



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Caracterización estructural y determinación de la alergenicidad del
inhibidor de proteasas rHPI de *Hevea brasiliensis*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Jessica Terrón Hernández

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Adela Rodríguez Romero
Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Nuria Sánchez Puig
Instituto de Química
Dr. Ismael Bustos Jaimes
Facultad de Medicina

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2017



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.

PMDCB/708/2017

Terrón Hernández Jessica
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

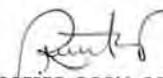
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Caracterización estructural y determinación de la alergenicidad del Inhibidor de proteasas rHPI de Hevea brasiliensis**", dirigida por el/la Dr(a) **Rodríguez Romero Adela**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Moreno Cárcamo Abel
VOCAL	Manoutcharian Airapetian Karen
VOCAL	Sánchez Esquivel Sergio
VOCAL	Hernández Santoyo Alejandra
SECRETARIO	Ortega Soto Enrique

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2017.
COORDINADOR


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Maestría y por el apoyo económico al Proyecto 221169 y a la DGAPA-UNAM por el Proyecto IN207613.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Al Instituto de Química, UNAM

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM)

A Todas las personas que contribuyeron a este trabajo:

Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Patricia Cano Sánchez, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dra. Nuria Sánchez Puig, Dr. Ismael Bustos Jaimes, Yusvel Sierra Gómez, Dr. José Israel Mares Mejía, Dra. Annia Rodríguez Hernández, QFB Ma. Del Rocio Patiño Maya.

A mis compañeros del Instituto de Química, UNAM

RESUMEN

El látex o hule natural se obtiene del árbol *Hevea brasiliensis*, y debido a sus propiedades elásticas, es utilizado en la manufactura de más 40,000 productos de uso cotidiano y médico. Se ha determinado que una constante exposición a estos productos puede causar reacciones de alergia o hipersensibilidad de tipo I, la cual es el resultado de una respuesta inmune inapropiada a ciertas proteínas inocuas (alérgenos), afectando de forma especial al personal médico, sanitario, de la industria del hule e individuos con múltiples intervenciones quirúrgicas. A la fecha, se han identificado 15 proteínas con propiedades inmunogénicas y en nuestro grupo de trabajo, algunas de estas proteínas han sido caracterizadas y reportadas sus estructuras cristalográficas.

En este trabajo se expresó y purificó al inhibidor de serín proteasas rHPI (isoforma recombinante del inhibidor-alérgeno Hev b 15) con el vector pET28a en la cepa de *E. coli* Rosseta ρ , lo que nos permitió obtener un rendimiento de proteína soluble de 18 mg por litro de medio de cultivo. En la caracterización cinética de inhibición de rHPI contra subtilisina, se determinó que conforme se incrementa la concentración del inhibidor, la V_{maxapp} disminuye, mientras que la K_{mapp} se mantiene aproximadamente en $2.02 \times 10^{-3}M$. Estos datos sugieren que rHPI podría tratarse de un inhibidor de tipo No competitivo. Además, rHPI presentó una K_i de $1.09 \times 10^{-5} M$, que de acuerdo con la clasificación de Bieth (1995) corresponde a un inhibidor de tipo “clásico” por presentar una K_i en el intervalo de 10^{-2} - $10^{-6} M$.

En cuanto a la estabilidad térmica de rHPI seguida por Dicroísmo Circular y Fluorometría diferencial de barrido, se determinó que es extremadamente resistente a la desnaturalización de 25°C a 95°C en un intervalo de pH 5.8 a 11. Este resultado concuerda con la estabilidad reportada para la familia PR-6 e inhibidores de tipo 1 de papa/tomate clasificados por MEROPS (base de datos para proteasas y sus inhibidores). Aunque esta familia carece de puentes disulfuro intramoleculares, los inhibidores de la familia tipo I de papa son extremadamente estables.

Por otro lado, en la determinación alérgica de rHPI se empleó la técnica de ELISA y suero de pacientes alérgicos al látex y a maíz. La importancia de este ensayo se debe al dramático incremento en el número de personas afectadas por el fenómeno de hipersensibilidad de tipo I a nivel mundial.

En los resultados obtenidos se identificaron diferencias significativas en el reconocimiento de rHPI, observando que de los sueros probados del grupo de pacientes alérgicos a maíz todos tuvieron reconocimiento de rHPI, mientras que de los sueros del grupo de pacientes alérgicos al látex hubo únicamente reconocimiento significativo en el suero de un paciente. Por lo tanto, se sugiere que, aunque rHPI no juega un papel crucial en la reacción alérgica mediada por IgE's en pacientes alérgicos al látex; si podría ser considerado un factor determinante en la respuesta alérgica en pacientes alérgicos a alimentos por reactividad cruzada. De acuerdo con Malo y Chan-Yeung, (2009), la respuesta alérgica mediada por IgE's en presencia de proteínas de cereales es relativamente frecuente y puede ser provocada por la exposición a través de diferentes rutas, y afectar a varias poblaciones y grupos de edad en todo el mundo. Aunque el trigo es el cereal más comúnmente involucrado, otros como el centeno, la cebada, el arroz, la avena y el maíz, también juegan un papel importante en la alergia.

Finalmente, para definir la estructura terciaria del rHPI, se determinó que a una concentración de proteína de 15 mg/mL, después de dos días de incubación a 18°C en la condición de acetato de magnesio 0.2 M, cacodilato de sodio 0.1 M, pH 6.5 y 20 % w/v PEG 8000, se obtienen cristales proteicos adecuados para ensayos de difracción de rayos X. Los cristales difractan a una resolución de 2.04 Angstroms; sin embargo, no son cristales únicos sino maclas.

El estudio detallado de la estructura tridimensional de rHPI permitirá identificar cuáles son los residuos de aminoácidos que, por su accesibilidad y características en la molécula, podrían estar participando en la unión con las IgE's. Además, permitirá encontrar los posibles motivos estructurales que son compartidos entre los alérgenos que han sido identificados como los responsables de la antigenicidad cruzada entre el látex y frutas o plantas. Estos reconocimientos podrán ser utilizados en el diseño de moléculas alergénicas que sirvan para el diagnóstico de la alergia al látex y en los procesos de inmunoterapia específica.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	11.2
	Serín proteasas	4
1.3	Inhibición de la proteólisis en plantas.....	6
1.3.1	Herbivoría y las proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP).....	6
1.3.2	Mecanismo de inhibición.....	9
1.3.3	Inhibidores de serín proteasas en plantas	11
1.3.4	Hev b 15, miembro de la Familia de inhibidores Tipo I de papa o PR-6.....	12
1.4	Alergia e hipersensibilidad	13
1.4.1	Alergia al látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	15
2	JUSTIFICACIÓN	18
3	HIPÓTESIS	19
4	OBJETIVOS	19
4.1	Objetivo general	19
4.1.1	Objetivos particulares.....	19
5	METODOLOGÍA	20
5.1	Evaluación de la presencia del inhibidor de serín proteasas más abundante en el suero citoplasmático del látex de <i>H. brasiliensis</i>	20
5.2	Clonación y sobreexpresión de rHPI.....	21
5.3	Purificación de rHPI.....	23
5.4	Espectrometría de masas	23
5.5	Caracterización	24
5.5.1	Espectro de dicroísmo circular.....	24
5.5.2	Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia	24
5.5.3	Cinética de inhibición	25
5.5.4	Reconocimiento de rHPI por anticuerpos tipo IgE	26
5.5.5	Cristalización de rHPI.....	27
6	RESULTADOS.....	28
6.1	Evaluación de la presencia del inhibidor de serín proteasas más abundante en el suero citoplasmático del látex de <i>H. brasiliensis</i>	28
6.2	Clonación y sobre-expresión de rHPI.....	31

6.3	Purificación de rHPI.....	32
6.4	Espectrometría de masas	36
6.5	Caracterización	37
6.5.1	Espectro de Dicroísmo Circular	37
6.5.2	Fluorometría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia	39
6.5.3	Cinética de inhibición de la subtilisina A Carlsberg.....	40
6.5.4	Reconocimiento de rHPI por anticuerpos tipo IgE	42
6.5.5	Cristalización de rHPI.....	45
7	DISCUSIÓN	47
8	CONCLUSIONES	51
9	REFERENCIAS.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Látex exudado del árbol <i>Hevea brasiliensis</i>	1
Figura 2. Mecanismo catalítico general de las serín proteasas.....	6
Figura 3. Sitio de clonación del vector de expresión pET28a.....	22
Figura 4. Sistema de expresión pET-28a en células de <i>E. coli Rosseta p:cam^r</i>	22
Figura 5. Perfil de elución de HPI en una columna de exclusión molecular.....	29
Figura 6. Espectro de masas MALDI-TOF de HPI.	30
Figura 7. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los inhibidores de proteasas Hev b 15 y HPI empleando el servidor Blast NCBI.....	31
Figura 8. Expresión de rHPI_His ₆	32
Figura 9. Purificación de rHPI_His ₆ por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	33
Figura 10. Fracciones eluidas de rHPI_His ₆ de la columna de afinidad a Ni ²⁺ con un gradiente de Imidazol de 20-500 mM.	33
Figura 13. Purificación de rHPI por cromatografía de Intercambio Aniónico.....	35
Figura 14. Espectro de masas MALDI-TOF de rHPI..	36
Figura 15. Espectro de Dicroísmo circular de rHPI. 90-20°C.	38
Figura 16. Efecto del pH en la estabilidad térmica de rHPI por fluorometría diferencial de barrido.....	39
Figura 17. Gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para un inhibidor de tipo No competitivo.	41
Figura 18. Representación gráfica secundaria para un inhibidor de tipo No competitivo...42	
Figura 19. Cristales de rHPI.	45
Figura 20. Patrón de difracción de los cristales de rHPI.....	46
Figura 21. Experimentos de ELISA con rHPI.	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alérgenos del látex-hule natural, reconocidos y registrados internacionalmente por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas...3
Tabla 2. Principales propiedades de las familias de proteínas clasificadas como PRP.....9
Tabla 3. Principales familias de inhibidores de serín proteasas reportados en plantas.11
Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos de los ensayos de inhibición de la Subtilisina Carlsberg con rHPI, mediante el método de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.41

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Actualmente se han reportado más de 20,000 especies de plantas productoras de látex, de las cuales cerca de 7,000 producen hule. Sin embargo, el hule natural de interés comercial es derivado de una sola planta cultivada, *Hevea brasiliensis*, conocida como el árbol del hule. *H. brasiliensis* es una planta tropical perteneciente a la familia Euphorbiaceae, originaria de la Cuenca Baja del Río Amazonas en Brasil, la cual es cultivada en muchos países, siendo la principal fuente renovable de látex a nivel mundial. El látex de esta planta es una suspensión coloidal de apariencia lechosa que es almacenada en las células laticíferas y exudada por el árbol del hule después de ser estimulado mediante cortes en la corteza (Figura 1A) (Kush *et al.*, 1990; Sritanyarat *et al* 2006). Estas células se localizan en el floema y presentan un complejo sistema citoplasmático principalmente compuesto de partículas del hule (biopolímero cis-1,4-poliisopreno), el cual representa del 30 al 50% del contenido citoplasmático, así como: organelos, proteínas, lípidos, minerales, carbohidratos y el suero C citoplasmático (Jacob *et al.*, 1993; Berthelot *et al.*, 2014).

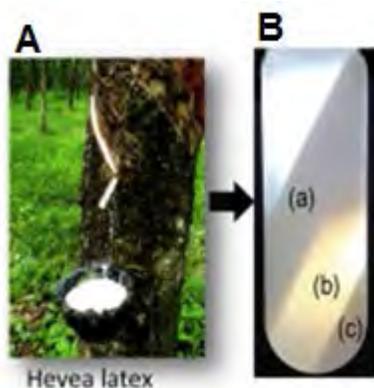


Figura 1. Látex del árbol *Hevea brasiliensis*. A) Exudado del árbol; B) Composición del látex después de la centrifugación: (a) Fracción cremosa, partículas de hule o caucho y Frey-Wyssling, (b) Suero C y (c) Sedimento/lutooides (Imagen tomada de Berthelot *et al.*, 2014).

El papel fisiológico de las células laticíferas se desconoce; sin embargo, parece tratarse de un sistema de defensa del árbol, ya que la coagulación procedente al exudado del látex, involucra la agregación de partículas de hule. Este proceso es un mecanismo de defensa

de la planta contra la invasión de posibles patógenos, bloqueando el acceso a las heridas sufridas (Farrell *et al.*, 1991; Sritanyarat *et al.*, 2006).

H. brasiliensis además de ser la especie que genera la mayor cantidad de hule, produce el biopolímero con la más alta calidad comercial, ya que posee propiedades físicas únicas, incluyendo la resiliencia, elasticidad, así como su maleabilidad en frío, etc. Es por ello que este hule es utilizado en más de 40,000 productos, incluyendo más de 400 dispositivos médicos, guantes quirúrgicos, productos de ingeniería y vestimenta (Jacob *et al.*, 1993; Chotigeat *et al.*, 2008; Berthelot *et al.*, 2014).

Dada la importancia del hule como materia prima para la industria, estudios de proteómica y transcriptómica han permitido conocer el mecanismo de síntesis del hule, así como de los eventos moleculares implicados. A partir de estos estudios se han identificado 186 diferentes proteínas (Wang *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2013), algunas de las cuales están relacionadas al sistema de defensa de la planta, entre estas se encuentran: la quitinasa, β -1,3-glucanasa, hevaminas, heveína, glucosidasa, β -galactosidasa, β -N-acetilglucosaminasa, polifenol oxidasa, un inhibidor de proteasas (Jacob *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2003) y más recientemente, nuestro grupo de trabajo describió a una proteína tipo quitinasa (Martínez-Caballero *et al.*, 2014).

Del total de proteínas, 15 han sido identificadas con propiedades alergénicas, designadas internacionalmente como Hev b 1-15 por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Tabla 1). Algunas de estas proteínas se han aislado de la fuente natural o bien han sido clonadas y se han caracterizado parcialmente, con algunas excepciones donde se determinó la estructura tridimensional (Rodríguez-Romero, 1991; Rodríguez-Romero *et al.*, 2013; Martínez-Caballero *et al.*, 2014). En este punto es importante mencionar que la alergia al látex natural es un problema de salud pública cada vez más común, ya que el consumo de hule natural se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas, con el empleo de equipo médico, guantes de limpieza y profesionales, condones, globos, pelotas, equipo deportivo, etc. Además, varios reportes han demostrado la presencia de algunos alérgenos o fragmentos inmunológicamente activos en guantes de hule natural tanto de exploración como quirúrgicos, capaces de causar la sensibilización de personas con predisposición genética y de provocar una respuesta de alergia al látex (Galli, 2000; Galicia *et al.*, 2015).

Tabla 1. Alérgenos reconocidos en el látex-hule natural y registrados Internacionalmente por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas

Alérgeno	Nombre	Localización	MM kDa	pI	Glicosilación	Papel fisiológico predicho	No. de acceso
Hev b 1	Factor de elongación del caucho REF	Partículas de caucho largas	14.7	5.0	-	Biosíntesis de caucho	P15252
Hev b 2	Beta-1,3-glucanasa	Lutoides	35.1	9.5	+	Proteína relacionada con la defensa	Q7XJ83; P52407
Hev b 3	Proteína pequeña del caucho (SRPP)	Partículas pequeñas del caucho	22.4	4.8	-	Biosíntesis del caucho	O82803
Hev b 4	Homólogo de lecitinasa	Lutoides	53-55	4.5	+	Componentes de microhélices	Q8WPJ2
Hev b 5	Proteína del látex ácida	Citoplasma	16	3.5	-	Proteína estructural	Q39967
Hev b 6	Precursores y heveína (4.7 kDa)	Lutoides	21	5.6	-	Lectina, Coagulación del látex	P02877
Hev b 7	Homólogo de patatina	Citoplasma	42.9	4.8	+	Proteína relacionada con la defensa	AC27724
Hev b 8	Profilina	Citoplasma	15	4.9	-	Vinculación con el citoesqueleto	Y15402; AJ243325
Hev b 9	Enolasa	Citoplasma	47.7	5.6	-	Enzima glicolítica	AJ132581
Hev b 10	Superóxido dismutasa	Mitocondria	26	6.3	-	Enzima, destrucción radical	P35017
Hev b 11	Proteína tipo quitinasa clase I	Lutoides	33	5.1	-	Proteína relacionada con la defensa	AJ238579
Hev b 12	Proteína no específica de transferencia de lípidos	Membranas del látex	9.3	10.8	+	Proteína relacionada con la defensa	AAL25839 Q8RYA8
Hev b 13	Esterasa	Lutoides	43	5.0	+	Proteína relacionada con la defensa	Q7Y1X1
Hev b 14	Hevaína	Lutoides	33.7	8.7	-	Proteína relacionada con la defensa	P23472
Hev b 15	Inhibidor de serina proteasas	Látex	7.5	4.8	¿	Alérgeno	CCW27997; W0USW9

(Tomada de Berthelot *et al*, 2014).

Este trabajo se centra en la caracterización del inhibidor de serín proteasas recombinante rHPI (por sus siglas en inglés Hevea protease inhibitor), del cual sólo se ha reportado la

secuencia, así como su caracterización bioquímica parcial a partir de un homogenado del suero citoplasmático de látex de *Hevea brasiliensis* (Sritanyarat *et al.*, 2006). Estos autores reportaron 3 isoformas del inhibidor HPI, los cuales presentan la misma secuencia de aminoácidos (69 residuos); sin embargo, exhiben diferentes masas moleculares, sugiriendo posibles modificaciones post-traduccionales de un solo residuo de cisteína con dos pequeños aductos orgánicos resultando en 3 tipos de isoformas. Estas proteínas inhiben fuertemente a la subtilisina A, débilmente a la tripsina y no inhiben a la quimotripsina. Además, estas isoformas presentan de 33-55% de identidad (50-74% de similitud) con la familia de inhibidores tipo I de papa, clasificada por MEROPS, por lo que posiblemente comparten características bioquímico-estructurales con otros inhibidores pertenecientes a esta familia. Finalmente, cabe resaltar que la secuencia reportada para el inhibidor HPI (No de acceso [Q6XNP7.2](#)) comparte 77% de identidad con el inhibidor-alérgico Hev b 15, por lo que se espera que HPI también presente características inmunológicas.

1.2 Serín proteasas

Las enzimas proteolíticas, o proteasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos específicos en sus proteínas blanco (Antão y Malcata, 2005). Estas enzimas desempeñan funciones cruciales en la fisiología y patología de todos los organismos al controlar la síntesis y la función de proteínas, siendo indispensables para el mantenimiento y la supervivencia.

De acuerdo a sus características estructurales, las proteasas se encuentran agrupadas en clanes y familias según la base de datos MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk>). Un clan comprende proteínas que presentan similitud tanto en sus estructuras 3D como en las regiones que rodean al centro catalítico y pueden ser consideradas homólogas. En tanto una familia comprende proteínas con similitud significativa de secuencia aminoacídica dentro de un mismo clan. Estas enzimas han sido clasificadas como endopeptidasas, aminopeptidasas, o carbopeptidasas de acuerdo a la localización del enlace que hidrolizan; además, dependiendo del mecanismo catalítico, las proteasas se agrupan en subclases (Hartley, 1960; Rawlings y Barrett, 1993; Rawling *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2006; Van der Hoorn, 2008). Por ejemplo, las endopeptidasas se encuentran agrupadas en seis subclases según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología

Molecular (IUBMB) denominadas como endopeptidasas: serínicas EC 3.4.21 (poseen un residuo de serina en el sitio catalítico); cisteínicas EC 3.4.22 (presentan un residuo de cisteína en el sitio catalítico); aspárticas EC 3.4.23 (dependen de un residuo de ácido aspártico para su actividad catalítica); metalo EC 3.4.24 (usan un ion metálico, normalmente Zn^{2+} en su mecanismo catalítico); treonínicas EC 3.4.25 (dependen de un residuo de treonina para su actividad catalítica); y de mecanismo catalítico desconocido EC 3.4.99 (Antão y Malcata, 2005). A su vez, las proteasas pueden ser subclasificadas de acuerdo a la especificidad del residuo P1 del sitio de corte P1-P1' del sustrato. Por ejemplo, las serín proteasas se dividen en tres grupos de acuerdo a esta clasificación: las proteasas tipo tripsina reconocen residuos cargados positivamente como lisina o arginina; las proteasas del tipo elastasa, en cambio, reconocen residuos pequeños e hidrofóbicos y las del tipo quimotripsina reconocen residuos grandes e hidrofóbicos como fenilalanina, tirosina o leucina. El sitio activo de estas enzimas consiste en una triada catalítica de serina (un nucleófilo), histidina (una base) y aspártico (un electrófilo) (Ser/His/Asp) y el mecanismo de acción se detalla en la Figura 2. Los dos pasos básicos de la catálisis son: (1) La formación de un enlace éster entre el átomo de oxígeno de la serina y la porción acil del sustrato, lo cual produce un intermediario tetraédrico y libera la parte amino del sustrato, y (2) El ataque de una molécula de agua en el intermediario acil-enzima, la cual rompe y libera un producto ácido, regenerando a la enzima original (Antão y Malcata, 2005).

La mayor diferencia entre las clases catalíticas es la naturaleza del nucleófilo y la estabilidad del oxianión. Las serín y cisteín proteasas utilizan un residuo de Ser o Cys respectivamente, como nucleófilo, activado por la His del sitio activo, formando complejos enzima-sustrato covalentes y el agujero del oxianión es generalmente estabilizado por dos residuos de la cadena principal de la proteasa. Las metalo y aspártico proteasas utilizan agua como nucleófilo, activado por interacciones electrostáticas con un ion metálico (Me^{2+}) o aspartato (Asp), respectivamente. El oxianión de estas proteasas es estabilizado por Me^{2+} y Asp, respectivamente (Antão y Malcata, 2005; Van der Hoorn, 2008).

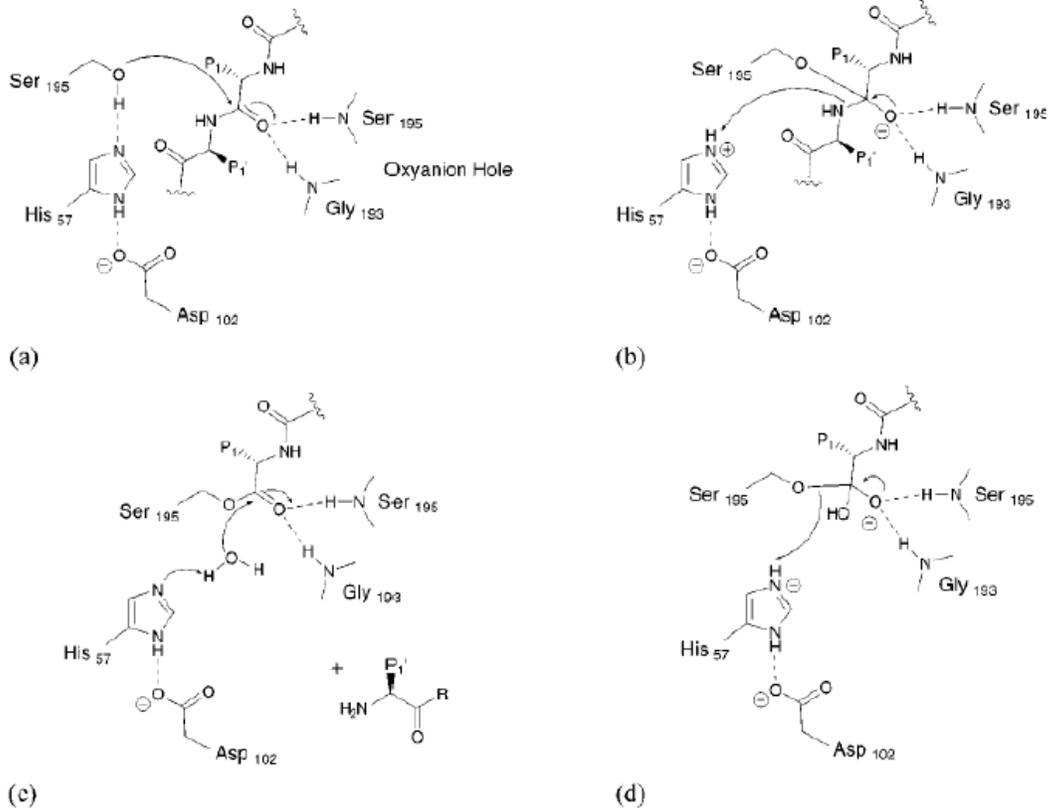


Figura 2. Mecanismo catalítico general de las serín proteasas. (a) La unión del sustrato al sitio activo forma un complejo del tipo Michaelis-Menten, en donde el hidroxilo de la serina 195 de la triada catalítica realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del péptido escindible (P1) (en medio básico generado por el imidazol de la histidina) para formar el intermediario tetraédrico. (b) El intermediario tetraédrico resultante es estabilizado por un puente de hidrógeno entre el NH de la serina 195 (para la quimotripsina) y la glicina (Gly193), que forma el agujero oxianión. Una transferencia del protón de la His57 al grupo amina del intermediario facilita la expulsión del fragmento C-terminal del sustrato dando un complejo acilo. (c) El complejo acil-enzima es atacado por una molécula de agua, con la formación de un nuevo intermediario tetraédrico (d) con una subsecuente ruptura vía catálisis ácida de His57 para dar el fragmento amino terminal del sustrato y regenerar la Ser195 (Imagen tomada de Leung *et al.*, 2000).

1.3 Inhibición de la proteólisis en plantas

1.3.1 Herbivoría y las proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP)

La proteólisis es un proceso metabólico esencial requerido para el procesamiento y recambio de proteínas. Durante la germinación, las proteasas median la degradación de proteínas almacenadas para la asimilación de nitrógeno en vías biosintéticas. Estas enzimas también están implicadas en el proceso de desarrollo, además de ser importantes componentes en la interacción entre plantas y otros organismos. Por lo que, la regulación de la actividad de proteasas es un componente integral del proceso bioquímico esencial

para el crecimiento y desarrollo de la planta, así como de respuesta de defensa (Koiwa *et al.*, 1997; Van der Hoorn, 2008).

Los inhibidores de proteasas son una clase estructuralmente muy diversa y ubicua de proteínas de bajo peso molecular, las cuales son particularmente abundantes en órganos de almacenamiento tal como semillas y tubérculos. En plantas superiores, varias familias de inhibidores de proteasas han sido caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente. La base estructural de la interacción entre proteasas y sus inhibidores está bajo continua investigación. Estos inhibidores están involucrados en muchos procesos fisiológicos, vía control de la actividad proteolítica, incluyendo: 1) control de la actividad de proteínas endógenas durante la maduración de la semilla y la dormancia, 2) como proteínas de almacenamiento, las cuales son degradadas durante la germinación y el crecimiento de plántulas, 3) participan en la regulación del recambio de proteínas durante la diferenciación de elementos traqueales (tejido vascular), 4) están implicadas en los procesos de degradación de proteínas inducidas por la edad y la regulación de la muerte celular programada, así como 5) participan en el sistema de defensa contra herbívoros (Balestrazzi *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2015).

El ejemplo mejor caracterizado es la respuesta de defensa inducida por heridas en la planta ocasionadas por herbívoros y patógenos. Si bien, es conocido que los insectos usan una combinación de serín, cisteín y aspártico proteasas, como principales enzimas proteolíticas digestivas, los inhibidores de estas enzimas son producidos por plantas, modulando así el crecimiento y el desarrollo de plagas mediante la atenuación de la degradación de proteínas. Ante esta defensa, los insectos responden mediante la sobreproducción de proteasas intestinales para compensar la actividad inhibitoria, pero la síntesis adicional de proteasas conduce a una inadecuada digestión y absorción de aminoácidos esenciales, retrasando el crecimiento y, finalmente la muerte por inanición (Koiwa *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 2007; El-latif, 2014).

Durante el largo curso de la interacción y coevolución con insectos herbívoros, las plantas han evolucionado en una amplia gama de mecanismos de defensa para contrarrestar los ataques de insectos. Estos mecanismos pueden ser generalizados en dos categorías: 1) defensa preformada (constitutivo) y 2) defensa inducible. La defensa constitutiva o de primera línea incluye barreras físicas y químicas como la cutícula y la reticulación de la pared celular, que existen antes de ser atacadas por el insecto, pudiendo prevenir la invasión por muchos microorganismos (Ferreira *et al.*, 2007). Por supuesto, algunos de los mecanismos de defensa constitutiva pueden incrementarse a niveles aún más altos

después del ataque de insectos. Por otra parte, la defensa inducible ha sido un foco de investigación en las últimas décadas, dado que es un mecanismo que incurre en menos costos metabólicos para la planta hospedera, y es plaga-específica.

El mecanismo inducible es activado por el ataque de herbívoros, lo que inicia una respuesta asociada con un conjunto de alteraciones metabólicas coordinadas, que son fundamentales para impedir el ingreso de patógenos. El flujo de iones a través de las membranas, la generación de especies reactivas de oxígeno, cambios en el estado de fosforilación de proteínas regulatorias y la activación transcripcional del sistema de defensa, culminan en la muerte celular del sitio de infección. Estas proteínas de defensa, denominadas PRP (*Pathogenesis-related proteins*), no sólo son acumuladas localmente en las hojas infectadas, también pueden ser inducidas sistémicamente (localizaciones distales), desarrollando una resistencia sistémica adquirida (SAR) contra la infección por hongos, bacterias y virus. La inducción de las PRP ha sido encontrada en muchas plantas pertenecientes a varias familias, sugiriendo un papel general de estas proteínas en la adaptación frente a condiciones de estrés biótico (Van Loon y Van Strien, 1999).

El término PRP se utiliza para agrupar a aquellas proteínas que no se encuentran o que son detectables a concentraciones basales en tejidos saludables, pero para las cuales su incremento ha sido demostrado en condiciones patológicas (virus, bacterias y hongos), en situaciones relacionadas en al menos dos o más combinaciones planta-patógeno, así como en respuesta a algunos agentes químicos que actúan de una forma similar a la infección por patógenos (Bode y Huber, 1992; Sels *et al.*, 2008). Actualmente se sabe que, las PRPs se encuentran localizadas en casi todos los órganos de las plantas incluyendo las hojas, tallos, raíces y flores, aunque la máxima abundancia de estas proteínas se encuentra en las hojas y en órganos de almacenamiento tal como semillas y tubérculos.

Las proteínas PRP fueron identificadas por primera vez en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectadas con el virus del mosaico del tabaco, siendo caracterizadas a nivel molecular y bioquímico, y clasificadas dentro de 5 familias basadas en la homología de su secuencia de aminoácidos. Estas cinco familias constituían un grupo pequeño de proteínas ácidas y básicas. Generalmente las formas ácidas de estas familias se encontraban en el espacio extracelular y las formas básicas eran transportadas a vacuolas por un péptido señal, localizado en el carboxilo terminal. Posteriormente fueron detectadas en numerosas especies de plantas y se extendió el número a 17 familias. En 1994 se propuso una nomenclatura unificada para las PRP basada en la agrupación en familias de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos, relación serológica y actividad biológica o

enzimática y enumeradas en el orden en el cual fueron descubiertas (Van Loon y Van Strien, 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Principales propiedades de las familias de proteínas clasificadas como PRP.

Familia	Tipo de miembro	Tamaño (kDa)	Propiedades
PR-1	PR-1a de Tabaco	15	Antifúngico
PR-2	PR-2 de Tabaco	30	B-1,3-Glucanasa
PR-3	P,Q de Tabaco	25-30	Quitinasa (Clase I,II,IV,V,VI,VII)
PR-4	R de Tabaco	15-20	Quitinasa (Clase I,II)
PR-5	S de Tabaco	25	Tipo Taumatina
PR-6	Inhibidor I de Tomate	8	Inhibidor de proteasas
PR-7	P ₆₉ de Tomate	75	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de pepino	28	Quitinasa Clase III
PR-9	Peroxidasa de formación de lignina	35	Peroxidasa
PR-10	PR1 de Perejil	17	Tipo Ribonucleasa
PR-11	Quitinasa clase V de Tabaco	40	Quitinasa Clase I
PR-12	Rs-AFP3 de Rábano	5	Defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	5	Tionina
PR-14	LTP4 de Cebada	9	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	OxOa de Cebada	20	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de Cebada	20	Tipo Oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de Tabaco	27	Desconocida

(Tomada de Sels *et al.*, 2008)

Las proteínas PRP exhiben múltiples funciones dentro de la planta, muchas de estas proteínas presentan actividad de quitinasas, glucanasas, endoproteinasas, peroxidasas, así como proteínas pequeñas semejantes a defensinas, tioninas, proteínas transportadoras de lípidos e inhibidores de proteasas. Así, las proteínas PRP tienen una función crucial en la resistencia a enfermedades, germinación de semillas, y la facilitación de las plantas para adaptarse al estrés ambiental.

A pesar de su nombre común, estas proteínas muestran una gran diversidad en la especificidad de las especies y en el mecanismo de acción y no comparten ninguna relación estructural entre ellas.

1.3.2 Mecanismo de inhibición

La clasificación de Inhibidores de proteasas (IPs) de MEROPS, agrupa a los IPs en distintas familias o subfamilias, así como en diferentes clanes, según la secuencia o estructura de sus dominios. A diferencia de la proteasas, las familias de inhibidores no pueden ser agrupados según el tipo de enzimas que inhiben, ya que algunas familias incluyen inhibidores que actúan sobre distintas clases de proteasas. Un dominio inhibitorio se define

como el segmento de secuencia aminoacídica que contiene un sólo sitio de unión o reconocimiento a su enzima blanco. Basados en la homología de los dominios inhibitorios, los inhibidores se han clasificado en 48 familias. Once de estas familias son inhibidores complejos, ya que presentan más de un dominio inhibitorio (entre 2 y 15 dominios inhibitorios). De acuerdo a la estructura terciaria 31 de las 48 familias han sido asignadas a 26 clanes, indicando que una gran proporción estas familias no tienen relación en sus estructuras tridimensionales (Rawling *et al.*, 2004).

La forma en que estas unidades inhibitorias interactúan con sus enzimas blanco varía enormemente. Sin embargo, se reconocen tres tipos de mecanismos generales de inhibición: canónico, mecanismo no canónico (mecanismos reversibles), y serpinas (mecanismo irreversible). Los inhibidores canónicos se unen a la enzima blanco a través de un asa de unión expuesta, la cual es altamente complementaria en forma al sitio activo de la enzima. Ésta actúa a través de múltiples interacciones débiles, de manera similar a como lo haría un sustrato ideal, disminuyendo la actividad proteolítica de la enzima blanco al competir con el sustrato por el sitio catalítico, impidiendo el acceso del sustrato a este último. Los inhibidores no canónicos interactúan a través de su extremo N-terminal mediante amplias interacciones secundarias fuera del sitio activo que contribuyen significativamente a la velocidad y fuerza de inhibición, así como en la especificidad por su enzima blanco. Las serpinas (irreversibles) son inhibidores similares a los canónicos, los cuales interactúan con su proteasa blanco a manera de sustrato, en donde el asa de unión, es reconocida por el sitio catalítico de la proteasa sustrato y se forma un complejo de inhibición cuando la proteasa rompe el enlace sensible (P1-P1') presente en el asa de la serpina. Este complejo inicial, luego sufre un cambio conformacional en el que la proteasa es traslocada, lo que produce la distorsión de su sitio activo y la pérdida de actividad. Debido a que estos inhibidores no se regeneran luego de interactuar con su enzima blanco son conocidos como suicidas (Krowarsch *et al.*, 2003).

Los inhibidores de proteasas tienen una estabilidad estructural muy grande en diferentes ambientes y condiciones debido a su tamaño y estructura compacta, y en algunos casos por la presencia de varios puentes disulfuro intramoleculares. A pesar de que los puentes disulfuro son considerados químicamente inertes, estudios recientes demuestran que son indispensables, ya que la delección o el re-arreglo de estos puentes disulfuro en inhibidores tipo Bowman-Birk (BBI) y Pin-II de papa afectan su funcionalidad. Todos los tipos de IPs presentan plegamientos característicos (Joshi *et al.*, 2013).

1.3.3 Inhibidores de serín proteasas en plantas

De las principales familias de inhibidores de proteasas encontradas en plantas, los inhibidores de serín proteasas son los más estudiados y han sido aislados de varias leguminosas. Las familias más importantes de estos inhibidores son: los Kunitz (KTI), Bowman-Birk (BBIs) y Tipo I y II de papa (PIN I, PIN II) (Tabla 3). Los inhibidores Kunitz y Bowman-Birk comparten un mecanismo de acción canónico, es decir, poseen un mecanismo de acción clásico de unión al sustrato, y el complejo que forma con la proteasa se disocia muy lentamente. Sin embargo, presentan marcadas diferencias en su estructura y composición aminoacídica. Los inhibidores Kunitz son los inhibidores mejor estudiados y generalmente son proteínas con masas moleculares de entre 18 y 22 kDa, con 2 puentes disulfuro y un solo sitio de reconocimiento de tripsina, además de mostrar una gran variabilidad estructural, lo que resulta en una diversidad funcional. Los inhibidores tipo Bowman-Birk son proteínas con masas moleculares de entre 8 y 10 kDa, con 7 puentes disulfuro y dos sitios reactivos de tripsina y quimotripsina. Los inhibidores de proteasas PIN I y PIN II de papa son de gran interés al estar relacionados con la defensa de la planta, inducidos por infección o daño. Estos inhibidores no sólo son inducidos por daños mecánicos en las hojas, sino que además, están regulados por señales ambientales y de desarrollo (Joshi *et al.*, 2013). Similar a los KTIs, la familia de PIN I y PIN II muestran alta diversidad estructural y funcional.

Tabla 3. Principales familias de inhibidores de serín proteasas reportados en plantas.

Familia	Monómero kDa	Cisteínas	Enzimas inhibidas	Distribución
1. Bowman-Birk	8-9 (14)	14 (8)	Tripsina Quimotripsina Elastasa	Leguminosas Gramíneas
2. Kunitz	18-22	4	Tripsina Quimotripsina Subtilisina Calicreína Amilasa	Leguminosas Gramíneas Aráceas Alismatáceas
3. Papa I	8-9	0-2	Quimotripsina Tripsina Subtilisina	Solanáceas Gramíneas Leguminosas Poligonáceas
4. Papa II	6 (12)	8	Tripsina Quimotripsina	Cucurbitáceas Solanáceas

Tomada y modificada de Ryan CA (1990).

Las proteínas PIN I fueron inicialmente aisladas de tubérculos de papa y en estudios más recientes se ha demostrado su expresión en hojas, tallos y flores. Las proteínas homólogas de PIN I son encontradas en varias especies de plantas como la cebada o el maíz, mientras que PIN II parece estar restringida a las Solanáceas. En general, se sugiere que las proteínas PIN interactúan con las enzimas digestivas en el intestino de herbívoros, restringiendo la absorción de aminoácidos esenciales y consecuentemente interfieren con el desarrollo y crecimiento del herbívoro. Ensayos *in vitro* confirman los efectos inhibitorios de los PINs de plantas sobre las serín proteasas digestivas tripsina, quimotripsina y subtilisina. El efecto perjudicial observado en herbívoros y plagas llevó al desarrollo de plantas inhibidoras transgénicas, disminuyendo de esta forma la tasa de crecimiento de insectos, además de la baja toxicidad para los mamíferos. Más allá de la biotecnología vegetal, los IPs de plantas son relevantes en farmacología, debido a su potente capacidad para prevenir carcinogénesis en una amplia variedad de sistemas *in vivo* e *in vitro* (Kim *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2015).

Por otra parte, se han purificado varios inhibidores de proteasas potencialmente no tóxicos, en su mayoría de origen bacteriano o vegetal, a partir de semillas de cebada, hojas de col y *streptomyces*, los cuales están comercialmente disponibles para la prevención de la dermatitis perianal inducida por proteasas (Kim *et al.*, 2009). Además, los KTIs y BBI de plantas inhiben proteínas que actúan en la cascada de coagulación de la sangre o en la fibrinólisis tal como el factor XIIa, factor Xa, trombina, plasmina, calicreína plasmática o el activador del plasminógeno tisular. La elastasa y la catepsina G, involucradas en el proceso inflamatorio en humanos son inhibidas por KTIs aisladas de semillas de *Bauhinia* (Neuhof *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2010). Inhibidores de tripsina de *Peltophorum dubium* (PDTI) y la soya, inducen la muerte de la línea celular Jurkat (leucemia de humano) por la activación de las caspasas 3 y 8. Inhibidores de semilla de la soya negra China suprimen la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 y células de hepatoma. Inhibidores de tripsina derivados de *Bauhinia rufa* (BrTI), inhiben la adhesión de células tumorales a las glicoproteínas de la matriz extracelular (Nakahata *et al.*, 2006).

1.3.4 Hev b 15, miembro de la Familia de inhibidores Tipo I de papa o PR-6

La secuencia de aminoácidos del inhibidor de serín proteasas Hev b 15 presenta alta identidad con la Familia de proteínas relacionadas a la patogénesis PR-6, clasificada por Van Loon y Van Strien (1999), que incluye únicamente a inhibidores de serín proteasas de

plantas. A su vez, ésta se encuentra incluida en la familia de inhibidores tipo I de papa, clasificada por MEROPS, resaltando que estos inhibidores no se limitan únicamente a las papas, sino que también se han encontrado en el endospermo de cebada, y en la calabaza. Estas proteínas presentan una masa molecular de aproximadamente 8 kDa e inhiben proteasas de la Familia S1 (quimotripsina) y S8 (subtilisina, sedolisina, kexina), y estructuralmente no presentan puentes disulfuro; sin embargo, son extremadamente estables, manteniendo su actividad a un pH de 2-9 y a una temperatura de 80°C durante 10 minutos (Seemuller *et al.*, 1986), por lo que se ha sugerido que la formación de puentes de hidrógeno con los residuos localizados en los sitios de reconocimiento proporcionan la estabilidad necesaria (McPhalen *et al.*, 1985).

Este tipo de inhibidores presenta una estructura en forma de cuña y en su borde más sobresaliente se localiza el asa de unión al sitio activo de las proteasas que inhiben. Finalmente, Laskowski y Kato (1980) determinaron un “mecanismo estándar” de inhibición de la actividad proteolítica en el que los inhibidores de serín proteasas reconocen a su enzima blanco a través de la interacción del sitio reactivo del inhibidor con el sitio activo de la enzima, similar a la del complejo enzima-sustrato.

1.4 Alergia e hipersensibilidad

Históricamente, “inmunidad” significa protección frente a la enfermedad, y más específicamente frente a las enfermedades infecciosas. Las células, órganos y moléculas responsables de la inmunidad conforman el sistema inmune y su respuesta frente a los agentes extraños es la respuesta inmune.

Clásicamente se distinguen dos tipos de respuesta inmune:

1. Respuesta innata, no específica o no adaptativa. Está presente en todos los individuos, siempre se produce de la misma forma y con la misma intensidad. De este tipo son el sistema del complemento, las células NK, los fagocitos y las barreras anatómicas.
2. Respuesta adquirida, adaptativa o específica. Sólo está presente en individuos que han tenido un contacto previo con el agente agresor, es específica para este agente y es más efectiva e intensa ante cada nueva agresión. Está mediada por los linfocitos y sus productos. Ambos sistemas están relacionados. Los mecanismos innatos pueden ser activados por los productos linfocitarios y actuar como efectores y, al mismo tiempo, pueden activar a los linfocitos.

La respuesta inmune adaptativa se produce como consecuencia de la exposición a moléculas extrañas, denominadas antígenos o alérgenos. Estos alérgenos son proteínas que forman parte de las plantas y otros organismos, que cumplen diversas funciones biológicas o, en algunos casos, son compuestos químicos que al unirse a una proteína portadora se convierten en material inmunogénico (Abbas *et al.*, 2007). Estas moléculas inmunogénicas seleccionan específicamente el clon de linfocitos preexistentes capaz de reconocerlo y lo activa. Esta activación desencadena una respuesta de hipersensibilidad, la cual se asocia con anticuerpos sensibilizantes, que con mayor frecuencia son de clase IgE (que se fijan en la superficie de mastocitos y basófilos). Una vez que ocurre la unión antígeno-anticuerpo, se liberan sustancias mediadoras de la inflamación contenidas en los gránulos presentes en estas células y algunas otras de nueva síntesis, apareciendo los síntomas alérgicos. Esta respuesta deja sensibilizadas a las mucosas y a la piel, y predispuestas a reaccionar con el alérgeno nuevamente (Reyes-López y Rodríguez Romero, 2001).

Los síntomas relacionados con alergias incluyen asma, rinitis, urticaria, choque anafiláctico, entre otros (Abbas *et al.*, 2007). Pero, la respuesta individual depende de múltiples factores, tanto inherentes al propio sujeto alérgico, como al propio alérgeno, entre estos factores se encuentran: el estado del sistema inmunitario, la cantidad de alérgeno, el poder antigénico, la frecuencia de exposición, la vía de penetración, las características fisicoquímicas, etc (Brasó y Jorro, 2003).

A pesar de las diferentes respuestas, todas las reacciones de hipersensibilidad presentan una serie de características comunes:

1. Todas son respuestas inmunológicas secundarias, es decir, la reacción consta de dos fases:
 - a) Fase de sensibilización o primer contacto con el antígeno, durante la cual se induce la respuesta inmunológica, pero no aparecen síntomas.
 - b) Fase de reacción que se produce en posteriores contactos con el antígeno. La interacción del antígeno con los productos de la respuesta inmunitaria (linfocitos y anticuerpos) origina los síntomas de la reacción.
2. Las reacciones de hipersensibilidad son las reacciones alérgicas. Algunos autores identifican el término alergia con el de hipersensibilidad tipo I. Brasó y Jorro (2003) consideran que las reacciones de tipo I se definen mejor por los términos reacciones anafilácticas, atópicas o mediadas por IgE.

3. El antígeno contra el cual se desencadena la reacción de hipersensibilidad es el alérgeno, que es un antígeno foráneo inocuo para la mayoría de individuos de la misma especie.
4. Las reacciones alérgicas pueden empeorar con cada nueva exposición, ya que ésta induce la producción de más anticuerpos y linfocitos específicos.

Con base al mecanismo que causa daño al hospedero, la hipersensibilidad se ha clasificado por sus características en virtud de diferentes conceptos. Por sus características clínicas se habla de reacciones inmediatas (ocurren en menos de 1 h tras la exposición), tardías (en pocas horas) y retardadas (en 24-48 h). Por el tipo de respuesta inmunitaria se habla de reacciones mediadas por anticuerpos o mediadas por inmunidad celular. Sin embargo, la clasificación más extendida es la de Gell y Coombs (1963) que distingue cuatro tipos de reacciones según el mecanismo inmunológico: la de tipo I, que es mediada por las inmunoglobulinas de tipo E (IgE's) e induce la activación de los mastocitos y los basófilos, provocada por la reexposición a un antígeno específico (Brasó y Jorro, 2003). En la actualidad, el término alergia se refiere sólo a éste tipo de hipersensibilidad, por lo que, los antígenos involucrados se denominan alérgenos (Abbas *et al.*, 2007). Dichas moléculas son inocuas para la población en general, por lo tanto, la hipersensibilidad de tipo I está ligada a una predisposición genética por parte de los individuos que la padecen (Blumenthal, 2004). Las hipersensibilidades de tipo II y tipo III son mediadas por IgG y activan la cascada del complemento, que es una serie de eventos cataclíticos que forman un complejo capaz de destruir las membranas celulares. Finalmente, la hipersensibilidad de tipo IV que es mediada por células T citotóxicas (Janeway y Travers, 1996).

Según la Organización Mundial de la Salud, las alergias han ido en aumento durante los últimos 50 años, siendo los niños los principales afectados.

1.4.1 Alergia al látex de *Hevea brasiliensis*

Las plantas son una de las principales fuentes de alérgenos, los cuales han sido identificados y caracterizados principalmente como proteínas involucradas en el sistema de defensa (PRP) o almacenamiento, otras son proteínas metabólicas o estructurales de frutas, legumbres, semillas, pólenes y productos derivados de plantas. Estas proteínas presentan la capacidad de inducir en humanos reacciones alérgicas tipo I o inmediata, la cual es mediada por anticuerpos tipo IgE. Estos alérgenos pueden difundirse en el cuerpo

a partir de las vías respiratorias o entrar en el cuerpo a través de la ingesta de una amplia gama de alimentos vegetales o simplemente por exposición causando irritaciones en la piel (Sinha *et al.*, 2014).

El látex del árbol del hule (*H. Brasiliensis*) y los productos manufacturados del mismo, son una fuente muy importante de alérgenos que contienen varias proteínas capaces de unir IgE's (Tabla 1). La nomenclatura consiste de las primeras letras del género al que pertenece el organismo, seguido de la primera letra de la especie y de un número arábigo que indica el orden cronológico de su purificación y depósito en la base de datos de la mencionada entidad. Cada uno de los términos va separado por un espacio. Los isoalérgenos se distinguen por dos números adicionales seguidos después de un punto del número asignado para el alérgeno, mientras que las isoformas de un mismo alérgeno se caracterizan por dos números consecutivos más al asignado por la isoforma (King *et al.*, 1994).

El primer reporte de alergia al látex lo realizó Nuter en 1973, sin embargo, fue hasta los años 80 cuando se observó un incremento importante en el número de personas alérgicas a productos elaborados con látex. Esto ocurrió por el aumento desmesurado en el uso de guantes de hule cuando se atendían personas heridas o cuando se realizaban exámenes de fluidos corporales, ya que se había descubierto que el VIH podía transmitirse por medio de dichos fluidos. Aunado a esto, el uso de condones como medida de prevención al contagio de VIH ha contribuido al aumento en el número de personas que tienen contacto con productos elaborados con látex. En los últimos años las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, ocasionadas por algunas proteínas del látex de *Hevea brasiliensis*, se han incrementado de forma importante hasta llegar a ser un problema de salud pública ocupacional en muchos países, afectando cada vez a un mayor número de pacientes como consecuencia del uso masivo de productos elaborados con base en hule natural para la profilaxis de enfermedades infecciosas, aunado posiblemente al descenso en la calidad final de los productos. De esta forma, las estimaciones más recientes en los EUA muestran que del 10 al 18% de los trabajadores del área de la salud sufren de alergia al látex. En México no se cuenta con estudios estadísticos que nos permitan estimar la cantidad de personas que son afectadas por los alérgenos al látex; sin embargo, se ha observado que la producción de guantes de látex en México aumentó de 74.1 millones de pares en 1994 a 113.3 millones de pares en 1998 (Reyes-López y Rodríguez-Romero, 2001).

Los principales grupos de riesgo de la alergia al látex incluyen los pacientes con historia de múltiples intervenciones quirúrgicas, destacando aquellos con espina bífida (SB),

malformaciones urogenitales congénitas severas, entre otras, cuya prevalencia oscila entre el 10 y 60% (Szépfalusi *et al.*, 1999); los profesionales del área de la salud (Health care workers, HCW) con una incidencia del 3 al 17%; los trabajadores de la industria del hule, así como las personas con antecedentes de atopia y alergia a frutas con un 6 al 11%. En contraste con los principales grupos de riesgo, los estudios epidemiológicos demuestran que la prevalencia en la población general es del 1% destacando la atopia como el factor individual más importante en la sensibilización.

Durante las últimas décadas se han tratado de investigar las bases moleculares e inmunológicas de la alergenidad, así como se ha intentado determinar las estructuras tridimensionales de algunos alérgenos, lo que permite reconocer las características conformacionales de los sitios de unión a las IgE. Sin embargo, estos estudios estructurales son muy escasos, incluyendo a los alérgenos del látex de *H. Brasiliensis*, los cuales comprenden un conjunto de proteínas con una amplia variabilidad, tanto funcional como estructural. Por lo tanto, profundizar en estos estudios permitiría sentar las bases para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y proveer de nuevas herramientas para emplearse en procesos de inmunoterapia (Rodríguez-Romero, 1991; Rodríguez-Romero *et al.*, 2013; Martínez-Caballero *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados sobre los inhibidores de proteasas presentes en *Hevea brasiliensis* se han enfocado principalmente en su caracterización funcional frente al daño mecánico ocasionado por el ataque de patógenos e insectos en el árbol. Recientemente se clasificó una de las isoformas del inhibidor de serín proteasas del látex de *H. brasiliensis* como alérgeno, designado como Hev b 15 por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas. Las proteínas alergénicas presentes en el látex de *H. brasiliensis* se han considerado como un problema de salud pública, debido a que pueden estar en un número importante de productos de uso cotidiano y médico. A la fecha no hay reportes sobre la alergenicidad y la estructura del inhibidor de proteasas denominado HPI, el cual presenta alta identidad con la isoforma Hev b 15, recientemente clasificado como alérgeno y el cual no se ha caracterizado y tampoco se conoce su estructura tridimensional. Este estudio sentará las bases para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico, así como su posible utilidad biotecnológica como inhibidor de proteasas.

3 HIPÓTESIS

El inhibidor de serín proteasas recombinante rHPI presenta características bioquímico-estructurales similares a otros inhibidores de subtilisina y tripsina, reportados en plantas y su plegamiento da lugar a epítomos conformacionales reconocidos por IgE's de pacientes alérgicos al látex.

4 OBJETIVOS

4.1 **Objetivo general**

- Caracterizar estructuralmente y determinar la alergenicidad del inhibidor de serín proteasas recombinante rHPI, expresado en *Escherichia coli*.

4.1.1 **Objetivos particulares**

- Sobre-expresar y purificar al inhibidor de serín proteasas rHPI.
- Determinar la actividad inhibitoria sobre las serín proteasas: subtilisina y tripsina.
- Determinar el tipo de inhibición que ejerce rHPI mediante cinéticas de inhibición usando N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida como sustrato.
- Estimar el contenido de estructura secundaria y determinar su estabilidad térmica utilizando técnicas de dicroísmo circular.
- Evaluar la alergenicidad mediante técnicas de ELISA usando suero de pacientes alérgicos al látex.
- Intentar la cristalización de la proteína.

5 METODOLOGÍA

5.1 Evaluación de la presencia del inhibidor de serín proteasas más abundante en el suero citoplasmático del látex de *H. brasiliensis*

La presencia de la isoforma más abundante del inhibidor-alérgeno Hev b 15 en la fracción del suero citoplasmático del látex de *H. brasiliensis*, se evaluó mediante ensayos colorimétricos de la actividad residual de las serín proteasas tripsinas y subtilisina. La colecta del látex se realizó en el campo experimental “El Palmar” de Tezonapa, Veracruz a partir de árboles de la clona RIMM600. El látex fresco se centrifugó a una velocidad de 35,000 rpm, obteniendo tres fracciones (Figura 1B): a) la superior de aspecto cremoso corresponde a la fase del hule, b) la fase intermedia translúcida o fracción sérica C que contiene el citosol de las células laticíferas y es más rica en proteínas mayoritariamente hidrosolubles, y c) la fracción basal o sérica B que contiene principalmente los lutoides o vacuolas (Berthelot *et al.*, 2014). La fracción sérica C fue sometida a precipitaciones diferenciales con acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$) de 0-70% y de 70-95%. Se probó y calculó el porcentaje de inhibición de la tripsina en las fracciones obtenidas de la precipitación diferencial siguiendo la metodología reportada por Sritanyarat *et al* (2006). La reacción fue realizada en un volumen final de 600 μL con 100 μg de proteína total y se pre-incubó durante 15 minutos a 25°C con 1 μg de proteasa. 2 mg de sustrato Hide powder Remazolbrilliant Blue (Sigma) fueron adicionados y la reacción fue incubada a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Al final de este periodo los tubos de reacción fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 1 minuto. La liberación del grupo azo fue seguida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (Rinderknecht *et al.*, 1968).

Debido a los bajos rendimientos obtenidos de proteína soluble en el fraccionamiento proteico, se sustituyó a la acetona como agente precipitante por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obteniendo dos fracciones de 0-65% y de 65-100%. Para medir la actividad inhibitoria de la subtilisina se utilizó N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida como sustrato. La reacción se realizó en un volumen final de 1 mL con 100 μg de proteína total y se pre-incubó con la enzima durante 15 minutos a 25°C. La reacción se inició con 0.5 mM de sustrato y se incubó a 25°C durante 10 minutos. La liberación del grupo p-nitroanilida se siguió en un espectrofotómetro a una longitud de 412 nm (Huang *et al.*, 1997).

Los controles negativos fueron obtenidos similarmente, pero las proteasas fueron adicionadas inmediatamente antes de medir la absorbancia. Los controles positivos fueron considerados como el 100% de las absorbancias obtenidas de la actividad de las proteasas en función del tiempo. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

A partir de la fracción obtenida de la precipitación diferencial con acetona de 70-95% se intentó aislar al inhibidor más abundante del suero citoplasmático. Esta fracción proteica fue aplicada a una columna de exclusión molecular (Agilent Bio SEC-3) acoplada a un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo la metodología reportada por Sritanyarat *et al* (2006). La columna se equilibró con amortiguador de Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.3 M, pH 7.5 y se eluyó con el mismo amortiguador a un flujo de 1 mL/min. La fracción que contiene al inhibidor fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. La muestra se preparó a una concentración de 0.3 mg/mL, utilizando como matriz ácido sinapínico en 30% acetonitrilo/70% agua/0.1% ácido trifluoroacético (TFA). Los controles utilizados para calibrar el equipo son melitina (2849 Da), citocromo C (13 000 Da) y mioglobina (17 183 Da).

5.2 Clonación y sobreexpresión de rHPI

La región codificante correspondiente al inhibidor de serín proteasas rHPI se sintetizó a partir de la secuencia depositada en la base de datos del Gen Bank (No. Acceso DQ306763.1) y se clonó al vector de sobreexpresión pET28a entre los sitios de clonación NdeI-HindIII (GenScript). La construcción HPI_pET28a_His6 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Rosseta p:cam^r y así expresar la proteína recombinante de interés (estas células presentan características que son compatibles con el sistema de expresión pET28a, Figura 3 y 4). Una vez transformadas las células competentes de *E. coli* Rosseta p:cam^r se realizó la cinética de sobreexpresión en cultivos pequeños con la finalidad de encontrar el tiempo de mayor expresión de proteína soluble de rHPI-His₆. El ensayo se realizó empleando medio LB con kanamicina (Kan) y cloranfenicol (Cam) como antibióticos de selección, se inoculó a una D.O 600_{nm}= 0.05 y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una D.O 600_{nm}= 0.6. Posteriormente se indujo la expresión con IPTG 0.5 mM, y se incubó a 37°C durante 10 horas, tomando alícuotas de 2 mL cada 2 horas. Las células fueron centrifugadas y lisadas por ultrasonificación y la fracción soluble fue analizada por electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

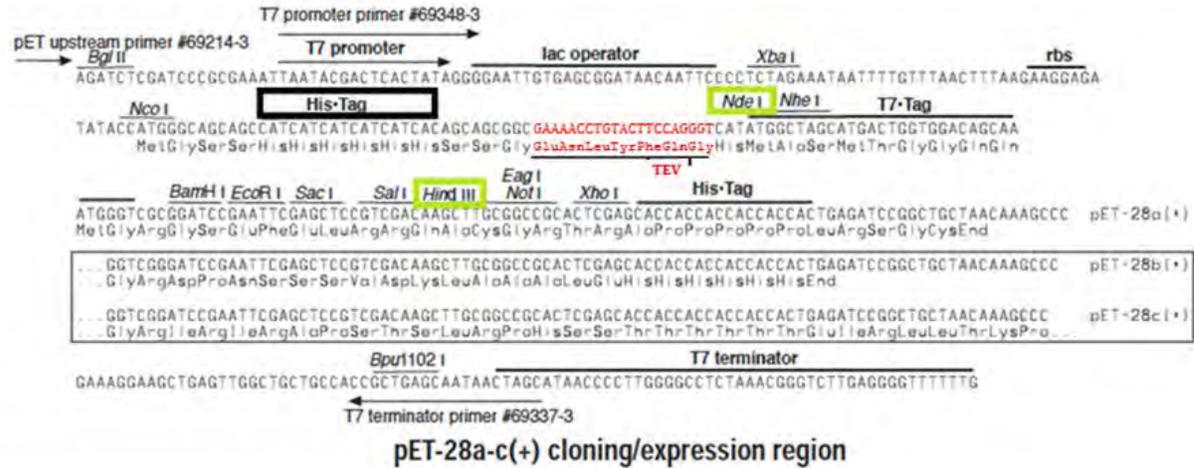


Figura 3. Sitio de clonación del vector de expresión pET28a. La secuencia codificante correspondiente al inhibidor de serín proteasas HPI fue clonada entre los sitios NdeI y HindIII, respectivamente (recuadro verde). Localizados entre el promotor T7 y el terminador T7. Este vector permite la fusión de una etiqueta de His₆ en el extremo amino terminal de rHPI (recuadro en negro), la cual se localiza río arriba del sitio de clonación NdeI. En rojo se marca la región que codifica la secuencia específica de corte de la proteasa TEV, localizada entre la etiqueta His₆ y el sitio de clonación NdeI. Imagen tomada y modificada de Novagen.

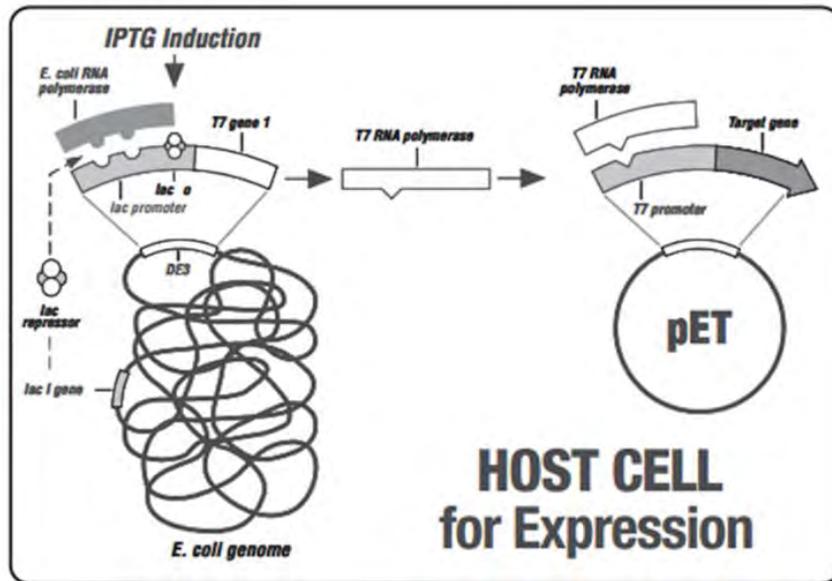


Figura 4. Sistema de expresión pET-28a en células de *E. coli Rosetta p:camf*. Esta cepa contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. Este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV5, que a su vez es inducido por IPTG. Imagen tomada de Novagen.

5.3 Purificación de rHPI

La purificación de rHPI-His₆ se realizó en tres pasos de acuerdo a las características de la proteína. Las células obtenidas en el mejor tiempo de expresión de proteína soluble fueron centrifugadas durante 40 minutos a 14,000 rpm. El botón celular fue resuspendido en amortiguador de lisis (NaH₂PO₄ 20 mM, PMSF 1mM, DTT 2 mM, pH 8) y el producto de la lisis fue centrifugado. El extracto crudo se fraccionó usando una columna de afinidad a Ni²⁺ His Trap (Invitrogen). La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%. Posteriormente se llevó a cabo la proteólisis de rHPI con la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV por sus siglas en inglés Tobacco Etch Virus) para remover la etiqueta de fusión His₆ de su extremo N-terminal. La TEV fue incubada con la proteína recombinante a 20°C durante 24 horas con amortiguador NaH₂PO₄ 20 mM, pH 8. El producto de la digestión nuevamente fue aplicado a la columna de afinidad a Ni²⁺ para su purificación. Cabe resaltar que la TEV también presenta una etiqueta His₆ en su extremo N-terminal que permite removerla durante este paso de purificación.

Finalmente, la proteína rHPI fue sometida a un paso extra de purificación usando una columna de intercambio aniónico Mono Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); la columna se equilibró con amortiguador de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 8 y la elución se realizó con un gradiente de 0-1 M de NaCl en el mismo amortiguador. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% y por espectrometría de masas MALDI-TOF. La concentración de proteína se determinó usando el coeficiente teórico de extinción molar y midiendo la absorbancia a 280 nm.

5.4 Espectrometría de masas

La masa molecular de rHPI se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption/ Ionization-time of flight). La proteína se preparó a una concentración de 1 mg/mL, utilizando como matriz ácido sinapínico en 30% acetonitrilo/ 70% agua/ 0.1% TFA. Los espectros de masas fueron adquiridos con un equipo Microflex Bruker Daltonics. Los controles utilizados para calibrar el equipo son proteínas estándar que poseen una masa por arriba y una por debajo de la esperada (melitina (2849 Da),

citocromo C (13000 Da) y mioglobina (17183 Da)). El valor teórico de masa molecular fue calculado en el servidor ExPASy ProtParam tool.

5.5 Caracterización

5.5.1 Espectro de dicroísmo circular

Este método de absorción electrónica provee información acerca de la estructura secundaria de las proteínas frente a los distintos cambios en el ambiente, cuando el experimento se lleva a cabo en un intervalo de 260 a 185 nm (ultravioleta lejano). Los espectros de dicroísmo en esta región se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí (Berova *et al.*, 2000). En este trabajo, el análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo en un espectropolarímetro J-720 (Jasco Inc., USA) obteniendo los espectros desde 190 hasta 260 nm a 20°C utilizando una velocidad de barrido de 20 nm/min en una celda de cuarzo de 0.1 nm de longitud de paso de luz. La proteína se dializó contra amortiguador NaH₂PO₄ 20 mM, pH 8 y se empleó una concentración de 0.22 mg/mL. Cada muestra se analizó por triplicado. A los valores obtenidos en miligrados se les restó la señal del amortiguador correspondiente (blanco). Los espectros fueron expresados como elipticidad molar ($[\theta]$) en grado cm² dmol⁻¹. El procesamiento de los datos se realizó con el software Dicroweb que utiliza un método de deconvolución de datos basado en redes neurales que aplican el algoritmo de propagación inversa (Dalmas *et al.*, 1994).

5.5.2 Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia

Este método se basa en el análisis y comparación de la estabilidad térmica de una proteína que se encuentra en distintos ambientes (pH, sales, metales, amortiguadores, etc.) por medio de la determinación del valor de T_m o temperatura de fusión (°C). Se utiliza una sonda solvatocrómica denominada SYPRO Orange la cual se une a zonas hidrofóbicas de la proteína que se van exponiendo debido a la desnaturalización térmica. De esta forma, se emite una señal de fluorescencia que se incrementa a medida que la proteína se despliega o desnaturaliza (Boivin *et al.*, 2013).

En este trabajo se evaluó el efecto del pH (intervalo de pH 2-11) en la estabilidad de rHPI utilizando el kit Wizard pH buffer con 45 condiciones (Rigaku Reagent Inc, USA) que consiste en varias sales amortiguadoras a diversos valores de pH. Inicialmente se mezcló la solución de proteína con SYPRO Orange en una relación 1000:1 (v/v) y se incubó con agitación suave durante 30 min. Cada ensayo se realizó colocando 10 μ L de la solución de proteína + 10 μ L de solución de cada condición de pH en una microplaca de 96 pozos sellada con un film ópticamente inerte. La placa fue centrifugada a 500 x g durante 2 minutos para eliminar las burbujas. La señal de fluorescencia emitida por la sonda (λ excitación=490 nm y λ emisión= 575 nm) fue registrada en un instrumento de RT-PCR (Life Technologies, USA) en el que se programa un barrido de temperatura de 25-95°C de forma continua. Después de obtener el fluorograma de la señal de fluorescencia cruda en función de la temperatura para cada condición, se determinó el intervalo de temperatura en el que ocurre la transición del estado nativo al desnaturalizado, el cual se caracteriza por presentar una forma sigmoideal, con un punto de inflexión. La señal de fluorescencia se determinó empleando el programa StepOne v2.3 (Life Technologies, USA) y posteriormente los datos fueron normalizados y graficados, obteniendo el punto de inflexión que corresponde al valor de Tm (°C).

5.5.3 Cinética de inhibición

La actividad de rHPI sobre proteasas serínicas fue ensayada midiendo la inhibición de la subtilisina A al actuar sobre el sustrato N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAAPF pNA) a 25°C. Para este fin se midió la liberación del grupo p-nitroanilida del sustrato en función del tiempo a 412 nm en un lector de placa (Pekkarinen *et al.*, 2002). Se emplearon concentraciones fijas de rHPI (0.007 – 0.1 μ M) y se pre-incubaron con una concentración fija de la enzima (7 nM) en un volumen final de 250 μ L en amortiguador de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 8, durante 20 minutos a 25°C. Para iniciar la reacción de proteólisis, se adicionó solución de sustrato variando las concentraciones (0.1-0.5 mM) y la mezcla de reacción se incubó durante 25 min a 25°C. La liberación del grupo nitroanilida se midió a 412 nm cada 50 segundos. Los datos obtenidos en presencia de concentraciones fijas diferentes del inhibidor rHPI se graficaron empleando el diagrama de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos 1/Vo vs 1/[S]) y se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max}. Para la determinación de la K_i se utilizó el gráfico secundario de Dixon (1/v vs [I]). Los controles negativos fueron

obtenidos similarmente pero sin la adición de la proteasa, evaluando la proteólisis espontánea. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.5.4 Reconocimiento de rHPI por anticuerpos tipo IgE

El reconocimiento del inhibidor de serín proteasas rHPI por anticuerpos tipo IgE de suero de individuos alérgicos a hule y a alimentos se realizó mediante ensayos de ELISA. Los pozos de las placas se sensibilizaron con 50 μ L de rHPI a una concentración de 10 μ g/mL durante 24 horas a 4°C. Las placas se lavaron con una solución de Tween-20 0.05% (v/v) en amortiguador PBS. Posteriormente se incubó con una solución bloqueadora conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) 1% en PBS por 2.5 horas a 37°C. Todos los sueros de pacientes se prepararon en una dilución 1:5 en PBS, se agregaron 50 μ L de la dilución a cada pozo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se utilizó un anticuerpo secundario producido en ratón, que reconoce específicamente a la cadena ϵ de las IgE's de humano, el cual se encuentra unido a la peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen, CA, EUA). Éste se preparó en una dilución 1:500 en amortiguador PBS conteniendo Tween-20 0.05% y BSA 1%, adicionando a cada pozo 50 μ L de la dilución e incubando la placa por 2 hrs a 37°C. Para producir la reacción colorimétrica se adicionaron 50 μ L de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) a cada pozo y tras 20 min a temperatura ambiente se leyó la placa a 405 nm en un lector de placas (BioTek, VT, EUA). Los valores de absorbancia (Abs_{405}) de todas las muestras representan el promedio de tres determinaciones. El criterio para determinar si una reacción es positiva fue cuando la Abs_{405} era mayor a la del suero control más de tres veces la desviación estándar. El control negativo fue obtenido similarmente, pero sustituyendo la adición del suero con amortiguador PBS. La donación de los sueros de los pacientes alérgicos al látex fue llevada a cabo siguiendo los protocolos aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

5.5.5 Cristalización de rHPI

Los ensayos para encontrar las condiciones de cristalización de rHPI se realizaron empleando los kits comerciales: Crystal Screen I y II, y additive screen de Hampton Research (98 condiciones diferentes). Los ensayos iniciales se realizaron por el método de difusión en fase de vapor en la modalidad de gota colgante, a 18°C en placas VDX de 24 pozos, utilizando 2 μL de proteína a una concentración de 15 mg/mL y 2 μL de solución precipitante. Las gotas fueron equilibradas con 400 μL de solución madre en el pocillo.

6 RESULTADOS

6.1 Evaluación de la presencia del inhibidor de serín proteasas más abundante en el suero citoplasmático del látex de *H. brasiliensis*

La presencia del inhibidor de serín proteasas más abundante en el suero C del látex de *H. brasiliensis* se confirmó mediante ensayos de inhibición colorimétricos. Para realizar dichos ensayos se emplearon las enzimas tripsina y subtilisina, y como sustratos Hide Powder Azure y N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida, respectivamente. La absorbancia obtenida de la actividad proteolítica de dichas enzimas fue considerada como el 100% de actividad y el porcentaje de inhibición se determinó midiendo las absorbancias residuales, respecto al control. La actividad inhibitoria sobre la subtilisina A fue del 50% y se encontró en el precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 65% de saturación; mientras que la actividad de tripsina fue inhibida en un 30% en la fracción del 70-95% de saturación con acetona. Estos resultados concuerdan con el único reporte sobre la caracterización bioquímica del inhibidor de serín proteasas HPI (Sritanyarat *et al.*, 2006), isoforma del inhibidor-alérgeno Hev b 15. Estos autores determinaron que HPI inhibía fuertemente a la subtilisina A, mientras que la tripsina era inhibida débilmente. Con base en estos resultados se eligió a la subtilisina A para realizar los posteriores ensayos de inhibición.

La fracción de 70-95% obtenida con acetona se aplicó a una columna de exclusión molecular y el perfil de elución se muestra en la Figura 5, donde se observan 3 fracciones que absorben a 280 nm, con diferentes tiempos de elución. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Cabe resaltar que de las 3 fracciones analizadas únicamente se obtuvo el espectro de la fracción 2. Esto debido a las bajas concentraciones de proteína obtenida en las diferentes fracciones, ya que, mientras más grande es la proteína se requiere mayor concentración para poder obtener su espectro.

En la Figura 6 se muestra el espectro de masas de la fracción 2, observando que la columna de exclusión molecular no separó la mezcla de proteínas, ya que se observan masas moleculares similares, razón por la cual estas proteínas eluyeron en tiempos semejantes. A pesar de esto, se logra apreciar un pico con una masa de 7.76 kDa, la cual podría corresponder con la isoforma de interés (7.75 kDa) de las 3 reportadas por Sritanyarat *et al* (2006). Estos autores identificaron 3 isoformas que presentan la misma secuencia de aminoácidos, sin embargo exhiben diferentes masas moleculares (14.8 kDa, 7.75 kDa y 7.56 kDa), lo que sugería la presencia de modificaciones post-traduccionales ocurridas

durante la colecta del látex. La proteína con masa de 14.8 kDa corresponde a la estructura dimérica, considerando que el monómero presenta una masa de 7.44 kDa. En las otras dos isoformas se identificaron 2 aductos. En la proteína de 7.75 kDa el aducto corresponde a un glutatión, mientras que en la 7.56 kDa el aducto (119 Da) no fue identificado.

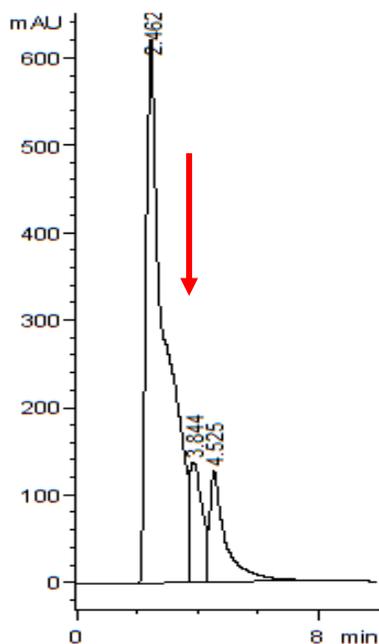


Figura 5. Perfil de elución de HPI en una columna de exclusión molecular (Agilent Bio SEC-3). La columna se equilibró con amortiguador NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0.3 M, pH 8. La cromatografía se realizó a un flujo de 1 mL/min. La fracción 2 (flecha roja) fue analizada por espectrometría de masas.

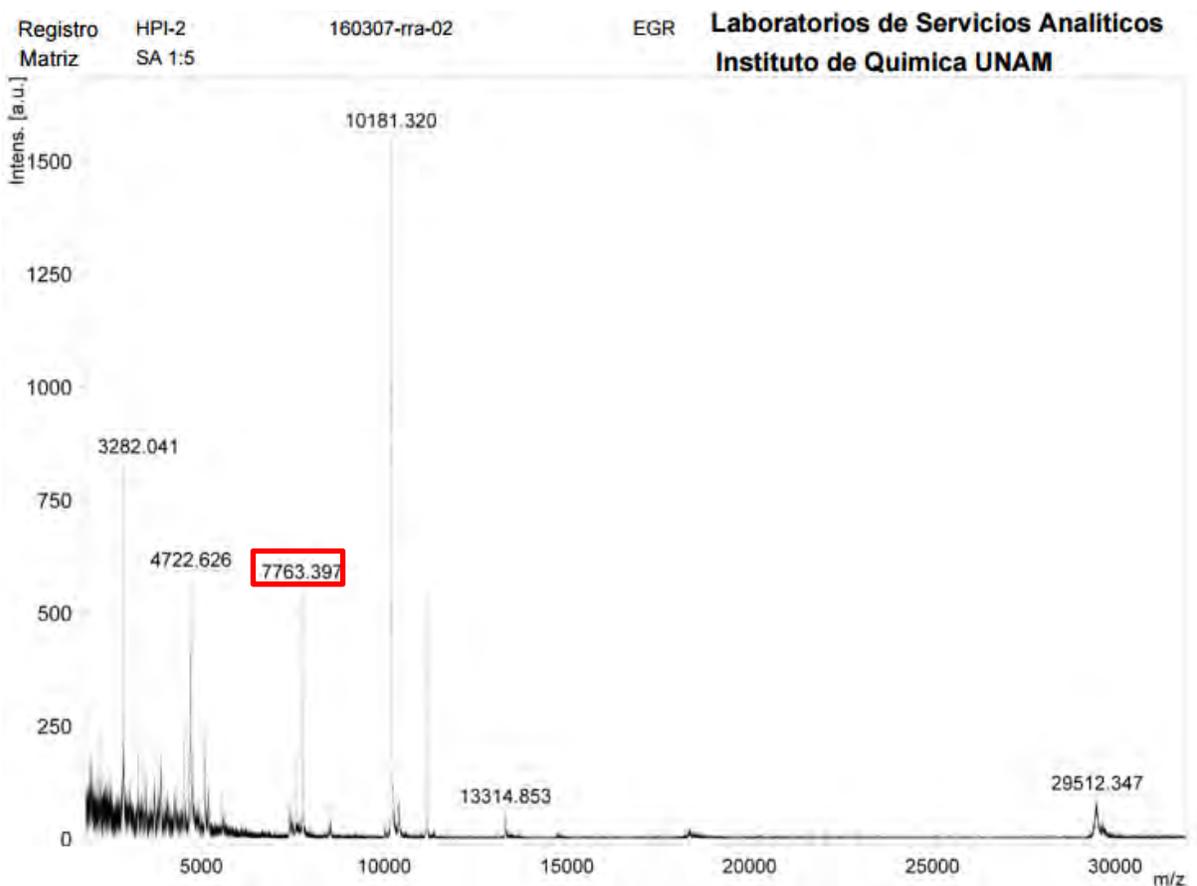


Figura 6. Espectro de masas MALDI-TOF de HPI. Espectro obtenido a partir de la fracción 2 marcada con una flecha en la Figura 5. Se observa un pico de 7.76 KDa, el cual podría corresponder a una de las isoformas del inhibidor HPI reportadas por Sritanyarat *et al* (2006).

A la fecha no hay reportes sobre la alergenicidad y la estructura del inhibidor de serín proteasas denominado HPI (No de acceso [Q6XNP7.2](#)), el cual presenta 77% de identidad con la isoforma Hev b 15 recientemente clasificada como inhibidor-alérgeno (No de acceso [CCW27997](#)), el cual no se ha caracterizado ni determinado su estructura tridimensional. Debido a la alta identidad y a que ambos inhibidores difieren en 16 aminoácidos, de los cuales 7 son cambios conservados (Figura 7), nos permite sugerir que ambas proteínas comparten características bioquímico-estructurales, así como su alergenicidad. Por lo cual se decidió trabajar con la isoforma HPI pero de forma recombinante, debido a los bajos rendimientos de proteína soluble obtenidos de la purificación a partir del suero C del látex de *H. brasiliensis*.

```

Hevb15 1MASQCPVKDAWPELIGTNGDIAAGIIEETENANVKAIVLKKGSPMTMEYNLCRVLVVFVDENRVVTQAPAIG 70
HPI 1MASQCPVKNSWPELVGTNGDIAAGIIOETENANVKAIVVKEGLPIITQDLNFRVRVVFVDENRVVTQVPAIG 70

```

Figura 7. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los inhibidores de proteasas Hev b 15 y HPI empleando el servidor Blast NCBI. En verde se resaltan los aminoácidos conservados y en amarillo los aminoácidos no conservados.

Para clonar y caracterizar al inhibidor de serín proteasas rHPI, se amplificó su región codificante correspondiente a partir de cDNA. La secuencia amplificada se mandó a secuenciar para corroborar la fidelidad y se realizó un alineamiento múltiple empleando el servidor NCBI blast, donde se observó 98% de identidad con la secuencia nucleotídica reportada para la isoforma HPI (No de acceso [DQ306763.1](#)). Esta secuencia ya había sido identificada en el transcriptoma de *H. brasiliensis* por Han *et al*, 2000 y Ko *et al*, 2003. Sin embargo, en la región amplificada se detectó la inserción de una secuencia de 105 bases dentro de la región codificante. Esto posiblemente fue consecuencia del tamaño pequeño los oligonucleótidos empleados, ya que entre más pequeños sean (menos de 20 nucleótidos) se incrementa la probabilidad de que algún gen distinto al de interés tenga una secuencia idéntica y con esto la amplificación de fragmentos no deseados.

Debido a interferencia de la región codificante por la inserción de las 105 bases nucleotídicas, se decidió sintetizar la secuencia codificante correspondiente a esta isoforma.

6.2 Clonación y sobre-expresión de rHPI

Con la finalidad de caracterizar al inhibidor rHPI, la secuencia codificante sintetizada se clonó y sobre-expresó en el vector de expresión pET28a. Para evaluar el rendimiento y solubilidad de rHPI, se realizó la cinética de expresión. La fracción soluble de las células *E. coli* Rosseta p lisadas fue analizada por electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% (Figura 8) donde se observa que la expresión de la proteína recombinante resultó eficiente desde las dos primeras horas de inducción. Dado que no existían diferencias significativas en el nivel de expresión de proteína soluble respecto al tiempo, se decidió inducir la proteína recombinante durante 2 horas, evitando el incremento en la expresión de proteínas

endógenas. El peso molecular de rHPI_His₆ concuerda con el valor teórico calculado (9.58 kDa).

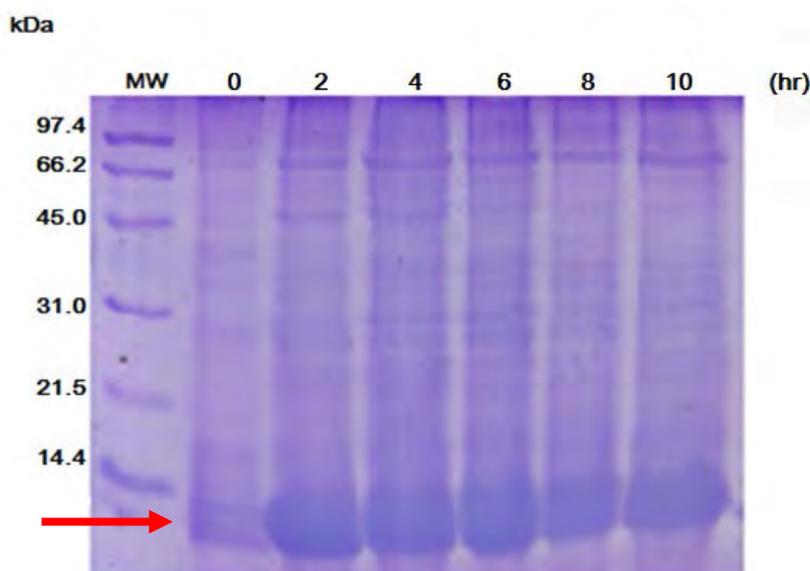


Figura 8. Expresión de rHPI_His₆. Gel SDS-PAGE al 15%. Carril MW. Marcador de masa molecular, Carril 0. Fracción proteica soluble antes de la inducción, Carril 2. Fracción proteica soluble obtenida después de 2 horas de inducción, Carril 4. 4 horas de inducción, Carril 6. 6 horas de inducción, Carril 8. 8 horas de inducción, Carril 10. 10 horas de inducción. La masa obtenida corresponde al valor teórico esperado de 9.58 kDa (indicado por la flecha roja).

6.3 Purificación de rHPI

Las células obtenidas con el mejor tiempo de sobre-expresión de proteína soluble, fueron lisadas y rHPI se separó usando una columna de afinidad a Ni²⁺. El perfil de elución se muestra en la Figura 9, donde se observa un pico mayoritario con absorción a 280 nm entre las fracciones 4-12. Estas fracciones fueron analizadas en una electroforesis SDS-PAGE al 15% (Figura 10), observando que los carriles 1-9 presentan un banda mayoritaria localizada debajo del marcador de masa molecular de 14.4 kDa, correspondiendo a la masa teórica esperada (9.58 kDa).

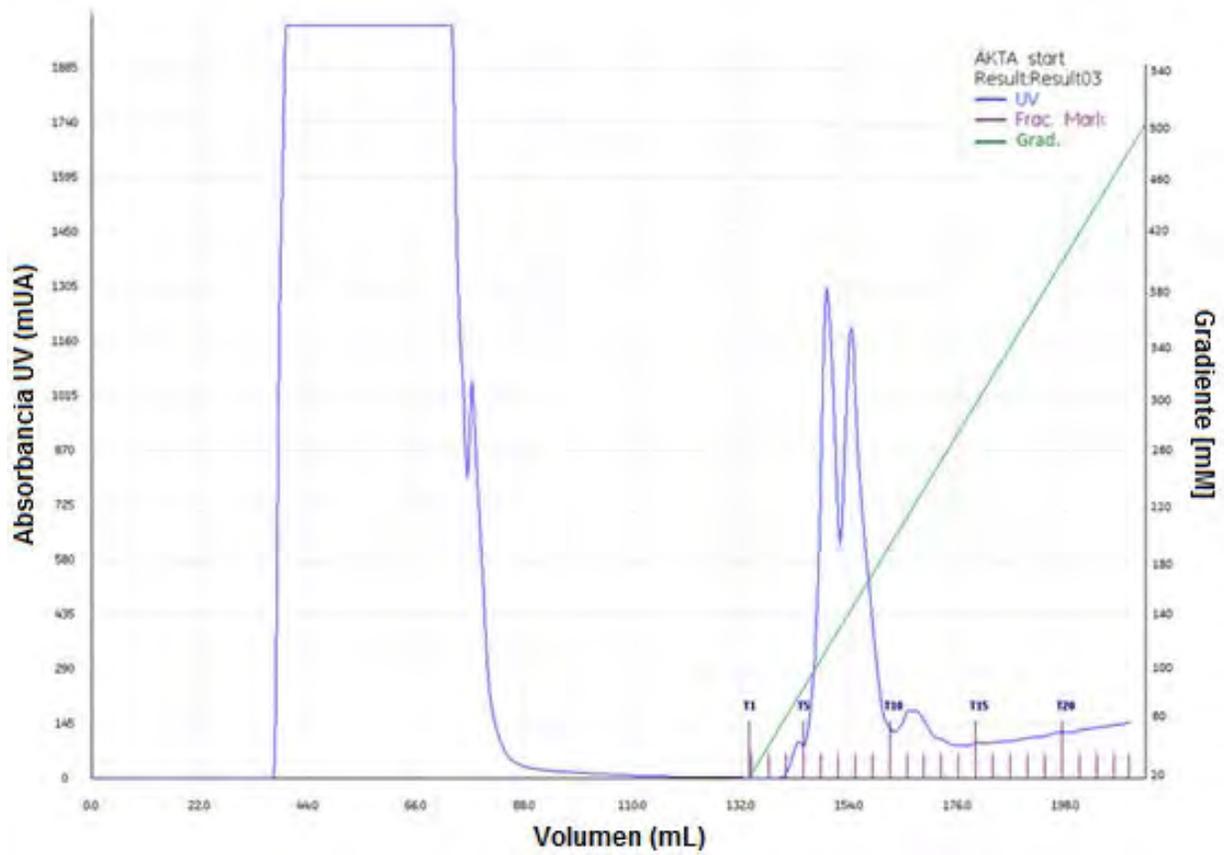


Figura 9. Purificación de rHPI_His₆ por cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Perfil de elución de rHPI_His₆ (línea azul) usando un gradiente de 20-500 mM de imidazol (línea verde). Amortiguador NaH₂PO₄ 20 mM, imidazol 20 mM, pH 8. Flujo 1 mL/min. Las barras sobre el perfil de elución indican el número de fracción eluida (T1-T25).

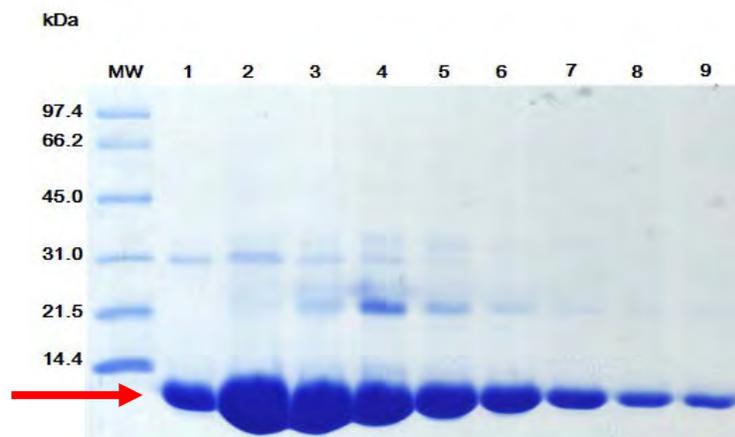


Figura 10. Fracciones eluidas de rHPI_His₆ de la columna de afinidad a Ni²⁺ con un gradiente de Imidazol de 20-500 mM. Carril MW. Marcador de masa molecular, Carril 1. Fracción 4, Carril 2. Fracción 5, Carril 3. Fracción 6, Carril 4. Fracción 7, Carril 5. Fracción 8, Carril 6. Fracción 9, Carril 7. Fracción 10, Carril 8. Fracción 11, Carril 9. Fracción 12.

Estas fracciones se juntaron para posteriormente escindir la etiqueta de His₆. El producto de la digestión de rHPI con la proteasa TEV fue aplicado a una columna de afinidad a Ni²⁺ para su purificación y posteriormente analizado por electroforesis SDS-PAGE al 15%, como se muestra en la Figura 11, donde se observa que se logró remover una gran cantidad de proteínas; sin embargo, aún se observan algunas bandas contaminantes.

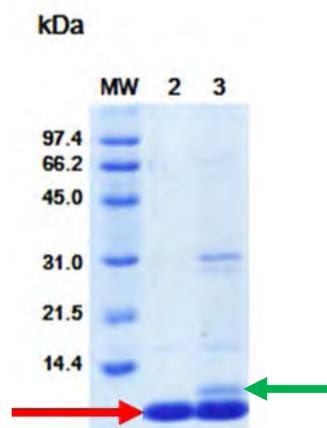


Figura 11. Producto del corte de la etiqueta de His₆ de rHPI con TEV. Carril MW. Marcador de masa molecular, Carril 2. rHPI escindida, Carril 3. Muestra obtenida de la columna Ni²⁺ después de la incubación con TEV. Masa teórica esperada antes del corte 9.58 kDa (flecha verde), masa teórica después del corte 7.74 kDa (flecha roja).

Como último paso de purificación se utilizó la cromatografía de intercambio aniónico. El perfil de elución se muestra en la Figura 12, observándose tres picos de absorción a 280 nm entre las fracciones 7-12. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 15% (Figura 13), observando que rHPI se encuentra en la fracción que no se une a la resina, mientras que los contaminantes fueron totalmente removidos con el gradiente de 0-1M de NaCl. Este paso de purificación fue de utilidad para remover una gran cantidad de proteínas contaminantes.

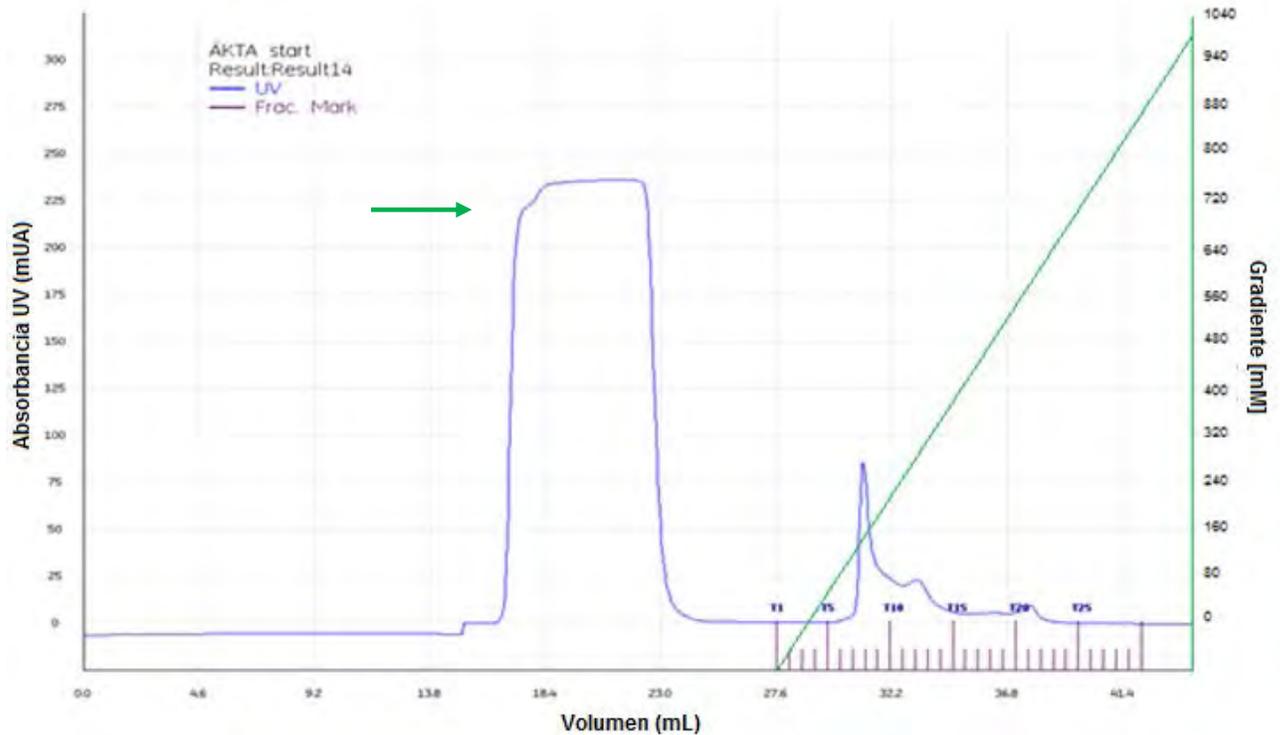


Figura 12. Purificación de rHPI por cromatografía de Intercambio aniónico. Perfil de elución de rHPI (línea azul) con un gradiente de 0-1M de NaCl (línea verde). Amortiguador NaH_2PO_4 20 mM, pH 8. Flujo 1 mL/min. La flecha verde indica la fracción que no interacciona con la resina de la columna MonoQ en donde se encuentra rHPI. Las barras sobre el perfil de elución indican el número de fracción eluida (T1-T30).

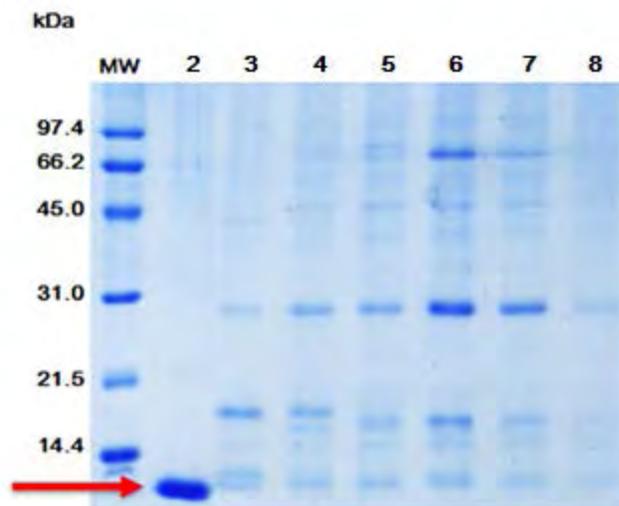


Figura 13. Purificación de rHPI por cromatografía de Intercambio Aniónico. Gel SDS-PAGE que muestra las fracciones eluidas de la columna MonoQ con un gradiente de 0-1 M de NaCl. Carriles: 1) Marcador, 2) Proteína que no interaccionó con la resina MonoQ, 3) Fracción 7, 4) Fracción 8, 5) Fracción 9, 6) Fracción 10, 7) Fracción 11, 8) Fracción 12.

6.4 Espectrometría de masas

El inhibidor rHPI que no se unió a la columna de intercambio iónico fue analizado por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar su masa molecular. Como se observa en la Figura 14, el pico mayoritario muestra una masa de 7.73 kDa, valor que corresponde a la masa teórica esperada (7.74 kDa). Además, se observa un segundo pico de 15.47 kDa el cual corresponde al dímero de rHPI.

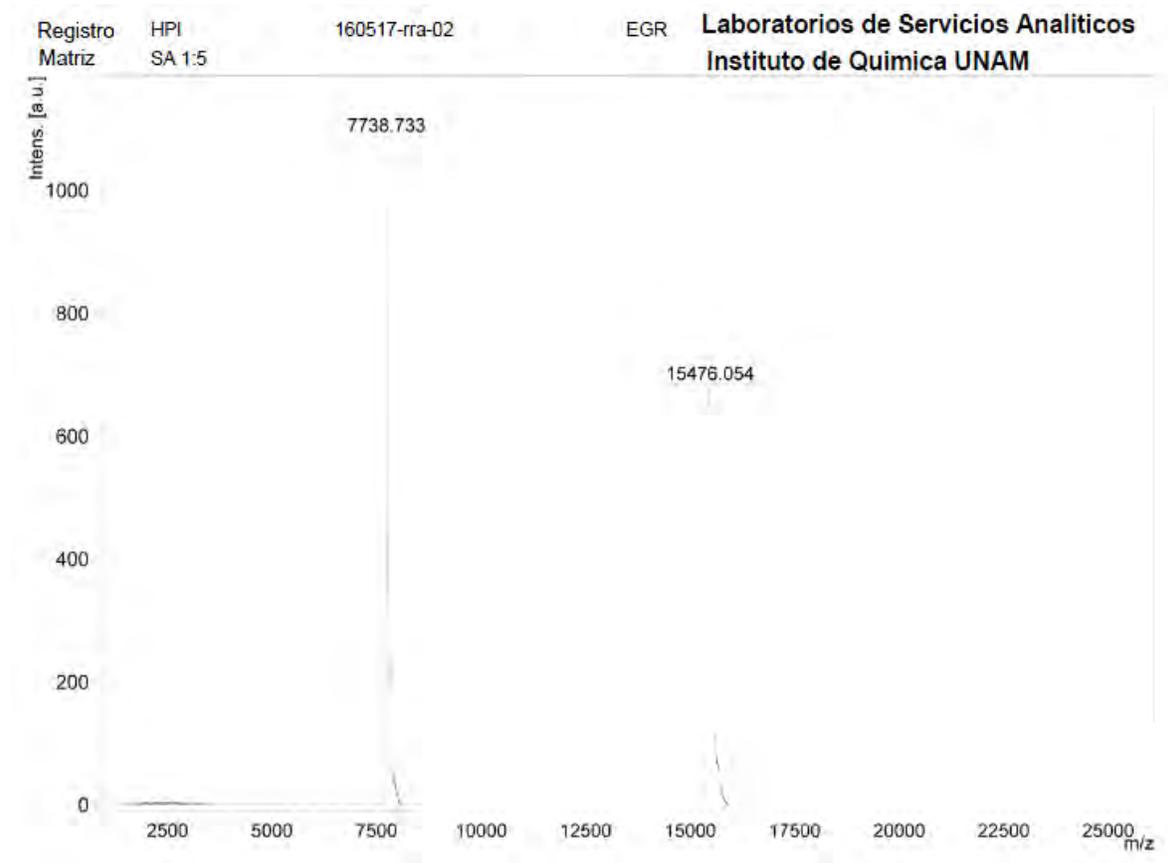


Figura 14. Espectro de masas MALDI-TOF de rHPI. Se observa un pico mayoritario con una masa de 7.73 kDa, valor que coincide con la masa teórica esperada de 7.74 kDa.

6.5 Caracterización

6.5.1 Espectro de Dicroísmo Circular

Para determinar el contenido de estructura secundaria y la estabilidad térmica del inhibidor rHPI, se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en la región del UV-lejano antes y después de evaluar el efecto de la temperatura, con el objetivo de conocer los posibles cambios conformacionales. Para determinar el contenido de estructura secundaria, los espectros en el UV-lejano fueron analizados con el programa de deconvolución de Hennessey-Johnson. En la Figura 15A se muestra el espectro de rHPI, que de acuerdo con el algoritmo antes mencionado, presenta un plegamiento $\alpha+\beta$ plegada (— en verde).

Por otro lado, en la figura 15B se observa el efecto que tiene la temperatura en la conformación de rHPI. En rojo se muestra el efecto del incremento en la temperatura de 20-90°C. Los gráficos fueron obtenidos a una longitud de onda de 206 nm, ya que a dicha longitud de onda se obtuvo la máxima señal en el espectro, con una velocidad de 1 nm/min, observando que el inhibidor no se desnatura en este intervalo de temperatura, al no detectar ninguna zona de transición. En azul se muestra el efecto de enfriamiento de 90 a 20°C, observando que el inhibidor no presenta cambios conformacionales al sobreponerse con la señal obtenida de 20-90°C, indicando que el proceso es reversible. Finalmente, en la figura 15A (— en azul) se presenta el espectro de rHPI (UV lejano) después del barrido de temperatura, observando un ligero corrimiento de señales respecto al espectro obtenido antes de ser sometido al barrido de temperatura; sin embargo, de acuerdo con el análisis obtenido con el algoritmo anteriormente mencionado, la proteína sigue presentando un plegamiento $\alpha+\beta$. Con estos resultados se determina que rHPI es extremadamente resistente a la desnaturación, en las condiciones de ensayo.

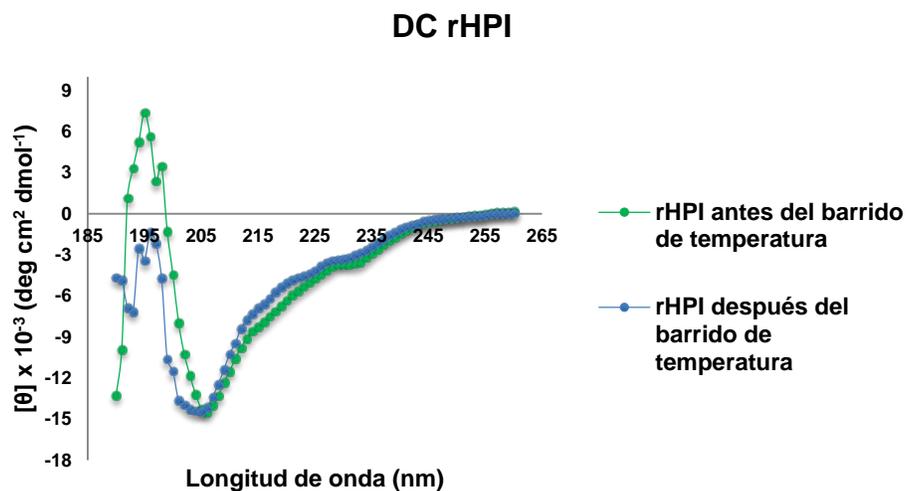
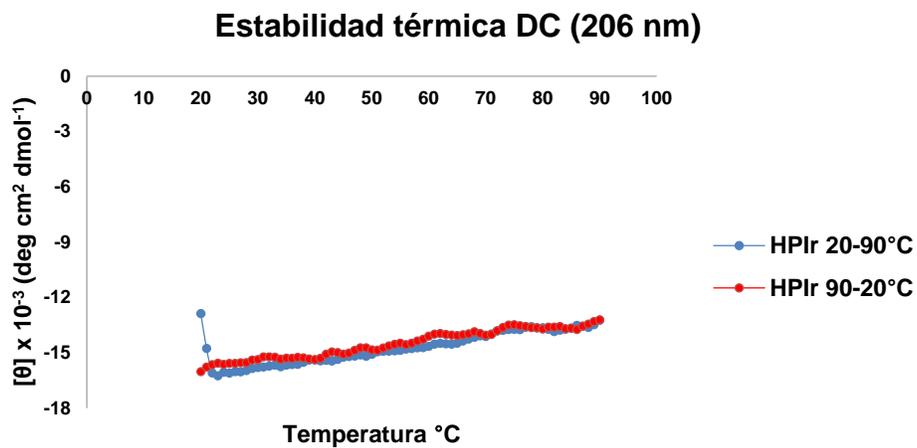
A**B**

Figura 15. Espectro de Dicroísmo circular de rHPI. A) Espectro de DC de rHPI de 190-260 nm antes y después de evaluar el efecto de la temperatura. B) Estabilidad térmica por DC empleando un barrido de temperatura de 20-90°C y de 90-20°C a una longitud de onda de 206 nm. Se empleó una concentración de 0.22 mg/mL en amortiguador NaH_2PO_4 20 mM, pH 8.

6.5.2 Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia

Los resultados de estabilidad térmica obtenidos por DC fueron confirmados mediante ensayos de termofluorescencia diferencial de barrido, analizando el efecto de la variación de pH (2-11) bajo un gradiente de temperatura continua de 25 a 95°C. Las señales de fluorescencia obtenidas fueron normalizadas y graficadas, obteniendo el punto de inflexión que corresponde al valor de T_m (°C). Como se observa en la Figura 16, las soluciones amortiguadoras de pH ácido (intervalo de 4.2 a 5.6) evitaron la agregación de rHPI, lo cual se traduce en trazas bien definidas, alcanzando una T_m de 59°C a un pH de 5.6. A valores de pH mayores de 5.6 no se obtiene señal de fluorescencia, lo que indica que la proteína es muy estable en esas condiciones. Esto se concluye debido a que la sonda solvatocrómica denominada SYPRO Orange, empleada en el ensayo, se une a zonas hidrofóbicas expuestas de la proteína debido a la desnaturalización térmica, emitiendo una señal fluorescente que se incrementa con la desnaturalización. Por lo que, al no obtener una señal de fluorescencia por arriba de pH 5.6 se sugiere que rHPI no se desnaturaliza en éstas condiciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por DC, observando que la estabilidad de rHPI resultó ser dependiente del pH, siendo extremadamente estable en el intervalo de pH 5.8 a 11.

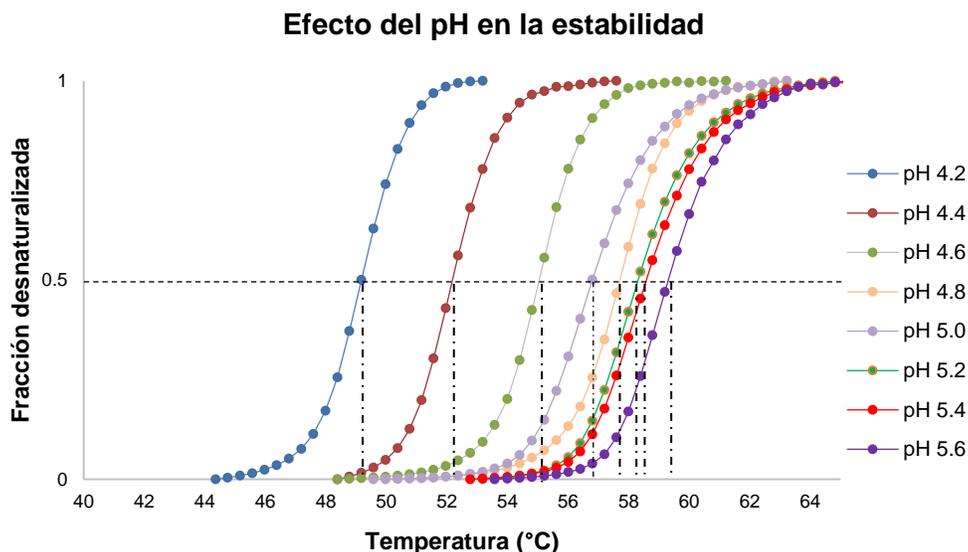


Figura 16. Efecto del pH en la estabilidad térmica de rHPI por fluorimetría diferencial de barrido.

6.5.3 Cinética de inhibición de la subtilisina A Carlsberg

Se determinaron los parámetros cinéticos K_m , V_{max} de la subtilisina A Carlsberg, así como el valor de K_i cuando se usó el inhibidor rHPI. Los datos obtenidos en presencia de concentraciones fijas diferentes del inhibidor rHPI se graficaron empleando el diagrama de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos $1/V_o$ vs $1/[S]$) y se determinaron los parámetros cinéticos. Como se puede observar en la Figura 17, la pendiente se incrementa a medida que aumenta la concentración del inhibidor. Las rectas se mueven en contra de las manecillas del reloj, a partir del punto de intersección ($1/V_{max}$ en el eje $1/V_o$), con respecto a la recta control. El trazado límite será una línea vertical en el eje $1/V_o$, debido a que la velocidad inicial puede ser llevada a cero por la presencia de una concentración saturante de inhibidor. A medida que $[I]$ aumenta, los interceptos en el eje $1/[s]$ se mueve más cerca del origen, es decir continuamente aumenta. En la Tabla 4 se muestran los valores de V_{maxapp} y K_{mapp} . Estos datos sugieren que el inhibidor rHPI podría tratarse de un inhibidor de tipo No competitivo, caracterizado por afectar solo el valor de V_{max} , sin provocar alteración en la K_m . El inhibidor No competitivo es aquél que puede unirse a la molécula de enzima y producir un complejo inactivo, independientemente de que la molécula de sustrato se haya unido o no a la enzima. El inhibidor, por lo tanto, debe unirse a un sitio diferente del sitio de unión del sustrato. Es posible que el inhibidor distorsione lo suficiente a la enzima como para prevenir la conformación adecuada del centro catalítico, de modo que ESI es un complejo no productivo.

Es decir, a cualquier concentración de inhibidor, una concentración infinitamente grande de sustrato no puede desplazar toda la enzima a la forma productiva ES. A cualquier $[I]$, una parte de la enzima se quedará como complejo no productivo, ESI. Por lo tanto, podemos predecir que la V_{max} en presencia del inhibidor No competitivo, será menor que el valor de V_{max} observada en ausencia del inhibidor. El valor de K_m no se alterará por la presencia de un inhibidor No competitivo, debido que a cualquier concentración de inhibidor las formas enzimáticas que pueden combinarse con S (E y EI) presentan igual afinidad por S.

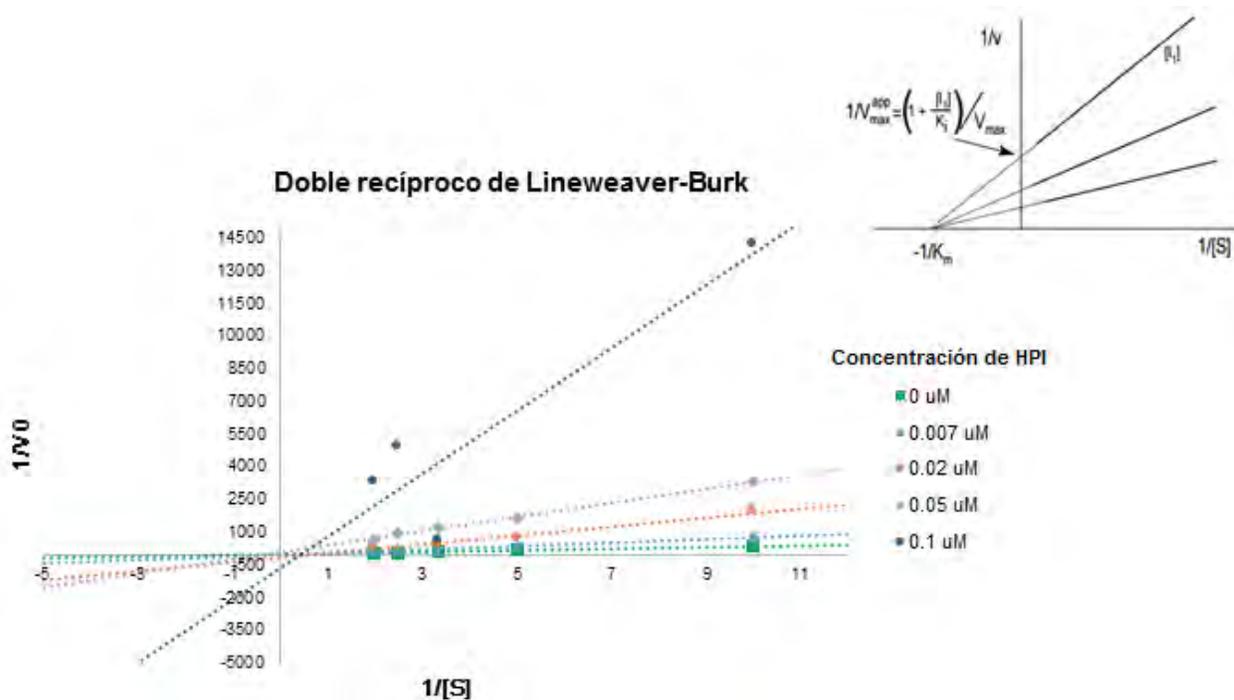


Figura 17. Gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para un inhibidor de tipo No competitivo. Datos obtenidos a una concentración de enzima (7 nM), variando las concentraciones del sustrato (0.1-0.5 mM), en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (rHPI 0-0.1 μmol/mL), amortiguador de NaH₂PO₄, pH 8, los datos obtenidos se graficaron empleando el diagrama de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos 1/Vo vs 1/[S]).

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos de los ensayos de inhibición de la Subtilisina Carlsberg con rHPI, mediante el método de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

Muestra	K_{mapp} $10^{-3} M$	V_{maxapp} $nmol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$
Subtilisina A Carlsberg (Huang <i>et al.</i> , 1997)	0.16	xxx
Subtilisina A Carlsberg	1.5	41.7
0.007 μM HPI	3.1	39.7
0.02 μM HPI	1.9	9.4
0.05 μM HPI	2.7	8.5
0.1 μM HPI	0.9	0.69
(Datos obtenidos en este trabajo)		

Substrato: N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (Suc-AAPF-pNA)

Para determinar el valor de K_i , se empleó el gráfico secundario de Dixon, cuyos datos provienen de los datos primarios de V_o vs $[S]$ a distintas $[I]$. Se graficó $1/V_o$ vs la concentración del inhibidor $[I]$ a diferentes concentraciones de $[S]$. La inhibición No competitiva presenta cruzamiento de rectas sobre el eje x determinando un valor de K_i de $1.09 \cdot 10^{-5}$ M, tal como se observa en la Figura 18.

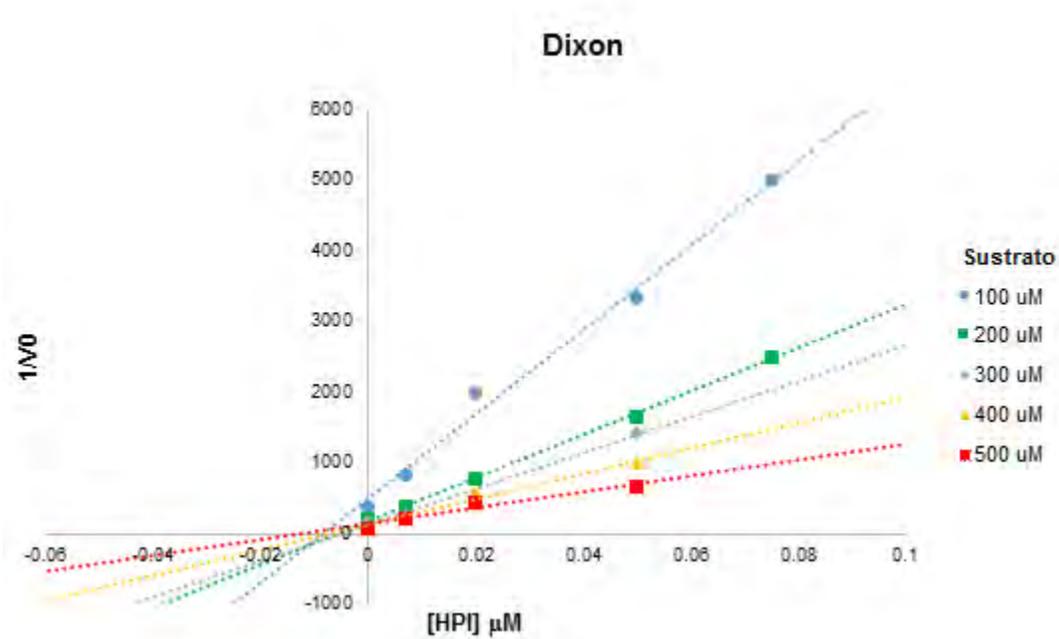


Figura 18. Representación gráfica secundaria para un inhibidor de tipo No competitivo.

6.5.4 Reconocimiento de rHPI por anticuerpos tipo IgE

Para comparar las diferencias en el reconocimiento de IgE por rHPI se utilizó la técnica de ELISA. Para este experimento se utilizó un grupo de pacientes alérgicos a látex y a maíz. Si bien es cierto que las plantas son una de las principales fuentes de alérgenos, los cuales han sido identificados y caracterizados principalmente como proteínas involucradas en el sistema de defensa (PRP), almacenamiento, o como proteínas metabólicas o estructurales de frutas, legumbres, semillas, pólenes, etc., los inhibidores de proteasas, al ser proteínas ubicuas, podrían estar jugando un papel importante en el síndrome de reactividad cruzada látex-alimentos.

Como se aprecia en la Figura 19, los grupos de pacientes mostraron diferencias significativas en el reconocimiento de rHPI. De los 24 sueros probados del grupo de pacientes alérgicos a maíz (Figura 19A) todos tuvieron reconocimiento por rHPI, mientras que de los 32 sueros del grupo de pacientes alérgicos al látex únicamente hubo reconocimiento significativo en el suero de un paciente (Figura 19B).

Por lo tanto, podríamos sugerir que aunque rHPI no juega un papel crucial en la reacción alérgica mediada por IgE's en pacientes alérgicos al látex, si podría ser considerado un factor determinante en la respuesta alérgica en pacientes alérgicos a alimentos por reactividad cruzada. De acuerdo con Malo y Chan-Yeung., (2009), la respuesta alérgica mediada por IgE's en presencia de proteínas de cereales es relativamente frecuente y pueden ser provocada por la exposición a través de diferentes rutas, y afectar a varias poblaciones y grupos de edad en todo el mundo. Aunque el trigo es el cereal más comúnmente involucrado, otros como el centeno, la cebada, el arroz, la avena y el maíz, también juegan un papel en la alergia.

En el 2008, Constantin y colaboradores identificaron a un inhibidor de serín proteasas como un nuevo alérgeno en el asma ocupacional del panadero. El alérgeno es una proteína de 9.9 kDa, el cual usualmente forma tetrámeros (40 kDa) y es un nuevo miembro de la familia de inhibidores tipo I de papa. Esta proteína probablemente se encuentra involucrada en la defensa de la planta y pertenece a la familia de proteínas relacionadas a la patogénesis PR-6 (Salcedo *et al.*, 2011).

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que rHPI (Hev b 15) es un alérgeno importante en el síndrome de reactividad cruzada látex-alimentos.

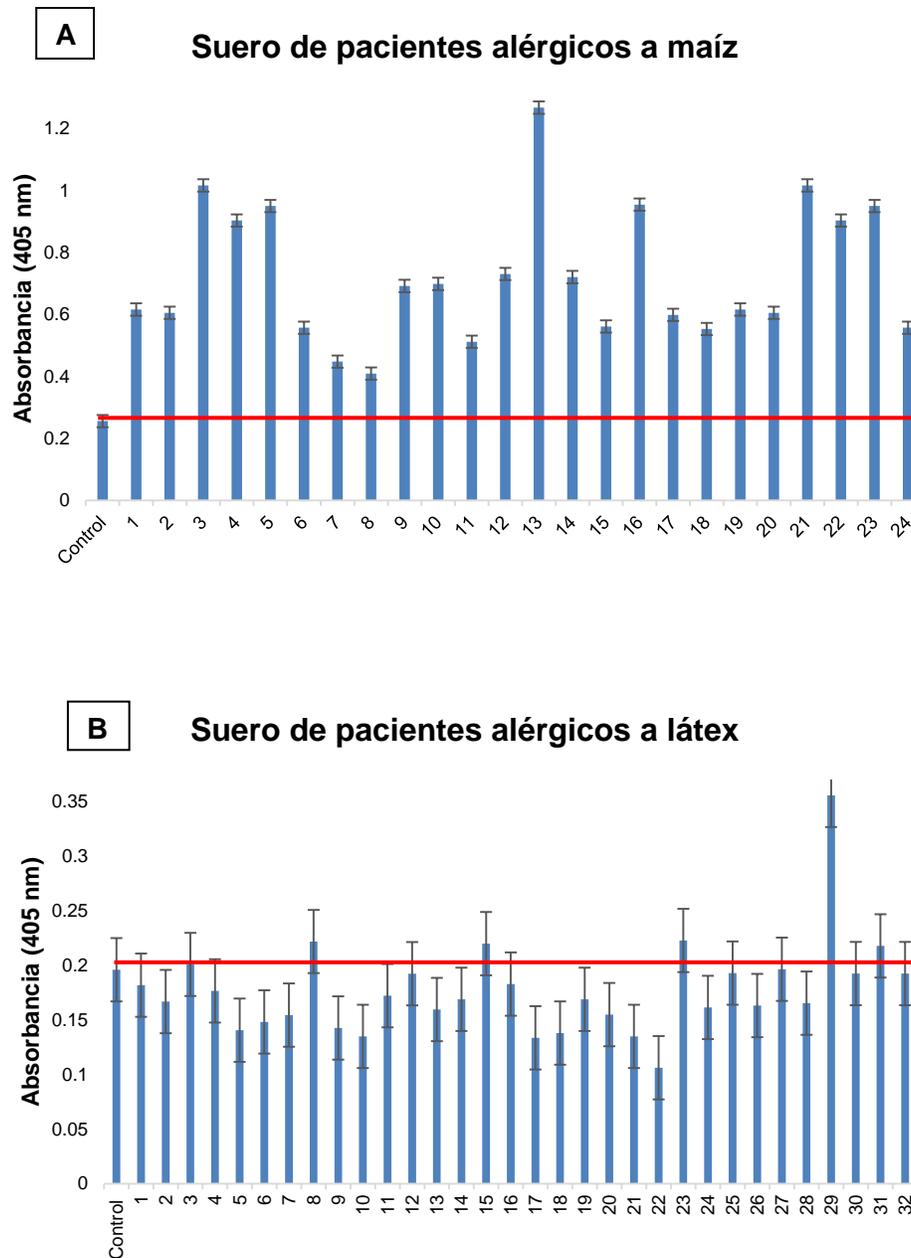


Figura 19. Experimentos de ELISA con HPI. A) Suero de pacientes alérgicos a maíz. B) Suero de pacientes alérgicos a látex. La línea horizontal en rojo indica el criterio de reacción positiva, el cual representa tres veces la desviación estándar del control.

6.5.5 Cristalización de rHPI

Los ensayos para encontrar las condiciones de cristalización de rHPI se realizaron empleando los kits comerciales: Crystal Screen I y II de Hampton Research (98 condiciones diferentes). Los ensayos se realizaron por el método de difusión de fase de vapor en la modalidad de gota colgante, a 18°C.

Se obtuvieron cristales después de dos días de incubación a 18°C con una concentración de 15 mg/mL de proteína mezclando 2 μ L de la proteína con 2 μ L de solución precipitante (proporción 1:1 volumen) y equilibrando con 400 μ L de solución madre, en la condición de acetato de magnesio 0.2 M, cacodilato de sodio 0.1 M, pH 6.5, 20 % w/v PEG 8000 (Figura 20).



Figura 20. Cristales de rHPI.

Para evaluar la calidad de los cristales, éstos se crioprotegieron con glicerol al 30% y se montaron en el difractor de ánodo rotorio Rigaku MicroMax 007 HF con un detector Pilatus DECTRIS 3R 200K-A.

En la Figura 21 se muestra una imagen de difracción de 10 segundos, que permite apreciar que los cristales son de proteína, que difractan a 2.04 Angstroms de resolución; sin embargo, son maclas (agrupación simétrica de cristales idénticos), por lo que se continuará con la optimización de los mismos.

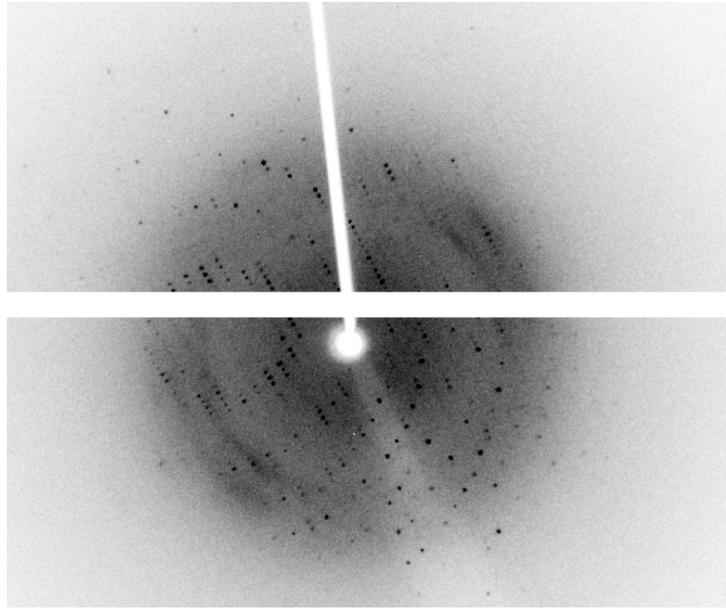


Figura 21. Patrón de difracción de los cristales de rHPI. Este patrón de difracción demuestra que los cristales obtenidos están constituidos por moléculas proteicas.

7 DISCUSIÓN

Las plantas tienen mecanismos de defensa complejos y eficientes para combatir peligros potenciales en el ambiente. Uno de los procesos bioquímicos frecuentes en estos mecanismos es la activación transcripcional de genes que codifican proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP). Estos genes son inducidos por una variedad de estímulos bióticos y abióticos como son: la invasión por patógenos, heridas, reguladores de crecimiento (etileno), compuestos químicos o metales pesados. Dentro de la clasificación de las PRP se encuentra una de las isoformas del inhibidor-alérgeno Hev b 15 denominado como HPI, el cual se encuentra agrupado dentro de la familia PR-6, y ha sido identificado en el transcriptoma de *Hevea brasiliensis* por Han *et al*, 2000 y Ko *et al*, 2003. Este inhibidor fue aislado y caracterizado parcialmente por Sritanyarat *et al* (2006) a partir de un homogenado del suero citoplasmático de *H. brasiliensis*. Sin embargo, a la fecha no hay reportes sobre su alergenicidad, ni sobre su caracterización cinética y estructural.

En el presente estudio nos enfocamos en la caracterización bioquímico-estructural y determinación de la alergenicidad del inhibidor rHPI.

En primer término, la presencia del inhibidor HPI en el suero C se evaluó por ensayos colorimétricos de inhibición de las serín proteasas subtilisina y tripsina, observando que las fracciones que contenían al inhibidor presentaron mayor especificidad por la subtilisina que por la tripsina, tal y como lo reporta Sritanyarat *et al* (2006). El paso de purificación de HPI por exclusión molecular no resolvió el problema de contaminación con otras proteínas. En el análisis por espectrometría de masas de las fracciones obtenidas de la purificación por la columna de exclusión molecular, se obtuvo un pico 7.76 kDa, el cual podría corresponder a la masa de 7.75 kDa identificada para una de las isoformas de HPI reportadas por Sritanyarat *et al.*, (2006). En esta isoforma los autores reportaron una modificación post-traducciona l ocurrida durante la colecta del látex, la cual fue identificada como una glutationalización. Con estos ensayos se corrobora la presencia y especificidad del inhibidor de serín proteasas HPI en el suero citoplasmático del látex de *H. brasiliensis*. Sin embargo, debido a las dificultades presentadas en la obtención del látex, así como por los bajos rendimientos en proteína soluble, se optó por trabajar con el inhibidor HPI recombinante (rHPI). La expresión del inhibidor, así como su purificación, permitió tener suficiente proteína para la caracterización molecular e inmunológica.

La expresión de rHPI con el vector pET28a en la cepa de *E. coli* Rosseta ρ nos permitió obtener altos rendimientos de proteína soluble desde las primeras 2 horas de inducción. La purificación de rHPI por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} , así como la posterior recirculación después de la escisión de la etiqueta de fusión His_6 con la proteasa TEV, permitió eliminar un gran número de contaminantes endógenos de la cepa empleada. El último paso de purificación con una columna de intercambio aniónico dio lugar a la obtención rHPI con un alto grado de pureza, logrando 18 mg de proteína total por litro de medio de cultivo. La masa de rHPI se corroboró por espectrometría de masas MALDI-TOF, observando un pico mayoritario con una masa molecular de 7.73 kDa, valor que corresponde a la masa teórica esperada (7.74 kDa). Además, se aprecia un pico de menor abundancia de 15.47 kDa que representa el doble de la masa observada en el pico mayoritario, lo que podría ser resultado de la formación de una estructura dimérica por el establecimiento de un puente disulfuro con el único residuo de Cys5 por monómero de rHPI, localizado en el extremo N-terminal o bien, un dímero transitorio estabilizado por interacciones débiles.

A partir de los datos de la cinética de inhibición de rHPI contra subtilisina analizados en el gráfico de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos $1/V_o$ vs $1/[S]$), se determinó que conforme se incrementa la concentración del inhibidor, la V_{maxapp} disminuye, mientras que la K_{mapp} se mantiene constante en aproximadamente $2.02 \times 10^{-3} \text{M}$. Estos datos sugieren que rHPI podría tratarse de un inhibidor de tipo No competitivo, caracterizado por afectar los valores de V_{max} , mientras que el valor de K_m no se altera. Además, se determinó un valor de K_i de $1.09 \times 10^{-5} \text{M}$ que podría considerarse como un inhibidor “clásico” por tener una K_i en el intervalo de 10^{-2} - 10^{-6}M , de acuerdo a la clasificación de Bieth, (1995).

A partir de los datos obtenidos de la estabilidad térmica seguida por DC y fluorometría diferencial de barrido, se determinó que rHPI resultó ser dependiente del pH, siendo extremadamente resistente a la desnaturalización (25°C – 95°C) en el intervalo de pH 5.8 a 11. Este resultado concuerda con la estabilidad reportada para la familia PR-6 (Van Loon y Van Strien, 1999) e inhibidores de tipo 1 de papa/tomate clasificada por MEROPS. Aunque esta familia carece de puentes disulfuro intramoleculares, los inhibidores de la familia tipo I de papa son extremadamente estables, manteniendo su actividad a un pH de 2–9 con una temperatura de 80°C durante 10 minutos (Seemuller *et al.*, 1986).

En cuanto a la caracterización de la alergenicidad de rHPI, se sabe que el fenómeno de hipersensibilidad de tipo I ha cobrado gran importancia a nivel mundial debido al dramático incremento en el número de personas que se ven afectadas por esta patología. La

predisposición genética, las condiciones ambientales y la frecuencia de exposición a los alérgenos son las principales características observadas que parecen participar de forma importante durante la sensibilización de las personas.

En el caso de la alergia al látex se ha despertado un interés creciente por estudiar y comprender las características moleculares que participan en la respuesta de hipersensibilidad ocasionada por algunas proteínas presentes en los productos elaborados con este material. La gran mayoría de los estudios realizados sobre los alérgenos del látex han sido enfocados principalmente al área inmunológica y en menor grado al área molecular. De los alérgenos reportados en *H. brasiliensis* se conoce la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, así como su función. En nuestro grupo de trabajo se han determinado las estructuras terciarias de 5 alérgenos de *H. brasiliensis*. Es importante mencionar que muchos de ellos juegan un papel importante en la protección y defensa de la planta.

En este trabajo se analizó la alergenicidad de rHPI empleando la técnica de ELISA y utilizando suero de pacientes alérgicos al látex y a maíz. En los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas en el reconocimiento de rHPI. De los sueros probados del grupo de pacientes alérgicos a maíz todos tuvieron reconocimiento por rHPI, mientras que de los sueros del grupo de pacientes alérgicos al látex únicamente hubo reconocimiento significativo en el suero de un paciente. Por lo tanto, podríamos sugerir que aunque rHPI no juega un papel crucial en la reacción alérgica mediada por IgE's en pacientes alérgicos al látex; si podría ser considerado un factor determinante en la respuesta alérgica en pacientes alérgicos a alimentos por reactividad cruzada. De acuerdo con Malo y Chan-Yeung., (2009), la respuesta alérgica mediada por IgE's en presencia de proteínas de cereales es relativamente frecuente y pueden ser provocada por la exposición a través de diferentes rutas, y afectar a varias poblaciones y grupos de edad en todo el mundo. Aunque el trigo es el cereal más comúnmente involucrado, otros como el centeno, la cebada, el arroz, la avena y el maíz, también juegan un papel importante en la alergia.

Finalmente, es importante mencionar que la determinación de la estructura tridimensional de rHPI permitirá identificar cuáles son los residuos de aminoácidos que, por su accesibilidad y características en la molécula, podrían estar participando en la unión con las IgE's. Estos estudios también permitirán encontrar los posibles motivos estructurales que son compartidos entre los alérgenos que han sido identificados como los responsables de la antigenicidad cruzada entre el látex y frutas o plantas. Estos reconocimientos podrán ser utilizados en el diseño de moléculas alergénicas que sirvan para el diagnóstico de la

alergia al látex y en los procesos de inmunoterapia específica. Así, con el objetivo de poder determinar la estructura terciaria del rHPI, se determinó la condición en la cual se obtienen cristales proteicos adecuados para ensayos de difracción de rayos X. Estos cristales se obtuvieron después de dos días de incubación a 18°C con una concentración de 15 mg/mL en la condición de acetato de magnesio 0.2 M, cacodilato de sodio 0.1 M, pH 6.5, 20 % w/v PEG 8000. Los cristales difractan a una resolución de 2.04 Angstroms; sin embargo, no son cristales únicos sino maclas, por lo que se continuará con la optimización de los mismos.

8 CONCLUSIONES

rHPI presenta un plegamiento $\alpha+\beta$ de acuerdo a los espectros de DC en la región del UV lejano.

rHPI resultó ser extremadamente termoresistente en un intervalo de pH de 5.8 a 11, siendo dependiente del pH.

rHPI presenta un mecanismo de inhibición de tipo no competitivo, caracterizado por afectar solo el valor de V_{max} , sin provocar alteración en la K_m . El valor de K_i de 1.09×10^{-5} M, indica que se trata de un inhibidor "Clásico".

rHPI no juega un papel crucial en la reacción alérgica mediada por IgE's en pacientes alérgicos al látex; sin embargo, si podría ser considerado un factor determinante en la respuesta alérgica en pacientes alérgicos a alimentos por reactividad cruzada.

Se obtuvieron cristales adecuados para los experimentos de difracción de rayos X, los cuales difractan a una resolución de 2.04 Angstroms.

9 REFERENCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2007). *Inmunología Celular y Molecular*, Río de Janeiro, Elsevier.
2. Antão CM, Malcata FX (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol and Biochem* 43: 637-650.
3. El-latif AO (2014). *In vivo* and *in vitro* inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. *Pestic Biochem Physiol* 116: 40-8.
4. Balestrazzi A, Confalonieri M, Odoardi M, Ressegotti V, Allegro G, Tava A Carbonera D (2004). A trypsin inhibitor cDNA from a novel source, snail medic (*Medicago scutellata* L.): cloning and functional expression in response to wounding, herbivore, jasmonic and salicylic acid. *Plant Sci* 167: 337-346.
5. Berova N, Nakanishi K, Woody RW (2000). *Circular Dichroism Principles and Applications*, 2nd edn. New York, USA: Wiley VCH.
6. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Peruch F (2014). *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. *Biochimie* 106: 1-9.
7. Bieth JG (1995). Theoretical and Practical Aspects of Aspects of Proteinase Inhibition Kinetics. *Methods Enzymol* 248: 59-66.
8. Blumenthal MN (2004). New thoughts regarding the genetics of atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 550-555.
9. Bode W, Huber R (1992). Natural protein inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 204: 433-451.
10. Boivin S, Kozak S, Meijers R (2013). Optimization of protein purification and characterization using thermofluor screens. *Protein Express and Purif* 91: 192-206.
11. Brasó JV y Jorro G (2003). *Manual de ALERGIA CLÍNICA*. Masson, S.A. Barcelona, España.
12. Chotigeat W, Duangchu S, Wititsuwannakun R, Phongdara A (2008). Cloning and characterization of pectate lyase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol Biochem* 47(4): 243-7.
13. Constantin C, Quirce S, Grote M, Touraev A, Swoboda I, Stoecklinger A, Mari A, Thalhamer J, Heberle-Bors E, Valenta R (2008). Molecular and immunological characterization of a wheat serine proteinase inhibitor as a novel allergen in baker's asthma. *J Immunol* 180: 7451-7460.
14. Dai L, Kang G, Li Y, Nie Z, Duan C, Zeng R (2013). In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol* 82: 155-168.
15. Dalmas B, Hunter GJ, Bannister WH (1994). Prediction of Protein Secondary Structure From Circular Dichroism Spectra Using Artificial Neural Network Techniques. *Biochem Mol Biol Int* 34 (1): 17-26.
16. Farrell BD, Dussourd DE, Mitter C (1991). Escalation of plant defenses: do latex and resin canals spur plant diversification? *Amer Nat* 138: 881-900.

17. Ferreira, R., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C., Chen, Z., Batista, L., Duarte, J., Borges, A. and Teixeira, A. (2006). Fungal pathogens: the battle for plant infection. *Crit Rev Plant Sci* 25: 505–524.
18. Fischer M, Kuckenbergh M, Kastilan R, Muth J, Gebhardt C (2015). Novel in vitro inhibitory functions of potato tuber proteinaceous inhibitors. *Mol Genet Genomics* 290: 387-398.
19. Galicia C, Mendoza-Hernández G, Rodríguez-Romero A (2015). Impact of the vulcanization process on the structural characteristics and IgE recognition of two allergens, Hev b 2 and Hev b 6.02, extracted from latex surgical gloves. *Mol Immunol* 65: 250-258.
20. Galli SJ (2000). Allergy. *Elsevier Science* 10 (3): 93-95.
21. Gell PGH y Coombs RRA (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical Aspects of Immunology* (Coombs RRA y Gell PGH., eds) Blackwell Science.
22. Liao H, Ren W, Kang Z, Jiang JH, Zhao XJ, Du LF (2007). A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnol Lett* 29 (4): 653-658.
23. Hartley, BS (1960). Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem*, 29: 45-72.
24. Hermosa MR, Turrà D, Fogliano V, Monte E, Lorito M (2006). Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Path* 68: 138-148.
25. Huang HW, Chen WC, Wu CY, Yu HC, Lin WY, Chen ST, Wang KT (1997). Kinetic studies of the inhibitory effects of propeptides subtilisin BPN'and Carlsberg to bacterial serine proteases. *Protein Eng* 10 (10): 1227-1233.
26. Janeway AC, Travers P (1996). Immunobiology, 2^a ed., London, Curren Biology LTD; 11:3-11.
27. Jacob JL, D'Auzac J, Prevôt JC (1993). The composition of Natural Latex from *Hevea brasiliensis*. *Clin Rev Allergy* 11: 325-337.
28. Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, Park Y (2009). Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int J Mol Sci* 10 (6): 2860-2872.
29. Joshi RS, Mishra M, Suresh CG, Gupta VS, Giri AP (2013). Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors. *Biomembranes* 1830 (11): 5087-5094.
30. Kim JS, Kim YO, Ryu HJ, Kwak YS, Lee JY, Kang H (2003). Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol* 44: 412–414.
31. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE y Thomas W (1994). Allergen Nomenclature. *J Allergy Clin Immunol* 105: 224-33.
32. Ko JH, Chow KS, Han KH (2003). Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol* 53: 479–492.
33. Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Sci* 2(10): 379-384.

34. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* 60: 2427-2444.
35. Kush A, Goyvaerts E, Chye ML, Chua NH (1990). Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1787-1790.
36. Laskowski M, Kato I (1980). Protein Inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49: 593-626.
37. Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* 43: 305-341.
38. Malo JL, Chan-Yeung M (2009). Agents causing occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123: 545-550.
39. Martínez-Caballero S, Cano-Sánchez P, Mares-Mejía I, Díaz-Sánchez AG, Macías-Rubalcava ML, Hermoso JA, Rodríguez-Romero A (2014). Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS J* 281: 4535-4554.
40. Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP (2014). Current Overview of Allergens of Plants Pathogenesis Related Protein Families. *Sci World J ID* 543195: 1-19.
41. McPhalen CA, Schnebli HP, James MN (1985). Crystal and molecular structure of the inhibitor eglin from leeches in complex with subtilisin Carlsberg. *FEBS Lett* 188: 55-58.
42. Nakahata AM, Bueno NR, Rocha HAO, Franco CRC, Chammas R, Nakaie CR, Jasiulionis MG, Nader HB, Santana LA, Sampaio MU, Oliva MLV (2006). Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *Int J Biol Macromol* 40: 22-29.
43. Neuhof C, Oliva ML, Maybauer D, Maybauer M, De Oliveira C, Sampaio MU, Sampaio CA, Neuhof H (2003). Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinoides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. *Biol Chem* 384: 939-944.
44. Oliveira C, Navarro-Xavier RA, Anjos-Vallota EA, Martins JO, Silveira VL, Goncalves LR, Araujo MS, Motta G, Sannomiya P, Olova ML (2010). Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions. *Br J Pharmacol* 161: 899-910.
45. Rawlings ND, Barrett AJ (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1): 205-218.
46. Rawlings ND, Tolle DP, Barret AJ (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*. 378: 705-716.
47. Reyes-López CA y Rodríguez-Romero A (2002). Características bioquímicas y moleculares de alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 11 (3): 92-100.
48. Rinderknecht H, Geokas MC, Silverman P, Haverback BJ (1968). A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin Chim Acta* 21 (2):197-203.
49. Rodríguez-Romero A (1991). Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett* 291: 307-309.

50. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, Fuentes-Silva D, Palomares L, Muñoz-Cruz S, Yépez-Mulia L, Orozco-Martínez S (2013). Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo-B-1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr D* 70: 329-41.
51. Ryan CA (1990). Protease inhibitors in plants genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28: 425-449.
52. Salcedo G, Quirce S, Díaz-Perales A (2011). Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21 (2): 81-92.
53. Seemuller U, Dodt J, Fink E, Fritz H (1986). Proteinase inhibitors of the leech *Hirudo medicinalis* (hirudins, bdellins, eglins). In proteinase inhibitors (Barret AJ y Salvesen G eds), Elsevier, Amsterdam, 337-359.
54. Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46: 941-950.
55. Sritanyarat W, Pearce G, Siems WF, Ryan CA, Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D (2006). Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 67 (15): 1644-50.
56. Szépfalusi Z, Seidl R, Bernert G, Dietrich W, Spitzauer S y Urbanek R (1999). Latex sensitization in spina bifida appears disease-associated. *J Pediatric* 134: 344-8.
57. Van der Hoorn RAL (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 59: 191–223.
58. Van Loon LC, Van Strien EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 types proteins. *Physiol Mol Plant Path* 55: 85-97.
59. Wang X, Shi M, Lu X, Ma R, Wu C, Guo A, Peng M, Tian W (2010). A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS. *Proteome Sci* 8: 35.