				422
<b>Pla e 6</b>	ESIEAVKMSKRAGWVMTSHRSGETEDTFIADLAVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQLL				422
<b>Enolas</b>	RIEEELGSAAVYAGANFRAPVEPY 445				
<b>Pla e 6</b>	RIEEELG+AAVYAGA FRAPVEPY				
<b>Enolas</b>	RIEEELGAAVYAGAKFRAPVEPY 446				

Figura 18. Alineamiento de los aminoácidos de enolasa encontrada por MS y la enolasa de *Platanus acerifolia* (Pla a 6).

Se realizó un modelamiento 3D con AlphaFold de ambas proteínas y se hizo un alineamiento con el software PyMOL de los dos modelos proteicos. Como se aprecia en la Figura 19 hay una alta conservación de la estructura entre ambas proteínas.

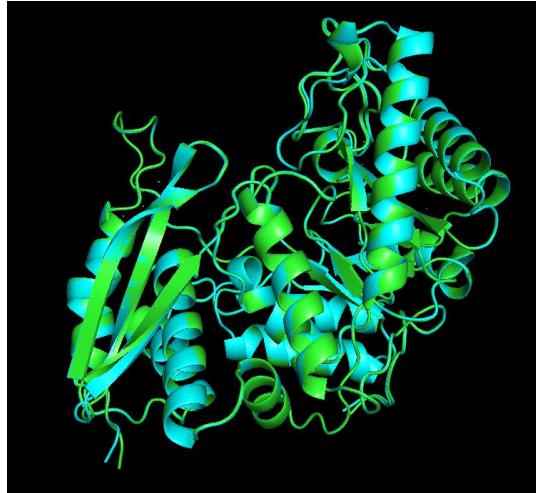


Figura 19. Alineamiento realizado con proteínas modeladas con AlphaFold2 de enolasa de oleácea y Pla a 6. Alineamiento hecho con PyMOL. En color azul claro se muestra la enolasa perteneciente a la familia Olacea y en verde a Pla a 6.

La siguiente proteína analizada fue la tioredoxina, se hizo un alineamiento de los aminoácidos de esta proteína con la tioredoxina encontrada en el maíz (*Zea mays*), catalogada como Zea m 25 en la base de datos de la WHO (Figura 20).

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	143 bits(360)	2e-50	Compositional matrix adjust.	61/111(55%)	86/111(77%)	0/111(0%)
<b>Zea m 25</b>	18	EGTVIAIHSLEEWSIQIEEANS	AKKLVVIDFTATWCPPCRAMAPIFADMAKKSPNVVFLK	77		
<b>Thioredoxina</b>	6	EG VI H++E W+ QI + N +K L+V+DFTA+WC PCR +AP FA++AKK P V FLK	EGQVIGCHTIEAWNEQIAKGN	65		
<b>Zea m 25</b>	78	VDVDEMKTIAEQFSVEAMPTFLFMREGDVKDRVVGAAKEELARKLELHMAS	128			
<b>Thioredoxina</b>	66	VDVDE+K+++A ++VEAMPTF+F+++EG + D+WVGA KEEL + + H+ +	VDVDELKSVATDWAVEAMPTFMFLKEGKIVDKVVGAKKEELQQAIKHIKT	116		

Figura 20. Alineamiento de los aminoácidos de tioredoxina reportada por MS de Co-IP2 y tioredoxina de *Zea mays*.

Este alineamiento nos muestra una identidad entre ambas proteínas del 55% y al tener este resultado se realizó un modelamiento 3D con AlphaFold de ambas proteínas y se hizo un alineamiento con el software PyMOL de los dos modelos.

Pese al bajo porcentaje de identidad ambas estructuras proteicas alinean casi de manera perfecta (Figura 21).

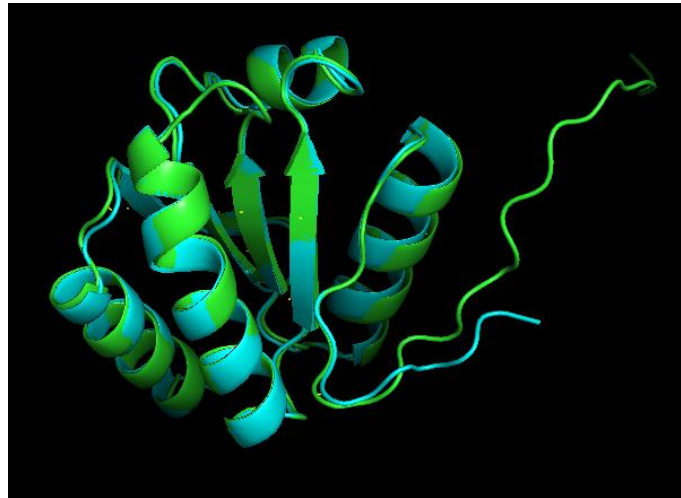


Figura 21. Alineamiento realizado con proteínas modeladas con AlphaFold2 de tioredoxina de oleácea y la tioredoxina de *Zea Mays* (Zea m 25). En color azul claro se muestra la tioredoxina de la familia Oleacea y en verde Zea m 25

## 9 Discusión

Hasta la fecha no he encontrado algún protocolo que haya utilizado la co-inmunoprecipitación para identificar posibles alérgenos. Las principales ventajas al utilizar la Co-IP es que se puede realizar con alérgenos nativos, a diferencia de los geles 2D que son con alérgenos desnaturalizados. Estas proteínas desnaturalizadas no son como generalmente se encuentran en la naturaleza y que es como son reconocidas por el sistema inmune. Otra desventaja es la necesidad de enviar cada spot que se encuentra en los geles 2D para secuenciar por separado, eso se traduce en un mayor costo a diferencia de la Co-IP que con una sola secuenciación podemos encontrar todas las proteínas de unión. Además, la selección de los spots inmunorreactivos puede ser subjetiva. Esta tesis propone estandarizar la co-inmunoprecipitación como método para la identificación de proteínas de unión a inmunoglobulina E.

En la primer Co-IP se reportaron 9 proteínas diferenciales, las cuales son el resultado de restar las proteínas inmunoprecipitadas con el suero de los pacientes sanos. Con la proteína 1 que tiene un dominio TBC1 se realizó la búsqueda en la base de datos de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud (WHO) y el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Inmunología (IUIS) no se encontró ninguna proteína similar a esta. Ni tampoco que sus dominios estén presentes en algún otro alérgeno reportado hasta la fecha.

En nuestro grupo de trabajo se han caracterizado alérgenos del fresno con el método tradicional a través de geles de 2D y por MS de cada spot. Se han encontrado al menos 4 proteínas de unión a IgE con una función similar en el proceso biosintético del ATP (datos no mostrados y en proceso de publicación). Al realizar la búsqueda de dominios en PROSITE se encontraron 2 dominios que pertenecen a transportadores ABC (proteína 2). Las proteínas conocidas que contienen estos dominios se clasifican en varias subfamilias funcionales, un ejemplo es la proteína de membrana perixisomal. Esta proteína la podemos encontrar en el alérgeno reconocido por la WHO como Cand b 2, que es el alérgeno principal de *Cándida boidinii* (Hemman et al., 1997). Sin embargo, no descartamos realizar a futuro el análisis y la comparación de sus estructuras 3D con el fin de encontrar alguna estructura similar entre ambas proteínas.

La proteína 3 al realizar el BLAST se encontró con homología del 100% con una transcetolasa, que como se menciona en los resultados interactúa con la transaldolasa. La transaldolasa es un alérgeno que se encuentra en tres especies de hongo *Cladosporium cladosporioides* (Cla c 14) (Chou et al., 2014), *Fusarium proliferatum* (Fus p 4) (Chou et al., 2011) y *Penicillium chrysogenum* (Pen ch 35), y está comprobada la reactividad cruzada entre estas proteínas (Chou et al., 2014). En un trabajo realizado por nuestro equipo se logró identificar una proteína putativa aldo-ceto reductasa, esta proteína también interactúa con la transaldolasa y la transcetolasa (Chou et al., 2011), que encontré por Co-IP. Una posible explicación es que muchas proteínas en su estado nativo no están solas, por lo general se

encuentran asociadas a otras proteínas, por lo que no descartamos que se puedan identificar proteínas con unión a IgE con funciones similares.

La proteína 4 tiene un dominio ELK, este dominio se ha encontrado en proteínas de manzana, maíz, tabaco y arroz. Aunque aún no se conoce el papel preciso de este dominio, se sabe que interactúa con otras proteínas por lo que no se descarta que pueda presentar algún grado de alergenicidad (Sakamoto et al., 1999).

La proteína 5, que es una E3 ubiquitin-ligasa, se encuentra en el grupo 41 de alérgenos reconocidos en trigo con el nombre de Tri a 41, es un alérgeno menor que funciona como activador de la vía NF- $\kappa$ B. En otro trabajo realizado por nuestro equipo con el polen del trueno se identificó una proteína que se unió a IgE que participa en la ubiquitinación (datos en proceso de publicación).

La proteína 6, que en el BLAST se encontró como una proteína reguladora del proteosoma, al buscar en PROSITE se encontró un dominio con ATPasa. Esta proteína ni su dominio catalítico se han encontrado como alérgenos en las bases de datos conocidas. Al igual que la proteína 7, la cual es un difosfato -de ribulosa.

La última proteína reportada en la primer Co-IP es el ortólogo del alérgeno principal de olivo, el cual por BLAST corresponde a Fra e 1. Encontrar a este alérgeno, hace ver el potencial de la Co-IP como técnica para caracterizar nuevos posibles alérgenos. Sin dejar a un lado, que también se puede hacer para determinar de manera individual a cada paciente las proteínas que su cuerpo es capaz de reconocer. Esto último, con la finalidad de dar tratamiento personalizado y no con extractos proteicos totales que a la larga le pueden ocasionar nuevas sensibilidades.

Con la segunda Co-IP logramos identificar 810 proteínas no repetidas de todos los tratamientos incluido el control negativo. De estas proteínas 14 son alérgenos reportados en la literatura, la mayoría de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas reconocidas por la MS se anotaron con el proteoma del olivo (el árbol más estudiado en la familia oleaceae). Los resultados que se obtuvieron son una referencia de las proteínas que podemos encontrar en el árbol de fresno y que puede ayudar para futuras referencias en la búsqueda de proteínas en este árbol.

La validez de este estudio se puede observar en el reporte de 7 proteínas que corresponden a alérgenos que ya se han descrito pertenecientes al árbol del fresno. Aunque por parte de la WHO y la IUIS solo se reconoce 1 alérgeno en fresno, este trabajo apoya los otros protocolos que existen en la literatura para que estas proteínas sean reconocidas como alérgenos presentes. Se encontraron 3 proteínas pertenecientes a oleaceae que no se encuentran descritas en el fresno, pero si en el olivo: superóxido dismutasa, poligalaturonasa y ciclofilina. Estas se encuentran como Ole e 5, Ole e 14 y Ole e 15, este trabajo nos da la pauta para catalogar estas proteínas como ortólogos del olivo en el fresno y poder nombrarlas como Fra e 5, Fra e 14 y Fra e 15, siendo este el primer acercamiento a estas proteínas en el fresno.

Se reportaron 5 proteínas más que ya están reconocidas como alérgenos en otras especies. Se decidió tomar dos que se encuentran en el reino plantae pero en diferente familia a la olaceae. La primera de estas fue la enolasa, esta proteína ya había sido descrita como proteína de unión a inmunoglobulinas por parte de nuestro equipo en el 2015 en *Ligustrum* (Mani et al., 2015). Se decidió realizar un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos la proteína reportada y del alérgeno Enolasa de *Platanus acerifolia* (Pla a 6). Hay una identidad del 91% entre estas dos proteínas. También se hizo el modelado 3D de ambas proteínas y se realizó un segundo alineamiento de estas proteínas encontrando una alta similitud estructural, lo que nos da pauta de pensar en una probable reactividad cruzada entre estas dos proteínas de especies distintas. La reactividad cruzada de alergenos es un fenómeno en el cual una persona que es alérgica a un cierto alérgeno también puede experimentar síntomas al entrar en contacto con otro alérgeno que comparte similitudes estructurales o inmunológicas con el primero. Un ejemplo de esta reactividad cruzada lo podemos encontrar en algunas de las proteínas que se encuentran en el fresno como las profilinas que también se encuentran en la Gramineas (pastos) o las pocalcinas en las Betuláceas.

La enolasa es una enzima que se conoce principalmente por su participación en la vía glucolítica, donde cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato.

La enolasa, al estar involucrada en la vía glucolítica, ayuda a los granos de polen a metabolizar los azúcares y convertirlos en energía utilizable en forma de ATP (trifosfato de adenosina). Este proceso ayuda movimiento del tubo polínico (Selinski & Scheibe, 2014).

Un amplio rango de enolasas puede causar enfermedades alérgicas. Actualmente, las pruebas de diagnóstico basadas en extractos alérgicos naturales son los métodos más comunes para el diagnóstico de alergias (Morales-Amparano et al., 2021). Por lo que este estudio plantea la idea de realizar la expresión de esta proteína recombinante para comprobar su unión a sueros de pacientes con sensibilidad al fresno.

En otro estudio publicado por Poncet en el 2010 se realizó una caracterización de los alérgenos con un proteoma del árbol del fresno con aproximadamente 200 proteínas. En 13 pacientes alérgicos al fresno, revelan que más de 100 proteínas del polen se identificaron como alérgenos. Se utilizó el método tradicional con geles 2D (Poncet et al., 2010). Por lo que lo obtenido en nuestro estudio da pie a buscar otros alérgenos del proteoma realizado por nosotros.

Otra de las proteínas que se analizó fue la tioredoxina que la podemos encontrar como la proteína alérgica del maíz del grupo 25 (Zea m 25). Al realizar el alineamiento de aminoácidos encontramos una baja identidad entre las secuencias, pero al realizar el alineamiento con el modelado 3D. Encontramos una gran similitud entre ambas estructuras pese a la baja identidad entre los aminoácidos, lo cual nos puede hablar de una posible reacción cruzada por estructura en lugar de la secuencia. Un ejemplo de esto es el caso de las alergias a los medicamentos, betalactámicos, los cuales por su estructura (cadenas laterales) que comparten tienen reactividad cruzada (Romano et al., 2016).

## 10 Conclusiones

Se pudo realizar una primer Co-IP en la cual se identificaron 9 proteínas, siendo el hallazgo principal haber inmunoprecipitado al alérgeno mayor Ole e 1-like (Fra e 1). En la segunda Co-IP al haber usado en exceso proteínas de polen no hubo diferencia en cuanto a las proteínas anotadas entre los distintos tratamientos, pero se pudieron identificar 9 de los 15 alérgenos reportados en Olivo. De los cuales se descubrieron los ortólogos de las proteínas Ole e 5 (superóxido dismutasa), Ole e 14 (poligalacturonasa) y Ole e 15 (ciclofilina), los cuales únicamente se han reportado en olivo, donde proponemos la nomenclatura Fra e 5, Fra e 14 y Fra e 15.

Por otro lado, encontramos al menos 5 posibles nuevos alérgenos que no han sido descritos en ninguna oleáceas, sin embargo, son proteínas que ya están caracterizadas como alérgenos en otras especies. Los análisis de secuencia y estructura apoyan la idea de una posible reacción cruzada.

## 11 Perspectivas a futuro

Estamos conscientes de que esta es un primer experimento que abre la pauta para mejorar las condiciones en las que se realiza la Co-IP cuando se busca interacción entre proteínas e IgE. La metodología fue diseñada por el departamento de alergia e inmunogenética del instituto, por lo que al ser la primera vez que se prueba este método tuvimos ciertas limitaciones. Como las 810 proteínas que se encontraron en todos los métodos y que se atribuye al exceso de proteínas empleadas, por lo que se plantea realizar el experimento otra vez teniendo más control de la cantidad de proteínas

La Co-IP además de los costos y las ventajas que se mencionan en apartados previos podría funcionar como una nueva manera de utilizar la proteómica para el diagnóstico personalizado de cada paciente. Siendo una nueva manera de realizar diagnósticos resueltos por componentes para cada paciente.



Se realizarán cambios a la técnica utilizada para realizar la Co-IP, como usar relaciones estequiométricas 1:1 (IgE:proteína). También se buscará purificar la IgE del suero de pacientes sensibles, así como utilizar las columnas que nos pueden ayudar para filtrar por peso molecular una mayor cantidad de proteínas del suero que pueden confundir los resultados, como las que se utilizaron en este experimento.

## 12 Bibliografía

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (n.d.).
- Antunes, J., Borrego, L., Romeira, A., & Pinto, P. (2009). Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergologia et Immunopathologia*, 37(3), 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-0546\(09\)71728-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0546(09)71728-8)
- Asturias, J. A., Arilla, M. C., Gómez-Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., & Palacios, R. (1997). Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(3), 365–372. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70250-1](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70250-1)
- Bach, J.-F. (2018). The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 105–120. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.111>
- Bardeas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G., & Villalba, M. (2005). Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.001>
- BOUSQUET, J., GUERIN, B., HEWITT, B., LIM, S., & MICHEL, F.-B. (1985). Allergy in the Mediterranean area III: cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clinical & Experimental Allergy*, 15(5), 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1985.tb02293.x>
- Calderon-Ezquerro, M. C., Guerrero-Guerra, C., Galán, C., Serrano-Silva, N., Guidos-Fogelbach, G., Jiménez-Martínez, M. C., Larenas-Linnemann, D., López Espinosa, E. D., & Ayala-Balboa, J. (2018). Pollen in the atmosphere of Mexico City and its impact on the health of the pediatric population. *Atmospheric Environment*, 186, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.05.006>
- Carmo-Silva, A. E., Barta, C., & Salvucci, M. E. (2011). *Isolation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Leaves* (pp. 339–347). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3_26)
- Carr, T. F., & Saltoun, C. A. (2012). Chapter 2: Skin testing in allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 33(3), 6–8. <https://doi.org/10.2500/aap.2012.33.3532>
- Castro, L., Crespo, J. F., Rodríguez, J., Rodríguez, R., & Villalba, M. (2015). Immunoproteomic tools are used to identify masked allergens: Ole e 12, an allergenic isoflavone reductase from olive (*Olea europaea*) pollen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(12), 1871–1880. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.09.004>
- Chou, H., Tam, M. F., Chiang, C.-H., Chou, C.-T., Tai, H.-Y., & Shen, H.-D. (2011). Transaldolases are novel and immunoglobulin E cross-reacting fungal allergens. *Clinical*

- & *Experimental Allergy*, 41(5), 739–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03698.x>
- Chou, H., Wu, K.-G., Yeh, C.-C., Tai, H.-Y., Tam, M. F., Chen, Y.-S., & Shen, H.-D. (2014). The Transaldolase, a Novel Allergen of *Fusarium proliferatum*, Demonstrates IgE Cross-Reactivity with Its Human Analogue. *PLoS ONE*, 9(7), e103488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103488>
- Cramer, R. (2005). The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. *Allergy*, 60(10), 1227–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00873.x>
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Evans, I. M., & Paliashvili, K. (2022). *Co-immunoprecipitation Assays* (pp. 125–132). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2217-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2217-9_8)
- Faurobert, M., Pelpoir, E., & Chaïb, J. (n.d.). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. In *Plant Proteomics* (pp. 9–14). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:9>
- Fletcher, T. S., Kwee, I. L., Nakada, T., Largman, C., & Martin, B. M. (1992). DNA sequence of the yeast transketolase gene. *Biochemistry*, 31(6), 1892–1896. <https://doi.org/10.1021/bi00121a044>
- Geha, R. S., Jabara, H. H., & Brodeur, S. R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nri1181>
- Gilles, S., Mariani, V., Bryce, M., Mueller, M. J., Ring, J., Behrendt, H., Jakob, T., & Traidl-Hoffmann, C. (2009). Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a TH2-dominated response. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-5-3>
- HEMMANN, S., BLASER, K., & CRAMER, R. (1997). Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* Share IgE-binding Epitopes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(6), 1956–1962. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.6.9702087>
- Hemmer, W., Focke, M., Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R., Jäger, S., & Götz, M. (2000). Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy*, 55(10), 923–930. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.00671.x>
- Higgins, C. F. (1992). ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology*, 8(1), 67–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>

- Huecas, S., Villalba, M., & Rodríguez, R. (2001). Ole e 9, a Major Olive Pollen Allergen Is a 1,3- $\beta$ -Glucanase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 27959–27966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103041200>
- Johansson, S. G. O. (2016). The discovery of IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(6), 1671–1673. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.004>
- Kelly, B. T., & Grayson, M. H. (2016). Immunoglobulin E, what is it good for? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 116(3), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.10.026>
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J., & Hake, S. (1994). Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *The Plant Cell*, 6(12), 1877–1887. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.12.1877>
- Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E., & Rodríguez, R. (1998). Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *European Journal of Biochemistry*, 258(2), 454–459. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580454.x>
- Lewit-Bentley, A., & Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00142-1)
- Liccardi, G., D'Amato, M., & D'Amato, G. (1996). Oleaceae Pollinosis: A Review. *International Archives of Allergy and Immunology*, 111(3), 210–217. <https://doi.org/10.1159/000237370>
- Lin, J.-S., & Lai, E.-M. (2017). *Protein–Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation* (pp. 211–219). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_17)
- Mani, B. M., Huerta-Ocampo, J. A., Garcia-Sanchez, J. R., Barrera-Pacheco, A., de la Rosa, A. P. B., & Teran, L. M. (2015). Identification of Ligustrum lucidum pollen allergens using a proteomics approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 788–792. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.033>
- Mas, S., Torres, M., Garrido-Arandia, M., Salamanca, G., Castro, L., Barral, P., Purohit, A., Pauli, G., Rodríguez, R., Batanero, E., Barderas, R., & Villalba, M. (2014). Ash pollen immunoproteomics: Identification, immunologic characterization, and sequencing of 6 new allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 923-926.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.061>
- Morales-Amparano, M. B., Huerta-Ocampo, J. Á., Pastor-Palacios, G., & Teran, L. M. (2021). The Role of Enolases in Allergic Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(8), 3026–3032. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.04.005>
- Nakamura, R., & Teshima, R. (2013). Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of Proteomics*, 93, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.018>
- Niederberger, V., Purohit, A., Oster, J. P., Spitzauer, S., Valenta, R., & Pauli, G. (2002). The allergen profile of ash ( *Fraxinus excelsior* ) pollen: cross-reactivity with allergens from

- various plant species. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(6), 933–941.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2002.01369.x>
- O’Hehir, R. E., Holgate, S. T., & Sheikh, A. (2017). *Alergología esencial*. Elsevier Health Sciences .
- Oppenheimer, J., & Nelson, H. S. (2006). Skin testing: a survey of allergists. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 96(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61034-4](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61034-4)
- Pavón-Romero, G. F., Calderón-Ezquerro, M. del C., Rodríguez-Cervantes, M. A., Fernández-Villanueva, D., Melgoza-Ruiz, E., Ramírez-Jiménez, F., & Teran, L. M. (2022a). Association of Allergic Sensitivity and Pollination in Allergic Respiratory Disease: The Role of Pollution. *Journal of Asthma and Allergy, Volume 15*, 1227–1243.  
<https://doi.org/10.2147/JAA.S373307>
- Pavón-Romero, G. F., Calderón-Ezquerro, M. del C., Rodríguez-Cervantes, M. A., Fernández-Villanueva, D., Melgoza-Ruiz, E., Ramírez-Jiménez, F., & Teran, L. M. (2022b). Association of Allergic Sensitivity and Pollination in Allergic Respiratory Disease: The Role of Pollution. *Journal of Asthma and Allergy, Volume 15*, 1227–1243.  
<https://doi.org/10.2147/JAA.S373307>
- Poncet, P., Senechal, H., Clement, G., Purohit, A., Sutra, J. P., Desvaux, F. X., Wal, J. M., Pauli, G., Peltre, G., & Gougeon, M. L. (2010). Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65(5). <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02231.x>
- Ramos-Bello, D., & Llorente, L. (2009). Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos. *Reumatología Clínica*, 5(6), 280–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.05.004>
- Ravindra, K., Goyal, A., & Mor, S. (2022). Pollen allergy: Developing multi-sectorial strategies for its prevention and control in lower and middle-income countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 242, 113951.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113951>
- Reczek, D., & Bretscher, A. (2001). Identification of Epi64, a Tbc/Rabgap Domain–Containing Microvillar Protein That Binds to the First PDZ Domain of Ebp50 and E3karp. *The Journal of Cell Biology*, 153(1), 191–206. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.1.191>
- Romano, A., Gaeta, F., Poves, M. F. A., & Valluzzi, R. L. (2016). Cross-Reactivity among Beta-Lactams. In *Current Allergy and Asthma Reports* (Vol. 16, Issue 3).  
<https://doi.org/10.1007/s11882-016-0594-9>
- Sakamoto, T., Nishimura, A., Tamaoki, M., Kuba, M., Tanaka, H., Iwahori, S., & Matsuoka, M. (1999). The Conserved KNOX Domain Mediates Specificity of Tobacco KNOTTED1-Type Homeodomain Proteins. *The Plant Cell*, 11(8), 1419–1431.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1419>

- Saurin, W., Hofnung, M., & Dassa, E. (1999). Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution*, *48*(1), 22–41. <https://doi.org/10.1007/PL00006442>
- Schäferhoff, B., Fleischmann, A., Fischer, E., Albach, D. C., Borsch, T., Heubl, G., & Müller, K. F. (2010). Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 352. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-352>
- Selinski, J., & Scheibe, R. (2014). Pollen tube growth: where does the energy come from? *Plant Signaling & Behavior*, *9*(12), e977200. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977200>
- Shamji, M. H., & Durham, S. R. (2017). Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(6), 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.010>
- Skoner, D. P. (2001). Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *108*(1), S2–S8. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.115569>
- Smith, M., Berger, U., Behrendt, H., & Bergmann, K.-C. (2014). *Pollen and Pollinosis* (pp. 228–233). <https://doi.org/10.1159/000358743>
- Stern, J., Pier, J., & Litonjua, A. A. (2020). Asthma epidemiology and risk factors. *Seminars in Immunopathology*, *42*(1), 5–15. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00785-1>
- Tan, L., & Yammani, R. R. (2022). *Co-Immunoprecipitation-Blotting: Analysis of Protein-Protein Interactions* (pp. 145–154). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1896-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1896-7_15)
- Tejera, M. L., Villalba, M., Batanero, E., & Rodríguez, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *104*(4), 797–802. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70290-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70290-3)
- Terán, L. M., Haselbarth-López, M. M. M., & Quiroz-García, D. L. (2009). Alergia, pólenes y medio ambiente. *Gac Méd Méx*, *145*(3), 2015–2021.
- Toma-Fukai, S., & Shimizu, T. (2021). Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase. *Molecules*, *26*(21), 6682. <https://doi.org/10.3390/molecules26216682>
- Wang, J., Zhou, Y., Zhang, H., Hu, L., Liu, J., Wang, L., Wang, T., Zhang, H., Cong, L., & Wang, Q. (2023). Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 138. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01344-4>
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *ELECTROPHORESIS*, *24*(14), 2369–2375. <https://doi.org/10.1002/elps.200305500>

- Weber, R. W. (2001). Cross-Reactivity of Plant and Animal Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 21(2–3), 153–202. <https://doi.org/10.1385/CRIAI:21:2-3:153>
- Weber, R. W. (2013). Allergen of the Month—European Olive. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 110(4), A19. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.02.013>
- WHO, & IUIS. (n.d.). *Allergen Nomenclature* .
- Wildner, S., Elsässer, B., Stemeseder, T., Briza, P., Soh, W. T., Villalba, M., Lidholm, J., Brandstetter, H., & Gadermaier, G. (2017). Endolysosomal Degradation of Allergenic Ole e 1-Like Proteins: Analysis of Proteolytic Cleavage Sites Revealing T Cell Epitope-Containing Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1780. <https://doi.org/10.3390/ijms18081780>
- Wise, S. K., Damask, C., Roland, L. T., Ebert, C., Levy, J. M., Lin, S., Luong, A., Rodriguez, K., Sedaghat, A. R., Toskala, E., Villwock, J., Abdullah, B., Akdis, C., Alt, J. A., Ansotegui, I. J., Azar, A., Baroody, F., Benninger, M. S., Bernstein, J., ... Zhang, L. (2023). International consensus statement on allergy and rhinology: Allergic rhinitis – 2023. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 13(4), 293–859. <https://doi.org/10.1002/alr.23090>
- Zheng, N., & Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 129–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>