



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS



EXPRESIÓN DEL ALÉRGENO DE POLEN DE FRESNO FRA E 1 EN *E. COLI* Y DETERMINACIÓN  
DE SU CAPACIDAD ALERGÉNICA ANTE SUEROS DE PACIENTES SENSIBLES.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:

JESSICA YOSELYN JIMÉNEZ RIOS

TUTORES DE TESIS:

DR. JUAN CARLOS VIZUET DE RUEDA  
DR. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ

ADSCRITOS AL SERVICIO DE INMUNOGENÉTICA Y ALERGÍA DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Es mejor fracasar mientras se lucha por algo maravilloso, desafiante, aventurero e incierto que decir: *“No quiero intentarlo porque es posible que no tenga éxito por completo”*

Jimmy Carter.

## **Agradecimientos:**

A mis padres, quienes desde el inicio de mis días han estado siempre para apoyarme y alentarme a perseguir mis sueños. Este logro también es de ustedes, nunca me dejaron sola durante este largo trayecto. Los amo inmensamente.

A mis hermanos, sin duda dos de los mejores seres que conozco y amo; siempre están para darme ánimo en todo, son una fuente de inspiración para mí.

A mis amigos de toda la vida y a los que hice durante esta etapa, su apoyo incondicional siempre me ha servido para seguir adelante, gracias por estar en los mejores y peores momentos.

A mis maestros de especialidad, al Doctor Gandhi Pavón y el Doctor Fernando Ramírez por enseñarme con paciencia el increíble mundo de la alergia e inmunología, sin duda mejores profesores no pude tener.

Por supuesto a mis tutores el Doctor Juan Carlos Vizuet de Rueda y el Doctor Luis Manuel Terán Juárez, por guiarme e inspirarme durante la elaboración de este protocolo, no lo habría logrado sin su paciencia, tiempo y el compromiso que invirtieron en mi proyecto.

Al equipo del Departamento de Investigación en Inmunogenética y Alergia por su ayuda durante la realización de mis experimentos.

Y, por último, pero no menos importante, a mis pacientes, aprendí de cada uno de ellos, no hay mejor forma de reforzar el conocimiento que la de usarlo en pro de su bienestar.

Gracias a todos.

---

Dr. Juan Carlos Vázquez García

Director de enseñanza

---

Dra. María del Carmen Cano Salas

Subdirectora de Enseñanza

---

Dra. Dayanna Lorelly Álvarez Monter

Titular del Departamento de Formación de Posgrado

---

Dr. Luis Manuel Terán Juárez

Profesor titular de la especialidad de Alergia e Inmunología clínica

---

Dr. Juan Carlos Vizuet de Rueda

Asesor de tesis

# ÍNDICE

Tema	Pág.
1. Marco teórico.....	1
1.1 Alergia .....	1
1.1.1 Mecanismos fisiopatológicos de la alergia .....	2
1.1.2 Inmunoglobulina E .....	3
1.1.2.1 Receptores de IgE .....	4
1.2 Polinosis.....	7
1.3 Rinitis Alérgica.....	7
1.4 Asma.....	9
1.5 Conjuntivitis alérgica.....	10
1.6 Pólenes.....	11
1.6.1 Lamiales.....	12
1.6.2 Epidemiología de alergia al polen .....	13
1.6.3 Alérgenos del Fresno.....	14
1.7 Diagnóstico en alergia.....	16
1.7.1 Pruebas <i>ex vivo</i> .....	16
1.7.2 Pruebas <i>in vitro</i> .....	19
1.7.3 Extractos alérgicos.....	20
1.7.3.1 Síntesis de alérgenos recombinantes.....	23
1.7.3.2 <i>E. coli</i> .....	24
1.7.3.3 Vectores de expresión en bacterias.....	25
1.7.3.4 Antecedentes de clonación de Fra e 1.....	28
1.8 Tratamiento de alergia al fresno.....	29
2. Planteamiento del problema .....	30
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
6. Metodología.....	31
6.1 Tipo y diseño de estudio.....	31
6.2 Población.....	31
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	31
6.4 Identificación del gen de Fra e 1 y su síntesis .....	32
6.5 Preparación de células químicamente competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	32
6.6 Transformación del vector en células <i>E. Coli</i> BL21 (DE3).....	33
6.7 Extracción proteica total de <i>E. Coli</i> .....	33
6.8 Inducción proteica.....	34
6.9 Lisis celular.....	34
6.10 Purificación proteica.....	34
6.11 Desalación y concentración con columnas AMICON y digestión con proteasa TEV...	34
6.12 Electroforesis de proteínas.....	35
6.13 Análisis de la proteína recombinante por espectrometría de masas.....	35
6.14 Inmunotransferencia.....	35
6.15 Inmunodetección con sueros de pacientes.....	36
7. Resultados.....	37
7.1 Reclutamiento de pacientes.....	37
7.2 Selección del sistema de expresión.....	39
7.3 Preparación de células competentes y transformación.....	41
7.4 Inducción y extracción proteica.....	43
7.5 Purificación de proteínas .....	44
7.6 Digestión con proteasa TEV .....	44
7.7 Validación del potencial alérgico de Fra e 1.....	46
8. Discusión.....	50
9. Conclusiones.....	55
10. Perspectivas.....	55
11. Bibliografía.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figuras</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Control epitelial de la inmunidad tipo 2.....	3
Figura 2. Estructura de la IgE y su interacción con los receptores FcεRI.....	5
Figura 3. Eventos tempranos en la señalización del receptor FcεRI.....	6
Figura 4. Patogénesis de la rinitis alérgica.....	8
Figura 5. Broncoconstricción.....	10
Figura 6. Mapa de distribución de <i>Fraxinus uhdei</i> en México reportado por observaciones.....	14
Figura 7. Árbol de Fresno.....	14
Figura 8. Calendario de polen de la delegación Miguel Hidalgo.....	15
Figura 9. Pruebas cutáneas realizadas en paciente con rinitis alérgica.....	17
Figura 10. Inducción con IPTG.....	26
Figura 11. Componentes de la proteína heteróloga clonado en el vector de expresión de bacteria pMAL-c4x.....	32
Figura 12. Vector de expresión de bacteria pMAL-c4x.....	40
Figura 13. Electroforesis de los vectores digeridos.....	41
Figura 14. Comparación entre las secuencias de Fra e 1 y el producto clonado en pMAL-c4X-Frae1.....	42
Figura 15. Electroforesis de la inducción de proteínas.....	43
Figura 16. Electroforesis de la purificación proteica.....	44
Figura 17. Electroforesis de digestión proteica.....	45
Figura 18. Electroforesis de proteínas digeridas con TEV .....	46
Figura 19. Inmunoblot con la proteína recombinante de Fra e 1 y extractos proteicos totales de polen de fresno...	47
Figura 20. Inmunoblot de paciente reactivo a fresno/olivo con la proteína recombinante digerida con TEV.....	48
Figura 21. Inmunoblot de paciente control proteína recombinante digerida con TEV.....	49
<b>TABLAS</b>	
Tabla 1. Características clínicas de pacientes.....	38
Tabla 2. Espectrofotometría de clonas de E. coli BL21.....	41
Tabla 3. Cuantificación proteica por el método de Bradford.....	43

## Expresión del alérgeno de polen de fresno Fra e 1 en *E. coli* y determinación de su capacidad alérgica ante sueros de pacientes sensibles.

### Resumen

La OMS estima que al menos el 25 % de la población mundial sufre de enfermedades alérgicas respiratorias, causada por alérgenos contenidos en los granos de polen. Fresno es un árbol de interés en México, debido a que su polen es el más abundante en la Ciudad de México con una prevalencia del 32.5%. Es muy frecuente que personas sufran sensibilización al polen de fresno, y más en zonas con altos niveles de contaminación como la CDMX. Para el diagnóstico y tratamiento de alergias respiratorias se emplean extractos proteicos totales de polen, los cuales no están estandarizados. Estos generan un riesgo de dar falsos positivos por cruces alérgicos con otras oleáceas y pueden producir nuevas sensibilizaciones a los pacientes. Una forma de obtener un diagnóstico más preciso es poder emplear a los alérgenos de manera individual. Sin embargo, obtenerlos y purificarlos de una fuente natural conlleva un alto coste. Una alternativa es expresar estos alérgenos y purificarlos. Por lo que se requiere expresar Fra e 1, y otros alérgenos, de una forma más eficiente y rápida con el fin de emplearlas en pruebas diagnósticas y con fines terapéuticos. En este trabajo expresamos Fra e 1 en la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) y determinamos su reconocimiento con sueros de pacientes sensibles con pruebas inmunohistoquímicas. El alérgeno Fra e 1 se mandó clonar, con optimización de uso de codones, en el vector pMAL-c4x. La inducción de la expresión se llevó a cabo empleando IPTG. Se hicieron extracciones proteicas totales y se procedió a purificar Fra e 1 empleando columnas de afinidad. Una vez que se purificó la proteína se procedió a digerir con la proteasa TEV para separar los elementos que forman la proteína recombinante Fra e 1. Esta proteína digerida se usó en ensayos de Western blot con sueros de 4 pacientes reactivos a trueno/fresno, 1 paciente reactivo a fresno/olivo y 1 paciente no reactivo para validar su alergenidad. Fra e 1 recombinante fue reconocida por el suero de pacientes positivos a trueno/fresno, pero no por el suero de paciente positivo a fresno/olivo y ni por el suero del paciente sano. Con todos los pacientes sensibles hubo reconocimiento de otros elementos como MBP y la proteasa TEV, pero no fueron detectados por el suero del sujeto control. La validación de la reactividad de la proteína recombinante demuestra que sí existe un reconocimiento específico por parte de los sueros de los pacientes sensibles a oleáceas, incluso en caso de reactividad cruzada.

# Expresión del alérgeno de polen de fresno Fra e 1 en *E. coli* y determinación de su capacidad alérgica ante sueros de pacientes sensibles.

## 1 Marco teórico.

### 1.1 Alergia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al menos el 25 % de la población mundial sufre de enfermedades alérgicas respiratorias como el asma y la rinitis alérgica, reconociendo que millones de personas no tienen un diagnóstico específico (Morales-Amparano et al., 2021).

Se considera como alergia a aquella reacción de hipersensibilidad tipo I (mediada por IgE) a antígenos ambientales inocuos que se caracterizan por una respuesta inmune desequilibrada; en individuos susceptibles el contacto repetido con dicho alérgeno estimula el sistema inmune para inducir la producción de inmunoglobulina E (IgE). Cuando las moléculas de IgE en la superficie del mastocito se combinan con el antígeno inicia un proceso que causa degranulación, con la consiguiente liberación de mediadores de inflamación, responsables de desencadenar los síntomas alérgicos (Pointner et al., 2020; Terán & Haselbarth-López, 2009).

Aunque la etiología de las enfermedades alérgicas no es bien conocida, se considera que la atopia es el factor de riesgo más importante para su desarrollo. En estudios de análisis de vinculación se han identificado *loci* relevantes para padecimientos alérgicos, los estudios de asociación de todo el genoma son prometedores en pro de identificar asociaciones genéticas nuevas y reproducibles. Sin embargo, dada la naturaleza multifactorial y la manifestación heterogénea de este tipo de enfermedades, la integración de los datos de predisposición genética sigue siendo un desafío. La atopia se considera un enigma gracias a la complejidad de sus raíces genéticas, aunado a los mecanismos fisiopatológicos definidos. Su definición va desde “la predisposición hereditaria a reaccionar con IgE” a “la predisposición hereditaria a montar una respuesta del tipo Th2” a las moléculas ambientales. En consecuencia, en entornos clínicos y experimentales la atopia se evalúa observando la producción de IgE. El riesgo de desarrollar alergia en individuos atópicos es 10 a 20 veces mayor que en sujetos no atópicos (Konishi et al., 2016; Matricardi et al., 2016; Pointner et al., 2020; Terán & Haselbarth-López, 2009).

Otros factores que se suman a la propensión genética a desarrollar anticuerpos IgE son: la exposición a diversas moléculas presentes en el medio ambiente, el incremento de la contaminación atmosférica, y el tipo de alimentación (M. Akdis, 2009; Burks, 2020).

La exposición a proteínas ambientales normalmente no desencadena una respuesta inmune debido a su naturaleza no patógena, sin embargo, la sensibilización alérgica a estas moléculas inocuas es un problema de salud global (Pointner et al., 2020). Los alérgenos causantes de las enfermedades respiratorias alérgicas son denominados aeroalérgenos, debido a que se encuentran suspendidos en la atmósfera donde vivimos. Los principales alérgenos inhalables son proteínas de ácaros (*Dermatophagoides*) y cucarachas, pólenes (árboles, pastos y malezas), esporas de hongos y epitelios de mascotas. De estos, *Dermatophagoides* y pólenes son los más comunes (Okubo et al., 2020; Terán & Haselbarth-López, 2009).

### 1.1.1 Mecanismos fisiopatológicos en la alergia.

La identificación y caracterización de alérgenos ayuda a comprender la enfermedad alérgica con el fin de desarrollar estrategias de intervención inmune. Los alérgenos son casi siempre proteínas, pero no todas las proteínas son alérgenos. Una proteína que tiene actividad alérgica debe mostrar dos propiedades: la inducción de la respuesta IgE, que implica la fase de sensibilización que incluye la cooperación de células T, células B y células dendríticas (DC), y la inducción de una respuesta clínica a la misma proteína, o similar, en exposiciones posteriores que implica respuestas inmediatas y de fase tardía (C. A. Akdis, 2006; Matricardi et al., 2016).

El proceso inflamatorio tiene varias características comunes compartidas entre diferentes enfermedades alérgicas, que incluyen el asma, la rinitis/rinosinusitis alérgica, la conjuntivitis alérgica y la dermatitis atópica. En las reacciones de hipersensibilidad tipo I las células presentadoras de antígenos (APC), principalmente las DC, controlan la diferenciación de las células T auxiliares naïve en células T efectoras, como las células Th1 o Th2. Tras el encuentro inicial con alérgenos ocurre la polarización de las células Th2, un sello distintivo de la sensibilización alérgica, la cual se desencadena por la señalización de la interleucina 4 (IL-4) y se caracteriza por la secreción de citoquinas asociadas a Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Tras la activación por citoquinas Th2, las células B se someten a un cambio de clase para producir anticuerpos IgE antígeno-específicos, los cuales preparan a los mastocitos y basófilos

uniéndose a su receptor de alta afinidad FcεRI. Tras la reexposición, la unión alérgeno-IgE causa la degranulación celular y la liberación de mediadores inflamatorios en cuestión de minutos, lo que lleva al reclutamiento de otras células inmunes y, en consecuencia, la aparición de los síntomas alérgicos (Pointner et al., 2020) (Fig.1). Las diferencias clínicas entre estas enfermedades están determinadas en gran medida por las diferencias anatómicas y la interacción entre la inflamación alérgica y las células estructurales (las células del músculo liso de las vías respiratorias inferiores que provocan broncoconstricción, la vasodilatación de las vías respiratorias superiores provoca obstrucción nasal y rinorrea) (Burks, 2020).

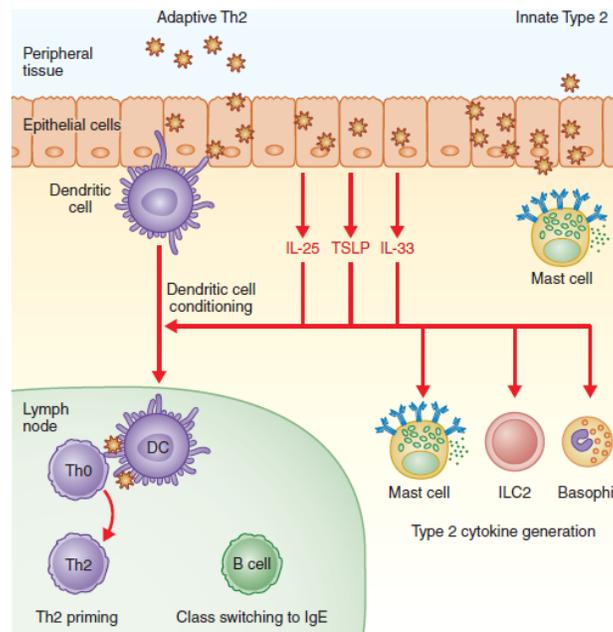


Figura 1. Control epitelial de la inmunidad tipo 2. Después del encuentro con los alérgenos, las células epiteliales generan citocinas innatas de tipo 2, IL-33, IL-25 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP). Estas citocinas pueden activar las células dendríticas (DC), acondicionándolas para regular al alza la expresión de OX40L en la superficie celular. Al llegar al ganglio linfático que drena el tejido, éstas DC promueven la desviación de las células del perfil Th2 y la generación de citocinas tipo 2. Además, las células B se activan para cambiar de clase y generar células B IgE+. Del lado derecho se ilustra que estas mismas citocinas innatas pueden activar directamente las células efectoras innatas reclutadas y residentes en los tejidos, como los mastocitos, los basófilos y las ILC2 para producir citocinas de tipo 2 (Tomado de Burks, 2020).

### 1.1.2 Inmunoglobulina E.

La concentración de IgE en el suero sanguíneo es la más baja de los 5 subtipos de inmunoglobulina, aporta únicamente del 0 a 0.002 % de las inmunoglobulinas circulantes, tiene una vida media muy baja de aproximadamente 2 días. En ausencia de enfermedad los niveles de IgE en la sangre del cordón umbilical son bajos (<2 kUI/L; <4.8 mg/L), aumentan gradualmente durante la infancia con un pico entre los 10 y 15 años, posteriormente disminuyen

durante la edad adulta. La concentración sérica de IgE en individuos normales es típicamente alrededor de 50 a 100 ng/mL. Los niveles de IgE total también están influenciados por la composición genética, la raza, el estado inmunitario y los factores ambientales. Existe elevación de niveles de IgE en pacientes con enfermedades alérgicas, los niveles más elevados se han observado en pacientes con dermatitis atópica, asma alérgica, rinitis alérgica perenne y rinitis alérgica estacional, respectivamente. En pacientes sensibilizados al polen, dichos niveles alcanzan el pico máximo alrededor de 4 a 6 semanas posteriores al pico de polinización, disminuyendo hasta la próxima temporada (Burks, 2020; Stone et al., 2010).

### 1.1.2.1 Receptores de IgE.

Hay 2 receptores para IgE: el receptor de IgE de baja afinidad (FcεRII; CD23) expresado en la superficie de las células B, así como otras células hematopoyéticas, y el receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI). El FcεRI se expresa como tetrámeros ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) en DC, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas, músculo liso de las vías respiratorias, epitelial bronquial y células epiteliales intestinales. Y como trímeros ( $\alpha\gamma_2$ ) en células presentadoras de antígeno, aunque en niveles mucho más bajos (Sutton & Davies, 2015). Debido a la alta afinidad del receptor FcεRI por la IgE monomérica, ésta funciona eficazmente como un receptor de antígeno en la superficie de las células que la expresan. A diferencia de las células B, que expresan sólo un único tipo de Ig (inmunoglobulina), las células que expresan los receptores FcεRI pueden unirse a una amplia variedad de anticuerpos IgE, cada uno con una especificidad potencialmente diferente.

Las personas alérgicas tienen niveles elevados de anticuerpos IgE específicos. Como resultado, los FcεRI están unidos en mayor medida con IgE específica, logrando una densidad que permite el entrecruzamiento de los FcεRI al exponerse a alérgenos, dando como resultado la liberación de mediadores inflamatorios preformados (histamina) y mediadores recién formados derivados de fosfolípidos de membrana, (leucotrienos, prostaglandinas (PG) y factor activador de plaquetas). La liberación de estos mediadores conduce a la fase temprana o inmediata de la respuesta alérgica (Bernstein et al., 2016).

El receptor de IgE de baja afinidad FcεRII (CD23) se expresa en monocitos, células B y DC. Se cree que desempeña funciones reguladoras positivas y negativas, actúa como un amortiguador contra la acumulación de niveles excesivos de IgE y, en su forma soluble puede evitar la unión

de IgE al FcεRI; también puede desempeñar un papel en la regulación de la síntesis de IgE (Burks, 2020; Stone et al., 2010).

La cadena α del receptor FcεRI se une a la porción Fc (dominio C3) del IgE y consta de un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y una cola citoplasmática corta sin motivos de señalización (Fig. 2). La subunidad β consta de 4 dominios transmembranales con un solo motivo de inmunorreceptor basado en la activación de tirosina (ITAM) y está asociado con la quinasa Lyn. Las subunidades γ forman un dímero enlazado por disulfuro y cada subunidad contiene un ITAM (Arthur & Cruse, 2022; Stone et al., 2010; Sutton & Davies, 2015).

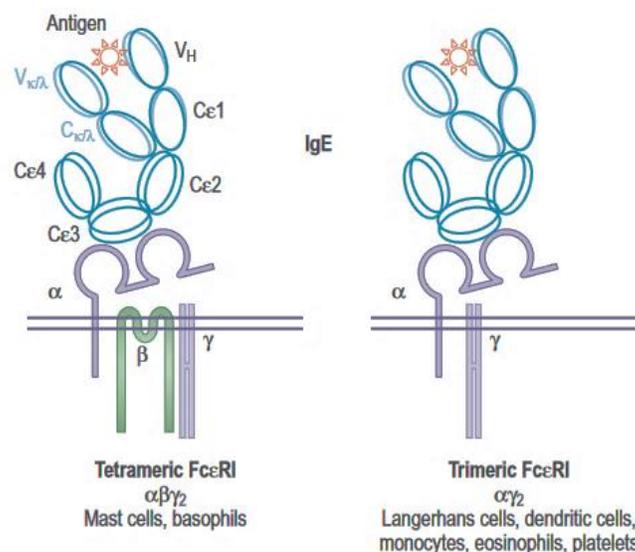


Figura 2. Estructura de la IgE y su interacción con los receptores FcεRI. Los anticuerpos IgE tienen cuatro dominios de región constante, Cε1-4 en sus cadenas pesadas ε. Cε3 interactúa con la cadena α de unión a IgE de FcεRI. FcεRI existe en dos conformaciones. Del lado derecho se observa la forma tetramérica clásica expresada en mastocitos y basófilos, contiene la cadena α de unión a IgE en asociación con la cadena β (miembro de la familia de las tetraspaninas de proteínas de cuatro dominios transmembrana, amplifica la transducción de señales) y un dímero de γ unido por puente disulfuro. Del lado izquierdo se observa la forma trimérica de FcεRI, la cual carece de la cadena β, está presente en varios otros tipos de células, incluidas las células de Langerhans y las DC (Tomado de Burks, 2020).

Después del entrecruzamiento de la IgE unida al receptor FcεRI por alérgenos polivalentes, Lyn fosforila los residuos de tirosina en los ITAM de las subunidades β y γ. La subunidad γ fosforilada luego recluta la quinasa (tirosina quinasa de bazo) Syk. Syk activa una serie de eventos de señalización río abajo asociados con la activación de mastocitos o basófilos, que conducen a la liberación de mediadores proinflamatorios (Fig. 3) (Stone et al., 2010). Estos mediadores lipídicos también tienen propiedades quimioatrayentes importantes para atraer células inflamatorias al tejido, lo que resulta en la respuesta alérgica de fase tardía que puede

manifestarse aproximadamente de 4 a 8 horas después de la respuesta de fase temprana o inmediata. Además, se liberan enzimas como la quimasa de mastocitos, la triptasa y las serinas esterasas, que pueden activar las metaloproteinasas de la matriz que reducen las proteínas de la matriz tisular conduciendo a daño tisular. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) también es liberado por los mastocitos activados los cuales pueden activar las células endoteliales, causando una mayor expresión de moléculas de adhesión, lo que facilita la afluencia de leucocitos inflamatorios (eosinófilos) y la afluencia de linfocitos en los tejidos. La liberación de citoquinas de células epiteliales, como TSLP, la IL-25 y la IL-33, también refuerza aún más la respuesta tipo Th2 (Bernstein et al., 2016).

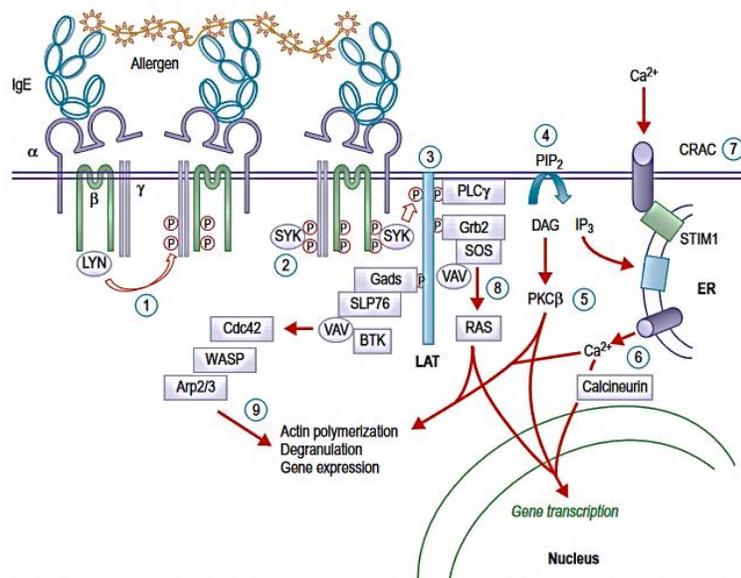


Figura 3. Eventos tempranos en la señalización del receptor Fc $\epsilon$ RI. Tras la interacción de la IgE unida al receptor con el alérgeno polivalente, la agregación del receptor permite que la proteína tirosina quinasa LYN fosforile los residuos de tirosina en los ITAM en las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ . (1). Esto genera sitios de acoplamiento para SYK, la quinasa temprana clave de la señalización de Fc $\epsilon$ RI (2). Luego, SYK fosforila la proteína de andamiaje asociada a la membrana (LAT), lo que conduce al reclutamiento de una serie de intermediarios de señalización y al ensamblaje de un complejo de señalización macromolecular (3). Uno de estos intermediarios, la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), hidroliza el lípido de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), para generar inositol 3,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (4). DAG activa la proteína quinasa C $\beta$  (PKC $\beta$ ) (5), una enzima que desencadena cascadas de señalización que conducen a la degranulación y activación transcripcional. IP<sub>3</sub> actúa sobre el retículo endoplásmico (ER), lo que lleva a la liberación de reservas de Ca<sup>2+</sup> en el citosol (6). Una vez que se agotan las reservas de ER, la proteína STIM1 del ER interactúa con los canales de calcio regulados por calcio (CRAC) en la membrana plasmática para inducir la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular (7). El reclutamiento de los factores de intercambio de GTP, VAV y SOS, para el complejo de señalización (a través de Grb2) activa Ras y sus vías río abajo, impulsando cambios en el citoesqueleto, desgranulación y expresión génica (8). La activación de la GTPasa de la familia rho, Cdc42, por VAV (asociada a través de los enlaces Gads y SLP76, que también reclutan la tirosina quinasa de Bruton [BTK]), induce la activación del complejo Arp2/3 por la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) con polimerización de actina resultante y cambios en el citoesqueleto (9) (Tomado de Burks, 2020).

## 1.2 Polinosis.

La alergia al polen, o polinosis, es la inflamación de la mucosa nasal y/o conjuntival y/o bronquial causada por alérgenos contenidos en los granos de polen a través de un mecanismo inmunológico mediado por IgE, dada de forma estacional (Konishi et al., 2016; Okubo et al., 2020; Smith et al., 2014; Terán & Haselbarth-López, 2009).

## 1.3 Rinitis alérgica.

La rinitis alérgica (RA) es una enfermedad alérgica de la mucosa nasal, se caracteriza por estornudos repetitivos paroxísticos, prurito nasal, rinorrea acuosa y obstrucción nasal (Brožek et al., 2017; Okubo et al., 2020). Según ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), la RA se clasifica en función de la duración de los síntomas en: intermitente y persistente, y acorde a la gravedad en: leve, moderada y grave. (Liva et al., 2021). La RA reduce la calidad de vida de muchos pacientes, perjudicando la calidad del sueño y la función cognitiva, causando irritabilidad y fatiga. La RA se asocia con una disminución del rendimiento escolar y laboral, especialmente durante la temporada alta de polen. Por esto es importante comprender la fisiopatología de los síntomas nasales, los cuales son producto de la activación de varios elementos funcionales de la mucosa nasal (Brožek et al., 2017; Burks, 2020).

En respuesta a la entrada de antígenos en la membrana mucosa, los anticuerpos IgE se producen en la mucosa nasal y los tejidos linfáticos regionales. Los antígenos inhalados pasan a través las células epiteliales de la mucosa nasal para unirse a los anticuerpos IgE en los mastocitos distribuidos sobre la mucosa. En respuesta a una reacción antígeno-anticuerpo, los mediadores químicos, como la histamina y los leucotrienos peptídicos (LT) son liberados por los mastocitos. Estos irritan las terminaciones nerviosas sensoriales y los vasos sanguíneos de la mucosa nasal para causar estornudos, rinorrea acuosa y edema de la mucosa nasal (obstrucción nasal) (Liva et al., 2021; Okubo et al., 2020). Los estornudos y el prurito se deben a la activación neural desencadenada por estímulos ambientales externos (irritantes) o por productos biológicos de un proceso inflamatorio local. El prurito nasal también está mediado por los nervios sensoriales. La presencia de receptores H1 en las terminaciones nerviosas sensoriales nasales explica los estornudos repetitivos que ocurren durante la exposición al alérgeno. Mientras que la presencia de canales de receptores potenciales transitorios explica el prurito posterior a la exposición a irritantes no antigénicos. El estornudo es causado por la

irritación histaminérgica del nervio trigémino en la mucosa nasal, transmitida al centro de estornudos de la médula oblonga (Figura 4) (Burks, 2020; Okubo et al., 2020).

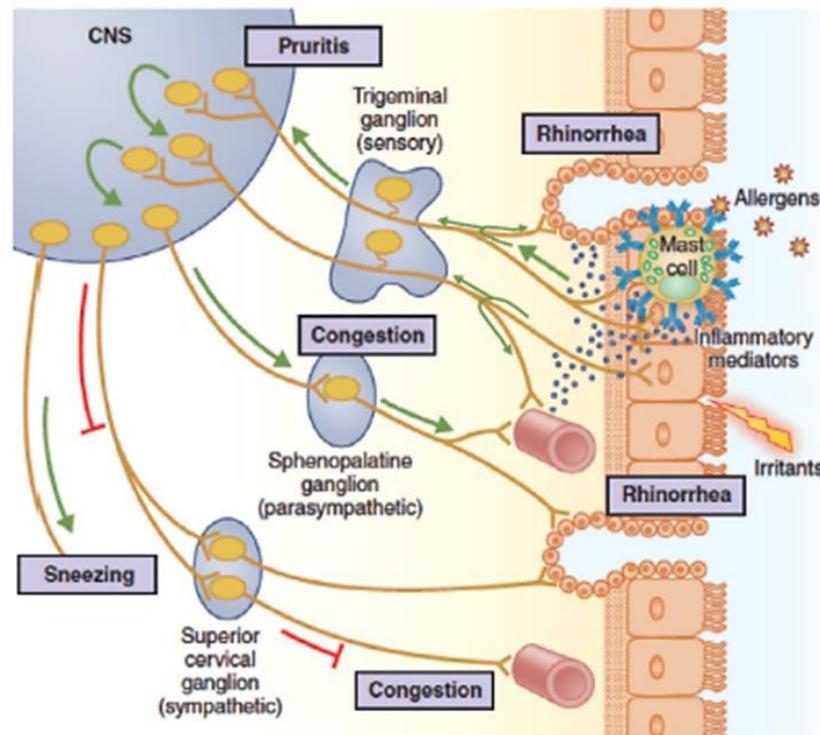


Figura 4. Patogénesis de la rinitis alérgica. Los síntomas nasales son producto de la activación de varios elementos funcionales de la mucosa nasal. El prurito nasal es mediado por los nervios sensoriales que se originan en las ramas oftálmica (nervio etmoidal anterior) y maxilar del nervio trigémino. El estornudo es un reflejo central, cuyo brazo aferente comienza en la mucosa nasal y el brazo eferente involucra los nervios motores que inervan el diafragma, los músculos respiratorios accesorios y la laringe. La rinorrea resulta de la activación excesiva del aparato glandular. Las glándulas nasales están inervadas por fibras colinérgicas parasimpáticas que se derivan del nervio facial y luego del nervio vidiano, que hacen sinapsis en el ganglio esfenopalatino, antes de su distribución final a la mucosa nasal. La activación de los nervios sensoriales por los productos de una reacción alérgica puede generar reflejos centrales que resultan en congestión nasal, por el aumento de la actividad parasimpática y posiblemente la disminución de la actividad simpática inducida por el brazo eferente del reflejo (Tomado de Burks, 2020).

La rinorrea resulta de la activación excesiva del aparato glandular productor de moco. La mucosa nasal tiene una gran cantidad de glándulas nasales, mucosidad y serosas, así como células caliciformes, que contribuyen a las secreciones nasales. Además, las secreciones nasales pueden enriquecerse con plasma a través de la difusión pasiva, un fenómeno que puede ocurrir en los capilares que abundan en la mucosa nasal. Muchos productos de la reacción alérgica, como la histamina y la bradiquinina, producen fuga de plasma representando solo el 10 % de la rinorrea. La mayor parte de la rinorrea se secreta de las glándulas nasales (Burks, 2020; Okubo et al., 2020).

La congestión nasal se produce como resultado de la congestión de los sinusoides venosos de la mucosa nasal, estos se encuentran en los cornetes inferior y medio, así como en el tabique nasal. Los leucotrienos liberados en las células inmaduras, particularmente los eosinófilos, desempeñan un papel importante en la congestión nasal observada en una fase tardía. Por lo tanto, la reacción de fase temprana de la rinitis alérgica es causada por una reacción antígeno-anticuerpo tipo I mediada por anticuerpos IgE. Luego, una reacción de fase tardía. La irritación continua de antígenos causa lesiones crónicas (Okubo et al., 2020).

#### 1.4 Asma.

El asma es una enfermedad heterogénea e inflamatoria crónica de las vías respiratorias, impulsada por las interacciones entre la regulación epigenética y la exposición ambiental (R. Kaur & Chupp, 2019). Existe evidencia de que el grado de inflamación está relacionado con la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), la cual es un estrechamiento exagerado de las vías respiratorias en respuesta a muchos estímulos que es característico de esta enfermedad. La inflamación de las vías respiratorias puede incrementar la capacidad de respuesta de las vías respiratorias y conducir directamente a un aumento de los síntomas del asma, como tos, sibilancias, opresión torácica, y disnea mediante la activación del nervio sensorial de las vías respiratorias (Burks, 2020; R. Kaur & Chupp, 2019).

Los alérgenos inhalados activan a los mastocitos sensibilizados mediante el entrecruzamiento de las moléculas de IgE unidas a la superficie de las células efectoras para liberar varios mediadores broncoconstrictores, incluidos los cisteinil-leucotrienos (cys-LT) y PGD<sub>2</sub>. Las células epiteliales liberan el factor de células madre (SCF) que es importante para mantener los mastocitos de la mucosa en las vías respiratorias o en la superficie de la piel. Los alérgenos son procesados por las células dendríticas mieloides, que están condicionadas por la TSLP secretada por las células epiteliales y los mastocitos para liberar las quimiocinas CC-ligando de quimiocina 17 (CCL17) y CCL22, que actúan sobre el receptor de quimiocina CC4 (CCR4) para atraer células Th2 (Fig. 5) (Burks, 2020; R. Kaur & Chupp, 2019; Schatz & Rosenwasser, 2014).

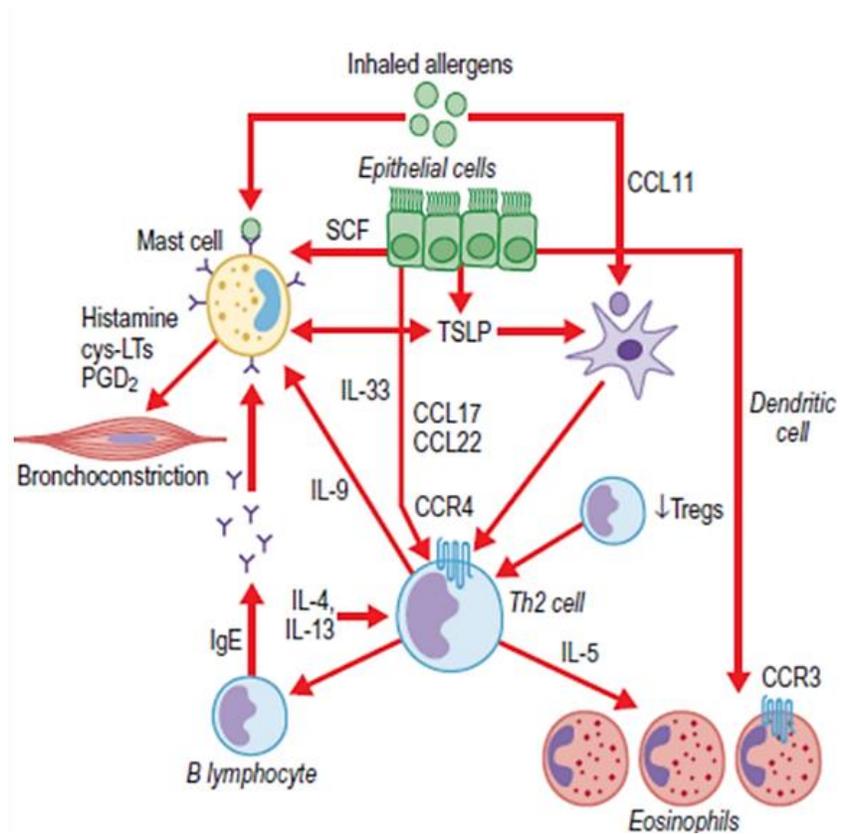


Figura 5. Broncoconstricción. Los alérgenos inhalados activan los mastocitos sensibilizados mediante el entrecruzamiento de las moléculas de IgE unidas a la superficie para liberar varios mediadores broncoconstrictores (cys-LT y PGD<sub>2</sub>). Los alérgenos son procesados por las células dendríticas mieloides. Las células Th2 liberan IL-4 e IL-13 (que estimulan a las células B para sintetizar IgE), IL-5 (que es necesaria para la inflamación eosinofílica) e IL-9 (que estimula la proliferación de mastocitos). Las células epiteliales liberan CCL11, que recluta eosinófilos a través de CCR3. Los pacientes con enfermedad alérgica pueden tener un defecto en las células T reguladoras (Treg), lo que puede favorecer una mayor activación de las células Th2 (Tomado de Burks, 2020).

### 1.5 Conjuntivitis alérgica.

La fisiopatología de la Conjuntivitis Alérgica se inicia tras la primera exposición del tejido conjuntival a alérgenos ambientales. Estos alérgenos secretan proteasas que activan los receptores activados por la proteasa para iniciar la interrupción de la función de barrera del epitelio conjuntival. Esta interrupción de la función de barrera permite el acceso de los alérgenos a las APC en el estroma conjuntival. La IgE específica del alérgeno se une al dominio similar a la inmunoglobulina de la cadena  $\alpha$  del receptor Fc $\epsilon$ RI en los mastocitos conjuntivales, dando como resultado la formación de un complejo IgE-Fc $\epsilon$ RI, lo que conduce al cebado de los mastocitos conjuntivales. Este proceso es la fase de sensibilización de la respuesta inmune alérgica (Labib & Chigbu, 2022).

La reexposición de los mastocitos conjuntivales al polen permite la formación de los complejos polivalentes IgE-FcεRI en los mastocitos conjuntivales cebados; dando como resultado la agregación de receptores que inicia una cascada de señalización. Esta activación culmina en la activación de proteínas de señalización como la tirosina quinasa Syk; la cual fosforila a LAT. PLCγ es fosforilada por LAT, y esto inicia un evento de cascada de señalización río abajo que IP3 y DAG.

La IP3 provoca movilización de calcio dentro de los mastocitos, lo que conduce a la activación y degranulación de los mastocitos conjuntivales con la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios. La IL-5 y moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1) expresadas por el epitelio conjuntival promueven el reclutamiento e infiltración de eosinófilos en la conjuntiva. Estos mediadores contribuyen al prurito ocular, inyección conjuntival y epifora característicos asociados con la enfermedad ocular alérgica. (Burks, 2020; Labib & Chigbu, 2022).

## 1.6 Pólenes.

El polen es uno de los factores causales más comunes de las enfermedades alérgicas descritas previamente. Los granos de polen son los gametofitos masculinos de las plantas que producen semillas. La dispersión de éste puede ser dada por aire (anemófilos), insectos (entomófilos) o por ambos (ambifilos) (Smith et al., 2014). Los factores ambientales que provocan que el polen libere su contenido alergénico en la atmósfera son la humedad ambiental elevada, la lluvia abundante y la interacción de los pólenes con los contaminantes. Los granos de polen son los portadores del material antigénico y son el principal responsable de las enfermedades alérgicas respiratorias. Los alérgenos más importantes son las proteínas o polipéptidos, aunque los polisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas también pueden actuar como alérgenos (Smith et al., 2014). La capacidad de los pólenes para inducir enfermedad depende de que posean grupos antigénicos específicos que provoquen respuestas de hipersensibilidad en el ser humano, así como de encontrarse en concentración suficiente en el aire, de tal modo que el nivel de exposición sea adecuado para evocar una respuesta inmunológica. Por otro lado, la respuesta individual de un sujeto a un alérgeno dependerá de múltiples factores inherentes a él mismo y al alérgeno: estado del sistema inmune, dosis de alérgeno, frecuencia y ruta de sensibilización, etcétera (Terán & Haselbarth-López, 2009).

Las gramíneas son la causa más importante de polinosis debido a su alergenicidad y extensa distribución, la cual constituye aproximadamente el 20 % de la superficie vegetal del mundo. El polen de los árboles es la segunda causa más frecuente de polinosis en todo el mundo. Los pólenes de árboles con mayor prevalencia y relevancia desde el punto de vista alergénico son: cupresáceas, fagáceas, oleáceas y betuláceas (Asam et al., 2015).

En general, los árboles se definen como plantas perennes leñosas con un solo tallo principal o que se sostienen por sí mismos y una copa más o menos definida. Los árboles alergénicos se pueden encontrar en casi todo el mundo, desde las zonas de clima templado de Europa, América del Norte y Asia hasta el área del Mediterráneo, África del Norte, partes de América del Sur, Sudáfrica, así como partes de Australia, mientras que en las regiones de clima tropical las alergias al polen de los árboles están prácticamente ausentes. Los árboles pertenecientes a los órdenes Fagales, Lamiales, Proteales y Pinales son reconocidos como las fuentes de alérgenos más importantes (Asam et al., 2015).

#### 1.6.1 Lamiales.

Dentro del orden Lamiales, solo la familia Oleaceae contiene especies de árboles alergénicos anemofilos. Las especies alergénicas de Lamiales son endémicas en vastas partes de Europa, pero también están dispersas en América del Norte, África, Asia y Australia. Dentro de las oleáceas, el subcomité de la OMS/IUIS (*International Union of Immunological Societies*) ha reconocido que el polen de cuatro especies de árboles contiene proteínas alergénicas, que son el fresno europeo (*Fraxinus excelsior*), el trueno (*Ligustrum vulgare*), el olivo (*Olea europea*) y la lila (*Syringa vulgaris*) (Asam et al., 2015; Wallner et al., 2013).

La reactividad de *Olea europea* parece estar clínicamente caracterizada por rinoconjuntivitis más que por asma bronquial, pero puede ocurrir un brote de crisis asmática durante una tormenta eléctrica en la temporada de polinización del olivo. El principal alérgeno del olivo es Ole e 1, la cual es una proteína de 145 aminoácidos que comparte una identidad de secuencia significativa (82,76 % de identidad) con todos los demás árboles relacionados pertenecientes a la familia de las Oleaceas (Fra e 1 de fresno, Lig v 1 de trueno y Syr v 1 de lila (Matricardi et al., 2016).

### 1.6.2 Epidemiología de Alergia al Polen.

La prevalencia de la polinosis se ha duplicado en las últimas dos décadas. A nivel mundial la tasa de sensibilización a los alérgenos del polen es alrededor del 40 %, y más de 400 millones de personas padecen síntomas de la rinitis alérgica causada por la polinosis (Pointner et al., 2020). Son responsables del 40 % de los casos de rinoconjuntivitis y del 27 % de los casos de asma (Gaspar-López et al., 2014).

En Austria se determinó una tasa de sensibilización al polen de fresno del 17.6 % entre las personas alérgicas al polen, mientras que el polen de fresno fue responsable del 4 % de sensibilización de los pacientes alérgicos de Estrasburgo (Asam et al., 2015).

Diversos estudios sugieren que incluso 50 % de los adultos residentes de la Ciudad de México pueden padecer de alergia respiratoria y que los pólenes de árboles, pastos y malezas constituyen una causa frecuente. En un estudio transversal y observacional llevado a cabo en Centro Médico Nacional Siglo XXI en los años 2007 a 2013, se realizaron pruebas cutáneas para pólenes de árboles, gramíneas y malezas en 672 pacientes que acudían a consulta de alergia. Se encontrando los siguientes porcentajes de positividad: malezas 56 %, árboles 33 % y gramíneas 11 %. Respecto a árboles se encontró un predominio con las familias Betulaceae, Fagaceae y Oleaceae, particularmente los géneros *Fraxinus* y *Quercus* con un 7.7 % y 6.5 % respectivamente (Gaspar-López et al., 2014).

Por otro lado, se realizó un estudio prospectivo en México en 2014, transversal a nivel nacional, el cual incluyó un total de 529 pacientes. Se realizaron pruebas de punción cutánea a los alérgenos más comunes y con síntomas de rinitis y/o conjuntivitis (de 2 a 68 años, edad media 21,8 años, 48,2 %). Mediante pruebas de punción cutánea (SPT) se encontró positividad principalmente para los ácaros, seguidos de pólenes de árboles (0,442, IC del 95 %: 0,40-0,48). El patrón de sensibilización concuerda en parte con la aerobiología de México que muestra altas concentraciones de polen de fresno en los meses de invierno (noviembre-febrero). En la Ciudad de México el fresno es aún más abundante, porque es el principal árbol utilizado en proyectos de reforestación (Larenas-Linnemann et al., 2014). En un estudio transversal llevado a cabo en el Hospital Universitario de Puebla en México en el año 2016, incluyó 173 pacientes, se determinó una positividad en pruebas cutáneas para *Fraxinus uhdei* del 5.20 % (Rojas-Méndez et al., 2017).

### 1.6.3 Alérgenos del Fresno.

Los fresnos, *Fraxinus sp.*, son árboles caducifolios de la zona templada del norte con miembros nativos de América del Norte, de los cuales 16 especies se encuentran en los Estados Unidos, 7 en México (Fig. 6) y 4 en Canadá. Se encuentra comúnmente en las tierras bajas de los valles de los ríos. Su madera es útil para pisos, muebles, equipos deportivos y mangos de herramientas (Asam et al., 2015; Weber, 2014). Es un árbol de tamaño mediano de rápido crecimiento de forma variable, de hasta 25 m de altura. Vive hasta unos 100 años, y es moderadamente tolerante a la sombra. Las hojas son pinnadamente opuestas, de 15-20 cm de largo, ovaladas a en forma de lanza, El polen se dispersa por el viento. Los árboles machos polinizan cada año, los árboles femeninos fructifican cada 3-5 años (Fig. 7).



Figura 6. Mapa de distribución de *Fraxinus uhdei* en México reportado por observaciones (Tomado de Fresno (*Fraxinus uhdei*), s. f.).



Figura 7. Árbol de Fresno. (*Fraxinus uhdei*) (Tomado de [viverosancarlos.com](http://viverosancarlos.com)).

La polinización comienza en enero en California y los estados del suroeste y centro-sur, en abril en el resto de los Estados Unidos y en mayo-junio en Canadá. Es considerado uno de los principales aeroalérgenos en México. *F. excelsior* es causante importante de polinosis en el sur de Europa y Oriente Medio. Su polen se ha identificado como causa de exacerbaciones del asma, al igual que el polvo de madera de fresno (Weber, 2014).

De acuerdo con un estudio de Calderón y colaboradores la polinización en México se da desde el mes de octubre hasta el mes de abril (Fig. 8). Aunque debido al calentamiento global, los periodos de floración se pueden extender.

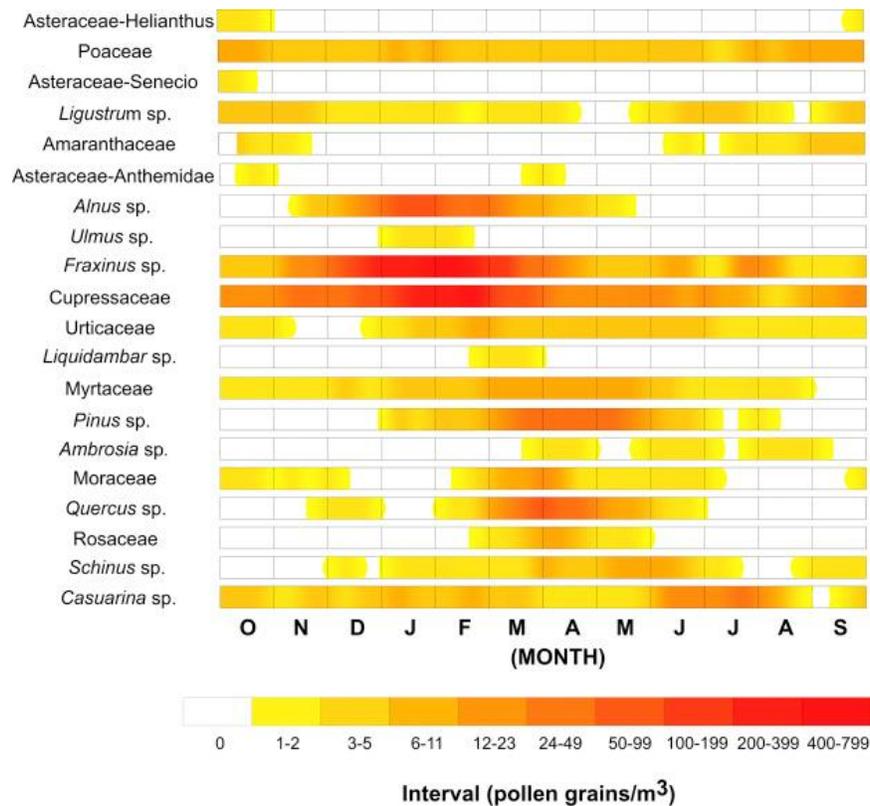


Figura 8. Calendario de polen de la delegación Miguel Hidalgo (en el parque de Chapultepec), Ciudad de México, de 2008 a 2016. (Tomado de Calderón-Ezquerro et al., 2018).

La IUIS sólo ha informado de un alérgeno del fresno europeo (Fra e 1) (*Allergen Search Results*, s. f.), la cual es una glicoproteína perteneciente a la familia de proteínas similares a Ole e 1 y su función es regular el crecimiento del tubo polínico. Es considerado un alérgeno mayor, pues el 57,5 % de los pacientes alérgicos a fresno mostraron unión de IgE sérica en Inmunotransferencia de extracto de polen de fresno (Barderas et al., 2005). Presenta una

identidad de secuencia de aminoácidos del 82 %, 88 % y 91 % con Syr v 1 de lila, Ole e 1 de olivo y Lig v de ligustre, respectivamente. Fra e 1 presenta una fuerte reactividad cruzada al Ole e 1 de olivo. Se ha definido que puede producirse una reacción cruzada si la homología entre dos o más alérgenos moleculares es >70 % (Ansotegui et al., 2020). La reactividad cruzada evaluada por la inhibición de RAST (ensayos de radioalergoabsorbencia) es fuerte entre los miembros de la familia Oleaceae. Entre el 75 % y el 86 % de las personas alérgicas al polen de fresno muestran reactividad a Fra e 1 (Asam et al., 2015; Barderas et al., 2005; *Fra e 1 Allergen Details*, s. f.; Weber, 2014).

## 1.7 Diagnóstico de alergia.

Actualmente, las pruebas de sensibilización a la IgE son la piedra angular de la evaluación diagnóstica en presuntas afecciones alérgicas. Para realizar un diagnóstico existen las pruebas *ex vivo* e *in vitro*.

### 1.7.1 Pruebas *ex vivo*.

Varios tipos de pruebas cutáneas se utilizan en el diagnóstico de alergias:

1. Prueba SPT: representa el primer nivel de enfoque para el diagnóstico de alergia tipo I. Es una prueba segura, tiene alta sensibilidad y buena especificidad cuando se realiza e interpreta correctamente. Una variante específica de las pruebas cutáneas de tipo I es la prueba de *prick to prick* con alérgenos nativos.
2. Prueba intradérmica (IDT): se puede utilizar para evaluar tanto la alergia inmediata mediada por IgE como la hipersensibilidad de tipo retardado, de acuerdo con el momento de la lectura. Tiene mayor sensibilidad y menor especificidad que la prueba SPT.
3. Prueba de parche: se utiliza para reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado, mediadas por células. No tiene relevancia para la alergia mediada por IgE.

La prueba de punción cutánea es la prueba de elección para el diagnóstico de alergia, debido a su rapidez, sencillez y bajo costo. Las SPT generalmente se aplican por razones prácticas en la superficie interna del antebrazo, pero otros sitios son igualmente efectivos. La fosa antecubital es la porción más reactiva del brazo, mientras que la muñeca es la menos reactiva. El lado cubital del brazo es más reactivo que el área radial. En los lactantes, la espalda es el sitio preferido para las SPT. Se recomienda que las pruebas no se coloquen a menos de 5 cm de la

muñeca y 3 cm de la fosa ante cubital. Las pruebas cutáneas no deben realizarse en sitios de la piel con dermatitis activa, dermatografismo y tatuajes. El envejecimiento de la piel y el daño solar afectarán la reactividad de la piel. La ubicación de cada gota alergénica se puede marcar con un bolígrafo o una rejilla de prueba. La solución alergénica colocada sobre la piel debe pincharse inmediatamente. El sitio de prueba seleccionado se limpia y desinfecta con alcohol y se deja secar. Después de marcar los sitios de la piel para colocar las gotas de extracto proteico con números, códigos o usar una plantilla. Los extractos de alérgenos se aplican a la piel, depositando una gota de extracto de alérgeno en la piel del antebrazo del paciente. El dispositivo de punción se pasa a través de la gota en un ángulo de 45-60° a la piel, logrando la penetración de pequeñas cantidades de extracto de alérgeno justo debajo de la epidermis. Las gotas deben colocarse a 2 cm o más de distancia entre sí para evitar mezclas o superposiciones y, por lo tanto, resultados falsos positivos. Si los mastocitos se sensibilizan con IgE específica en el tejido del paciente, la penetración del alérgeno provoca la liberación de histamina, lo que resulta en una respuesta de roncha (Fрати et al., 2018) (Fig. 9).



Figura 9. Pruebas cutáneas realizadas en paciente con rinitis alérgica. Se usó como control positivo (+) histamina y como control negativo (-) solución salina al 0.9 %. La roncha de fresno midió 13 mm en su diámetro más grande (círculo rojo), considerándose como prueba cutánea positiva al fresno. (Foto. Archivo clínico INER).

Debido a la variabilidad entre pacientes en la reactividad cutánea, es necesario incluir controles negativos y positivos al mismo tiempo que las pruebas de alérgenos en cada evaluación de prueba cutánea. La solución habitualmente usada como control positivo (fosfato de histamina) se utiliza a una concentración de 5,43 mmol/L o 2,7 mg/mL, la cual es equivalente a 1 mg/mL de histamina. Con el control negativo (solución salina o albúmina-salina sérica humana glicerina-salina al 50 %) también se puede producir una roncha, debido a la reactividad traumática inducida por el dispositivo de prueba cutánea, roncha puede tener un diámetro de 3 mm (Ansotegui et al., 2020; Frati et al., 2018).

Esta prueba es mínimamente invasiva y tiene la ventaja de poder utilizar múltiples alérgenos en poco tiempo, de 15 a 20 min. Existe una buena correlación (alrededor del 85-95 %) entre las pruebas cutáneas y las pruebas *in vitro*. A nivel mundial, las pruebas cutáneas son una excelente herramienta de diagnóstico, con un valor predictivo positivo del 95 %. Cuando se introduce un alérgeno específico a través de una lanceta en la piel de individuos alérgicos, los mastocitos dérmicos comienzan a degranularse principalmente debido al entrecruzamiento de la IgE alérgeno-específica unida a sus receptores de membrana. La degranulación conduce a la liberación inmediata de histamina y otros mediadores, induciendo una respuesta cutánea, clínicamente caracterizada por una roncha (a veces con pseudópodos) y eritema circundante que se puede medir para evaluar el grado de sensibilidad cutánea. Se requiere una prueba de con una roncha de al menos 3 mm de diámetro más que el control negativo realizado simultáneamente como prueba de la presencia de hipersensibilidad cutánea, indicativa de la presencia de IgE específica. Por lo tanto, las SPT representan un indicador sustituto de sensibilización alérgica sistémica (es decir, nariz, pulmones, ojos, intestino) a través de la presencia de reactividad cutánea a alérgenos específicos (Ansotegui et al., 2020). Sin embargo, la relevancia de dicha sensibilidad a los alérgenos siempre debe interpretarse cuidadosamente a la luz de la historia clínica, ya que la sensibilización y la alergia clínica pueden no coincidir. En cuanto a la seguridad, aunque los informes de reacciones sistémicas, y particularmente la anafilaxia son muy raros, se deben preferir las pruebas de IgE *in vitro* si surgen reacciones graves previas de la historia clínica de los pacientes (Frati et al., 2018).

### 1.7.2 Pruebas *in vitro*.

Hasta la fecha, los resultados obtenidos con métodos *in vitro* para determinación de IgE específica son comparables con los resultados de pruebas cutáneas (Ansotegui et al., 2020). El diagnóstico *in vitro* de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE es útil en la identificación del alérgeno o alérgenos causantes y, por lo general, implica diferentes procedimientos de laboratorio:

- 1) El ensayo total de IgE que no es específico y proporciona un panorama general (pues los niveles de IgE se pueden modificar por otro tipo de patologías, incluso algunas que no implican un fondo alérgico).
- 2) Los ensayos de IgE específicos séricos contra fuentes/moléculas de alérgenos son el enfoque de diagnóstico *in vitro* más utilizado. Se pueden realizar mediante una estrategia de un solo eje o multiplexado.
- 3) La prueba de activación de basófilos (BAT) es bastante específica, pero compleja de realizar y, por lo tanto, limitada a situaciones muy específicas (Ansotegui et al., 2020).

La detección de anticuerpos IgE específicos de alérgenos se utiliza para confirmar la sensibilización a un alérgeno, en apoyo de un diagnóstico basado en antecedentes de formas alérgicas de rinitis, asma, dermatitis, urticaria, angioedema, inflamación ocular, anafilaxia, alergia alimentaria y alergia a las picaduras de himenópteros (Hamilton et al., 2010).

La medición de la IgE específica que reconoce los epítomos alérgicos se puede lograr tanto mediante el uso de reactivos individuales como con un panel predefinido de una serie de moléculas que se probarán simultáneamente (Ansotegui et al., 2020).

Los reactivos de detección de IgE-Fc antihumanos generalmente son anticuerpos policlonales de conejo, cabra, oveja, caballo o monoclonales anti-IgE murinos (Ansotegui et al., 2020).

La mayoría de los análisis de sangre específicos de IgE son inmunoensayos que incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunoensayos enzimáticos fluorescentes (FEIA), ensayos quimioluminiscentes o RAST. Desde el 2010 el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) / Institutos Nacionales de Salud (NIH) han recomendado la interrupción del RAST como una herramienta de diagnóstico para la alergia en favor de ensayos más sensibles marcados con enzimas de fluorescencia, en los que un

anticuerpo fluorescente se une al IgE del paciente, y la cantidad de IgE presente se calcula a partir de la cantidad de fluorescencia. Sin embargo, la presencia de este anticuerpo sólo demuestra la sensibilización, no la alergia, siendo esta última la sensibilización en el contexto de los síntomas clínicos tras la exposición al alérgeno (Ansotegui et al., 2020).

### 1.7.3 Extractos alergénicos.

Los extractos alergénicos empleados en las pruebas diagnósticas antes descritas consisten en mezclas de componentes alergénicos (proteínas, glicoproteínas, polisacáridos) y no alergénicos (lípidos, sales, pigmentos, metabolitos) derivados de la fuente alergénica. Los alérgenos en general son principalmente proteínas o glicoproteínas, pero los carbohidratos u otros productos químicos hapténicos de bajo peso molecular, cuando se transforman en antígenos completos, también pueden inducir sensibilización alérgica (Ansotegui et al., 2020). Es muy importante para extractos derivados del polen verificar su identidad y pureza, así como evitar la contaminación cruzada de otros productos biológicos. El polen puede obtenerse ya sea por recolección en la naturaleza, de campos cultivados o invernaderos. La recolección se puede realizar por varios métodos, como aspirar o secar cabezales de flores seguidos de molienda. El polen se puede limpiar ya sea pasando a través de tamices de diferentes tamaños de malla o por flotación. Finalmente, los pólenes se secan en condiciones controladas y se almacenan en recipientes sellados a -20 °C. El nivel máximo de contaminación aceptada con polen de otras especies es del 1 % en número, y un máximo del 0,5 % de cualquier polen extraño. Los taxones de polen relacionados filogenéticamente y no filogenéticamente a menudo tienen un alto nivel de reactividad cruzada, por lo tanto, deben recibir la atención adecuada para garantizar que los materiales contengan alérgenos no redundantes clínicamente relevantes, y que los extractos de polen se preparen a partir de los géneros y/o especies apropiados. Un desafío importante está asociado con el hecho de que tanto los factores genéticos como los ambientales son responsables de la composición alergénica del polen. Aunque es posible abordar y monitorear algunas de estas variables, no es posible controlar todas ellas, en particular, el clima, contaminación y la composición del suelo donde crecen las plantas individuales y se recolecta el polen (Ansotegui et al., 2020; Codina et al., 2015).

En algunos casos, los extractos alergénicos se preparan a partir de polen derivado de plantas transgénicas debido a la dificultad que implica obtener cantidades suficientes de polen derivado de plantas silvestres (Codina et al., 2015).

La recolección de polen requiere un alto nivel de especialización. Muchas especies de polen a menudo necesitan ser recolectadas en intervalos de tiempo cortos y en momentos específicos del día debido a las rápidas fluctuaciones de los parámetros ambientales. El polen debe estar desprovisto de restos de flores y plantas, con un límite del 5 % en peso. Los pólenes pueden mostrar una gran variación en la composición cuantitativa dependiendo de la temporada y la ubicación del crecimiento, y para lograr una composición relativamente constante, las cosechas de diferentes años deben, después de una caracterización exhaustiva *in vitro*, agruparse para la producción de extractos de alérgenos (Larsen & Dreborg, 2019). En Estados Unidos el proceso de fabricación asociado con la producción de extractos de alérgenos asegura la consistencia y la calidad de dichos productos. Sin embargo, los extractos no estandarizados no están sujetos a medidas de calidad similares. Pudiendo existir una gran variación de lote a lote en el contenido alergénico, atribuida en parte al contenido alergénico de las materias primas de polen utilizadas para producirlos. Los extractos de diferentes fabricantes e incluso del mismo fabricante, obtenidos en diferentes momentos, a menudo difieren en valor diagnóstico y su uso como tratamiento (Codina et al., 2015; Wallner et al., 2013).

Los extractos de polen de fresno actualmente disponibles para el diagnóstico y la inmunoterapia no se han estandarizado. La necesidad de estandarización de los extractos alergénicos utilizados para el diagnóstico o tratamiento se ha reconocido desde los primeros días de la inmunoterapia con alérgenos. El propósito de dicha estandarización es mantener constante la potencia de los extractos de alérgenos, así como minimizar la variación de composición de lote a lote. Debido a la complejidad de los extractos de alérgenos, no es posible medir todas las moléculas alergénicas (Holzhauser et al., 2020; Hrabina et al., 2007).

En general, las pruebas cutáneas con alérgenos sintetizados son altamente específicas y evitan la creación de falsos positivos mediante la eliminación de alérgenos interreactivos. Idealmente, los extractos alergénicos utilizados para el diagnóstico deben estandarizarse, tanto *in vivo* como *in vitro*. La estandarización facilita la comparación de extractos de diferentes

fabricantes, la variabilidad de lote a lote y la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados de las pruebas (Codina et al., 2015; Holzhauser et al., 2020).

Los extractos alérgicos están regulados por el Centro de Evaluación e Investigación de Biológicos (CBER). La estandarización de alérgenos comprende dos componentes importantes: la selección de una preparación de referencia de un extracto alérgico y realización de un ensayo *in vitro* para comparar los productos fabricados con la preparación de referencia. Para seleccionar una preparación de referencia e identificar la potencia de un extracto alérgico, CBER desarrolló un método que mide el tamaño del eritema en respuesta a la aplicación de inyecciones intradérmicas de diluciones en serie de extractos en la piel de personas altamente alérgicas. Tal método es llamado *Intradermal Dilution for 50 mm sum of Erythema determines the bioequivalent ALLergy units* (ID50EAL), en el cual los extractos alérgicos se evalúan en sujetos que son máximamente reactivos al extracto alérgico respectivo. Cada sujeto se prueba con una serie de 3 diluciones de dicho extracto. Después de 15 minutos, se determina la suma de los diámetros ortogonales del eritema ( $\Sigma E$ ). La D50 de un extracto se determina a partir de la media de las mediciones de D50 de al menos 15 individuos alérgicos. La medida de potencia de la prueba ID50EAL es la unidad alérgica bioequivalente (BAU), a los extractos con un D50 medio se les asigna arbitrariamente el valor de 100 000 BAU/ml. Una vez que la potencia de un lote fabricado de extracto se asigna, se considera el extracto de "referencia", a partir del cual se determinan las potencias de los extractos de "prueba" de la misma fuente (Burks, 2020).

La unión alérgeno-IgE implica la interacción de superficies moleculares de alérgenos y anticuerpos IgE que tienen contornos que se ajustan exactamente entre sí. Debido a que la estructura de la superficie molecular del alérgeno y, por lo tanto, los epítomos de unión a IgE son vulnerables a la desnaturalización de proteínas, los procedimientos utilizados para la preparación y el almacenamiento de extractos/vacunas alérgicas deben evitar los disolventes orgánicos, las temperaturas elevadas y las condiciones extremas de pH e iónicas. La extracción debe realizarse en condiciones que se asemejen a las condiciones fisiológicas de las vías respiratorias humanas (es decir, pH y fuerza iónica) y suprimiendo la posible degradación proteolítica y el crecimiento microbiano. El tiempo óptimo de extracción es siempre un compromiso entre el rendimiento y la degradación/desnaturalización de los alérgenos, y se debe prestar especial atención al hecho de que se liberan diferentes alérgenos con diferentes

cinéticas. En general, el tiempo de procesamiento debe minimizarse y la extracción debe realizarse a temperatura baja (Holzhauser et al., 2020; Larsen & Dreborg, 2019).

El material no antigénico de bajo peso molecular, es decir, por debajo de 5000 Da, debe eliminarse del extracto mediante diálisis, ultrafiltración o cromatografía de exclusión de tamaño. Debe demostrarse que cualquier sustancia excluida del producto final no es alérgica. El procedimiento de producción debe incluir procedimientos para medir y excluir umbrales por debajo de los definidos para toxinas conocidas, partículas virales e histamina libre u otras sustancias fisiológicamente activas (Larsen & Dreborg, 2019).

El extracto final debe almacenarse en condiciones que impidan el deterioro de la actividad alérgica, ya sea mediante la liofilización del extracto o mediante el almacenamiento a bajas temperaturas (es decir, -20 °C a -80 °C), posiblemente en presencia de agentes estabilizadores, como glicerol al 50 %, proteínas no alérgicas (por ejemplo, albúmina sérica humana certificada) u otros estabilizadores (Larsen & Dreborg, 2019).

#### 1.7.3.1 Síntesis de alérgenos recombinantes.

Los alérgenos recombinantes son una excelente alternativa para diagnosticar y tratar enfermedades alérgicas de una manera mucho más específica (Codina et al., 2015). Para la expresión de proteínas recombinantes se emplean generalmente bacterias, aunque también levaduras y plantas (Chhetri et al., 2015).

Además de emplear a los alérgenos recombinante en diagnóstico y tratamiento, también se puede usar su información estructural, junto con los datos de reactividad cruzada de IgE, para predecir epítomos conformacionales. Estos epítomos predichos ofrecen un punto de partida útil para introducir mutaciones o cambios estructurales en un esfuerzo por crear derivados de alérgenos como moléculas para el tratamiento de la alergia (Holzhauser et al., 2020; Tscheppe & Breiteneder, 2017; Wallner et al., 2013).

La expresión de proteínas se logra mediante un sistema de expresión recombinante. Se hace referencia a expresión recombinante debido a que la proteína de interés generalmente se expresa con otros elementos peptídicos que pueden ayudar a su expresión y purificación. Se puede amplificar la secuencia codificante del alérgeno a partir de la síntesis del ADN complementario (ADNc) obtenido por transcripción reversa del ARN mensajero. La secuencia

codificante se introduce en las células huésped procariontas o eucariotas (por ejemplo, *Escherichia coli* o levaduras) por medio de vectores genéticos como los plásmidos, donde se expresan por el aparato biosintético de la célula huésped. El proceso de expresión es seguido, en su mayoría, por la purificación cromatográfica y la caracterización fisicoquímica e inmunológica del alérgeno expresado. El nivel de caracterización depende del uso final de la proteína (Baeshen et al., 2015; Holzhauser et al., 2020; Wingfield, 2015).

### 1.7.3.2 *E. coli*.

Para muchos investigadores la elección inicial para expresar proteínas es a menudo *Escherichia coli*, esto se debe a factores tales como: la facilidad de manipulación genética, la diversidad de plásmidos de expresión y la facilidad de crecimiento (Baeshen et al., 2015; Wingfield, 2015). Los genes optimizados en el uso de codones a menudo aumentan los niveles de producción y también pueden prevenir la terminación prematura del polipéptido alargado. Los codones raros juegan un papel crucial en la regulación de la producción de proteínas y en el plegamiento de proteínas. Por ejemplo, plantas tiene un uso distinto de codones que el empleado en bacterias. La única desventaja es que *E. coli* no puede agregar modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, la fosforilación y el procesamiento proteolítico, lo que limita su uso para la producción de biofarmacéuticos recombinantes ligeramente complejos (Baeshen et al., 2015).

Cada aminoácido está codificado por más de un codón y cada organismo tiene su propia preferencia en el uso de los 61 codones disponibles. Los genes altamente expresados tienden a contener codones para los cuales la célula tiene abundante ARN de transferencia (ARNt), mientras que los genes que se expresan a niveles bajos tienden a incluir codones raros. Esto se vuelve un problema cuando se quieren expresar proteínas de organismos tan distantes filogenéticamente, como es el caso de expresar proteínas de plantas en bacterias. Para eludir este problema se utilizan dos estrategias alternativas: Un enfoque es la construcción de un "gen sintético" en el que la mayoría de los codones se han sido reemplazados por los más utilizados en *E. coli*. Otra alternativa es emplear cepas de bacterias que puedan expresar ARNt de estos codones raros. Un ejemplo de tales cepas es la cepa *E. coli* Rosetta (Novagen, US) que lleva genes de ARNt para los codones raros AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA.

La cepa más usada en expresión proteica es la *E. coli* BL21 (DE3), la cual fue generada por Studier y Moffat (Lebendiker & Danieli, 2014). Esta cepa lleva una copia de la polimerasa del

fago T7 (T7RNAP) bajo el control del promotor Lac UV5. Aunque otros promotores como el *lac*, *tac* y *trc* son reconocidos por esta cepa de *E. coli* y por lo tanto se pueden vectores con distintos promotores (J. Kaur et al., 2018). El promotor *lac* opera bajo los mismos mecanismos que el operón de lactosa, es necesario para el transporte y metabolismo de la lactosa en *E. coli*. En el promotor *lac* en ausencia de lactosa un represor se posiciona en el promotor para inhibir la transcripción; pero cuando existe lactosa en el medio, ésta se une al represor lo que permite la transcripción de genes ubicados río abajo del promotor *lac* (J. Kaur et al., 2018). Río abajo del promotor es donde se clona el gen de interés a expresar, pero es necesario agregar lactosa o un análogo de ella para poder inducir su expresión

### 1.7.3.3 Vectores de expresión en bacterias.

La secuencia que codifica para la proteína de interés generalmente se clona en un plásmido de expresión. El plásmido debe contener al menos un promotor y una región de iniciación de la traducción para dirigir la expresión de la secuencia codificante, un marcador seleccionable y elementos de replicación. Además, el vector puede contener otros elementos genéticos para facilitar la detección, el catión purificado o la solubilización de la proteína, como secuencias que codifican para etiquetas de afinidad (Rosano et al., 2019). Los primeros pasos para la expresión exitosa de la proteína recombinante comienzan con la clonación del gen de interés en un vector de expresión que contiene un promotor inducible. La regulación de la expresión está generalmente dada al emplear un inductor análogo a la lactosa como el isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). La producción de proteínas comienza con la adición del inductor IPTG. Es un reactivo químico que imita a la aolactosa, la cual interactúa con el represor, lo que permita que la polimerasa se posiciones en el promotor e inicie la transcripción.

Dentro de las células de *E. coli* transformadas, sin la presencia de IPTG Lacl se une al sitio de LacO. La unión de Lacl a este sitio impide que la ARN polimerasa T7 inicie la transcripción, en consecuencia, no hay producción de la proteína. Cuando IPTG está presente en el medio, entrará en las células y eliminará Lacl del sitio de LacO, como resultado la ARN polimerasa T7 se une al promotor e inicia la transcripción del gen. Ajustar la concentración de IPTG ayuda a reducir la expresión anticipada, lo cual ayuda mucho a expresar proteínas que pueden ser tóxicas (Figura 10) (Martin Katharine, s. f.).

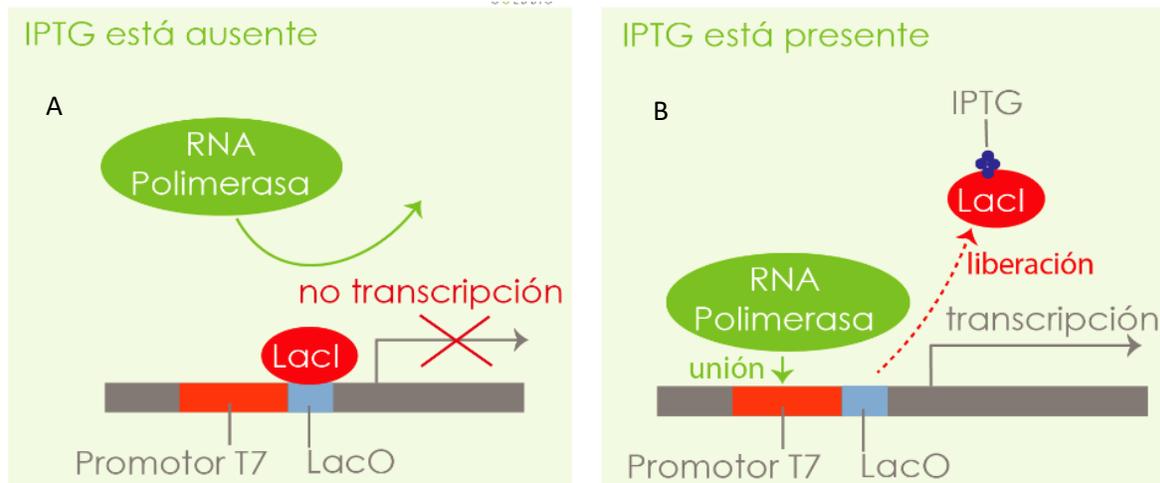


Figura 10. Inducción con IPTG. A En las células de *E. coli* transformadas, sin la presencia de IPTG, LacI se une al sitio de LacO. La unión de LacI a este sitio impide que la ARN polimerasa T7 inicie la transcripción de su gen de interés. B Cuando IPTG está presente en el medio, entrará en las células y eliminará LacI del sitio de LacO. Como resultado, la ARN polimerasa T7 se une al promotor T7 e inicia la transcripción del gen. Eventualmente, conduce a la síntesis de su proteína de interés. (Tomado de Martin Katharine, s. f.)

Se ha visto que emplear etanol en los cultivos para expresión de proteínas ayuda mucho a evitar que las proteínas se congloren y se vayan a cuerpos de inclusión debido a la pérdida de solubilidad, lo que dificulta su purificación. El etanol es una molécula anfipática y puede afectar el entorno celular de la célula en gran medida al realizar cambios en la fluidez de la membrana, el transporte de membrana, la composición lipídica de la membrana, el ensamblaje de proteínas de membrana. Chhetri y colaboradores encontraron que usando etanol al 3 % se mejora la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Chhetri et al., 2015).

Comúnmente los plásmidos contienen genes que confieren resistencia a los antibióticos. El mantenimiento del plásmido se garantiza mediante la inclusión de un marcador de selección. Bajo la presión de selección, sólo sobreviven las células que contienen el plásmido. En las cepas productoras de proteínas, la acumulación de la proteína heteróloga causa una carga metabólica y las células no productoras eventualmente superan al cultivo, lo que resulta en una disminución del rendimiento con el tiempo. La suplementación con antibióticos es simple, rentable y conveniente y es, con mucho, la estrategia más común para la síntesis de proteínas a gran escala de laboratorio (Rosano et al., 2019).

Muchos vectores de expresión comerciales permiten la fusión a la proteína recombinante de epítopes para su detección y purificación empleando anticuerpos comerciales (por ejemplo, anti-His, anti-FLAG, etiqueta anti-StrepII). Además, las etiquetas pueden unirse a sus sustratos o cofactores afines cuando se inmovilizan en resinas, lo que permite la purificación de proteínas mediante cromatografía alta afinidad. Además, algunas proteínas de fusión, también llamadas FLAG, tienen propiedades que mejoran la solubilidad, lo que aumenta el rendimiento de la proteína soluble y ayudan a su purificación. Los ejemplos típicos incluyen la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa (MBP) y los miembros pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO) (Baeshen et al., 2015; Rosano et al., 2019).

El MBP es el potenciador de solubilidad más estudiado, y la evidencia acumulada sugiere que sirve como un participante pasivo en el proceso de plegamiento; actúa como estabilizador de proteínas diana parcialmente plegadas, hasta que se produce un plegamiento espontáneo o mediado por chaperonas. Existen columnas que tienen afinidad a MBP lo que además facilita su purificación. A pesar del considerable tamaño de MBP (44 kDa), su alto nivel de expresión, combinado con sus eficientes opciones de purificación lo convierte en un candidato adecuado para resolver una amplia gama de problemas de agregación. MBP es adecuado para etiquetar proteínas relativamente más pequeñas (hasta alrededor de 40 kDa) porque la maquinaria bacteriana es menos eficiente cuando se producen proteínas grandes (más de 90 kDa), y esto tiende a resultar en una baja productividad y se generan formas de proteínas parcialmente truncadas (Baeshen et al., 2015).

Generalmente se emplean secuencias de proteasas para poder separar a los elementos de la proteína heteróloga de la proteína de interés. La estricta especificidad de las proteasas virales las convierte en herramientas atractivas para eliminar dichos elementos. La proteasa de inclusión nuclear del virus asociado al tabaco (TEV) es probablemente la enzima mejor caracterizada de este tipo. La proteasa TEV reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ/G con alta eficiencia y hace el corte entre los aminoácidos Q y G. Su estricta especificidad de secuencia, facilidad de producción y capacidad para tolerar una variedad de residuos en la posición P1' de su sitio de reconocimiento han contribuido a su popularidad como reactivo endoproteolítico (Raran-Kurussi et al., 2017).

A pesar de las ventajas obvias del uso de proteínas de fusión, se deben enfatizar tres inconvenientes principales: debido al alto costo del proceso de eliminación de etiquetas y los pasos de purificación extendidos necesarios para evitar el riesgo de contaminar las preparaciones de proteínas con un producto parcialmente escindido. La mayoría de las proteasas dejan unos pocos aminoácidos adicionales en el extremo N de la proteína fusionada después de la escisión. Esto puede interferir con la actividad de las proteínas, la inmunogenicidad y otras propiedades. El principal inconveniente de la escisión de proteínas de fusión es que la escisión a menudo va seguida de la pérdida de solubilidad de la proteína objetivo (Baeshen et al., 2015).

#### 1.7.3.4 Antecedentes de clonación de Fra e 1.

Barderas y colaboradores en 2005 realizaron la amplificación mediante PCR usando RNA de polen para clonar Fra e 1. El alérgeno recombinante se expresó en la levadura *Pichia pastoris*, y se utilizó en pruebas de inmunohistoquímica, ELISA, liberación de histamina y en pruebas de punción cutánea. Se utilizaron sueros y células sanguíneas de pacientes sensibilizados al polen de fresno, así como anticuerpos anti-Ole e 1 monoclonales y policlonales (Barderas et al., 2005).

La diferencia más significativa entre nFra e 1 (nativo) y rFra e 1 (recombinante) se encontró en los glicanos, debido a la maquinaria de glicosilación diferencial de la célula que realiza la biosíntesis. La levadura *P. pastoris* produce principalmente N-glicanos con alto contenido de manosa, el tejido polínico también origina glicanos complejos e híbridos que contienen residuos de fucosa y xilosa. Esta diferencia puede ser importante para la capacidad de unión a IgE de las glicoproteínas. De hecho, se ha informado que el oligosacárido de Ole e 1 contiene un epítipo alérgico relevante. Sin embargo, las fracciones de glicanos de *Pla I 1* (Plantaginaceae) y *Che a 1* (Chenopodiaceae); miembros de la familia Ole e 1, no parecen tener un papel en la unión de estos alérgenos a los anticuerpos IgE. La relevancia alérgica de la fracción de carbohidratos en Fra e 1 podría evaluarse mediante ensayos de inhibición realizados con nFra e 1 y rFra e 1 (Barderas et al., 2006). Sin embargo, pese a la falta de todas las modificaciones post-traduccionales en rFra e 1, hubo un reconocimiento por parte de la IgE de pacientes sensibles. Sintetizar Fra e 1 empleando levaduras lo hace menos eficiente y más laborioso que hacerlo empleando bacterias.

## 1.8 Tratamiento de alergia al fresno.

Una vez que se ha establecido el diagnóstico y se han identificado los alérgenos relevantes, se requieren tratamientos específicos, incluidos medicamentos, medidas de control ambiental y/o inmunoterapia con alérgenos (AIT) para lograr resultados óptimos a largo plazo (Ansotegui et al., 2020; Wallner et al., 2013).

Durante casi un siglo, la inmunoterapia alérgeno-específica se ha utilizado como una terapia desensibilizante para enfermedades alérgicas, implica la administración repetida del alérgeno sensibilizante (generalmente vía subcutánea o sublingual). La inducción de un estado tolerante a los alérgenos define la persistencia de la eficacia después del término, lo que implica una respuesta de células T y B de memoria específica de un alérgeno alterado (M. Akdis, 2009).

El uso de alérgenos recombinantes de tipo silvestre ha demostrado ser clínicamente efectivo, sin embargo, los efectos secundarios inducidos por el tratamiento representan un problema importante. Por lo tanto, se ha propuesto reemplazar los alérgenos de tipo silvestre con hipoalérgenos recombinantes para inmunoterapia. Niederberger *et al.* realizó un ensayo aleatorizado multicéntrico, controlado con placebo, doble ciego, de grupos paralelos, durante un período de 12 meses que incluyó a 124 sujetos alérgicos al polen de abedul utilizando una formulación de dos fragmentos hipoalergénicos de Bet v 1 o un trímero de Bet v 1, mostrando una alergenicidad reducida. El tratamiento activo condujo a una inducción significativa de anticuerpos IgG específicos de Bet v 1 (principalmente IgG1, IgG2 e IgG4), que tuvieron un efecto de bloqueo sobre la liberación de mediadores inducidos por alérgenos. En una evaluación de seguimiento del estudio, se analizó la sensibilidad nasal y cutánea antes y después del tratamiento, mostrando un aumento de tolerancia en las pruebas de provocación nasal, sin embargo, la mejoría no fue estadísticamente significativa y se determinaron hallazgos similares en las pruebas cuantitativas de punción cutánea (Wallner et al., 2013).

El poder aislar el alérgeno de interés de forma nativa conlleva dificultades técnicas y requiere de una gran cantidad de polen para poder aislar mediante fraccionamiento molecular alérgenos de interés. Por lo cual, nosotros proponemos expresar Fra e 1 empleando bacterias, con la finalidad de validar su reactividad antes sueros de pacientes alérgicos. No descartamos emplearla este alérgeno recombinante en tratamiento y diagnóstico.

## 2 Planteamiento del problema.

El uso de los extractos comerciales para diagnóstico y tratamiento de alergia al fresno, el cual es el árbol con mayor tasa de sensibilización en la ciudad de México (Pavón-Romero et al., 2022), se lleva a cabo mediante extractos alergénicos no estandarizados. Esto se refleja en la posibilidad de obtener resultados falsos positivos, pues existe alto riesgo de sensibilización cruzada con otras Oleaceas, la forma de obtener un diagnóstico más preciso es realizar pruebas *in vitro*, con el fin de identificar el alérgeno específico que produce los síntomas alérgicos. Se ha expresado anteriormente Fra e 1 en levadura con un resultado no tan eficiente. Por lo que se requiere mejorar dicha metodología de expresión con el fin de obtener Fra e 1 de una forma más eficiente y rápida, con el fin de usar el mismo para pruebas diagnósticas y con fines terapéuticos.

## 3 Justificación.

Para diagnóstico y tratamiento se emplean generalmente extractos proteicos totales, que contienen proteínas no bien caracterizadas, por lo que el uso de alérgenos recombinantes es una alternativa sin las implicaciones de producir nuevas sensibilizaciones o hacer diagnósticos imprecisos en los pacientes.

## 4 Hipótesis.

El alérgeno recombinante de Fra e 1, expresado en *E. coli*, será reconocido por el suero de pacientes sensibles.

## 5 Objetivos.

### 5.1 Objetivo general.

- Expresar el alérgeno de polen de fresno Fra e 1 en *E. coli* BL21 (DE3) y determinar su reconocimiento por pruebas inmunohistoquímicas.

### 5.2 Objetivos particulares.

- Seleccionar un vector para expresar Fra e 1 en *E. coli* BL21 (DE3).
- Expresar y purificar la proteína recombinante Fra e 1.
- Comprobar su actividad alérgica frente a sueros de pacientes sensibilizados.

## 6 Metodología.

### 6.1 Tipo y diseño de estudio.

Descriptivo, experimental, transversal, prospectivo.

Casos y controles.

### 6.2 Población.

Se tomó suero proveniente de 3 pacientes alérgicos/sensibilizados a fresno y trueno, 1 paciente sensibilizado a fresno/olivo, la sensibilidad se comprobó mediante pruebas SPT. Y como control negativo se usó suero de 1 paciente sin sensibilización a Oleáceas. Las muestras se recolectaron en la clínica de alergia e inmunología del Instituto Nacional de enfermedades respiratorias conforme a lo establecido en los protocolos. Al momento de la toma de suero y realización de pruebas cutáneas estos pacientes no se encontraban bajo tratamiento con ninguno de los siguientes fármacos: antihistamínicos, corticosteroides o inmunoterapia.

Para la realización de pruebas de punción cutánea se colocó una gota de extracto alergénico comercial (ALK) en cara anterior del brazo y se realizó una punción de la piel con una lanceta. Se consideró como una sensibilización positiva a aquellas ronchas  $\geq 3$  mm a los 20 minutos respecto al control negativo (solución salina). Y posteriormente se tomó muestra sanguínea con el fin de obtener el suero tanto de los pacientes sensibilizados como de los no sensibilizados a Oleáceas. El protocolo fue aprobado por los comités de investigación y ética humana del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 1983) y fue consistente con las Guías de Buena Práctica Clínica.

### 6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión.

1. Sueros de pacientes sensibilizados al polen de *Fraxinus excelsior* y *Ligustrum lucidum*.
2. Sueros de pacientes sensibilizados al polen de *Fraxinus excelsior*.
3. Sueros de pacientes sin cuadro clínico de alergia y SPT no reactivas..

Criterios de exclusión.

1. Sueros de pacientes en tratamiento con antihistamínico, corticoesteroides y/o inmunoterapia alérgeno-específica.

Criterios de eliminación:

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

#### 6.4 Identificación del gen de Fra e 1 y su síntesis.

Se consultó la secuencia codificante de Fra e 1 en las bases de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information), locus: AY377127.1. De las 3 isoformas reportadas se seleccionó la isoforma 1.0101 para trabajar con ella, debido a que las diferencias son mínimas entre ellas y fue la primera en ser reportada. Se seleccionó el vector de expresión en bacterias pMAL-c4x, el cual contiene un promotor inducible con IPTG, la proteína de interés llevará un tag (bandera) de MPB, el cual ayuda a la solubilización, un sitio de corte para la enzima Factor Xa y la proteasa TEV. Así mismo, se incluyen secuencias de histidina (6x his) para poder purificar empleando columnas de afinidad a níquel (IMAC) (Fig. 11).



Figura 11. Componentes de la proteína heteróloga clonado en el vector de expresión de bacteria pMAL-c4x.

Este vector cuenta con el gen de resistencia a ampicilina. El servicio de síntesis lo realizó la empresa GeneScript, a la cual se le dieron indicación de los sitios extras de clonación y demás elementos necesarios que no incluye de manera canónica el vector. También se solicitó la optimización de uso de codones para la correcta expresión en bacterias.

#### 6.5 Preparación de células químicamente competentes *E. Coli* BL21 DE3.

Se seleccionó la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3). Se prepararon células competentes para utilizarlas en transformación por choque térmico. Se puso un cultivo en cajas Petri con medio LB agar (Peptona de caseína 1 %, extracto de levadura 0.5 % y NaCl 0.5 %, ajustando a pH 7.5) a 37 °C durante toda la noche. Se seleccionó 1 colonia bacteriana y se inoculó en 10 mL de medio LB, incubándose a 37 °C durante toda la noche (cultivo iniciador). Se inoculó 1 mL

de cultivo iniciador en 200 mL de LB en agitación hasta alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de entre 0.35-0.40. Se colocó el cultivo 10 min. en hielo. Se centrifugaron las células 10 min. a  $2300 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se resuspendió el pellet en 40 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM enfriado en hielo y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó como se hizo previamente y se resuspendió el pellet en 40 mL de  $\text{CaCl}_2$  85 mM en glicerol al 10 %. Se centrifugaron las células 15 min. a  $2300 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se resuspendió el pellet en 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  85 mM con glicerol al 10 %. Se hicieron alícuotas de 600  $\mu\text{L}$  en tubos Eppendorf previamente enfriados en hielo e inmediatamente se congelaron sumergiéndolos en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 6.6 Transformación del vector en células *E. Coli* BL21 (DE3).

El vector pMAL-c4x-Fra e 1 se transformó en células competentes *E. Coli* BL21 (DE3). Para esto, 1.5  $\mu\text{L}$  del vector se transfirió a un tubo Eppendorf y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de células competentes, se incubaron 20 min. a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente se dio un choque térmico durante 30 segundos a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después los tubos se dejaron en hielo por 2 min. se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1% y Glucosa 2%) y se incubó durante 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación. Las células fueron centrifugadas a  $3000 \times g$  por 1 min. y la pastilla fue resuspendida en 100  $\mu\text{L}$  de medio LB y sembrada en cajas Petri con medio LB agar y ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las células se dejaron crecer durante toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se tomaron 8 colonias y se pusieron a crecer toda la noche en 8 mL de medio LB y ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación. Al día siguiente se tomaron 600  $\mu\text{L}$  del cultivo previo y se colocaron con 600  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50 % y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , esto con la finalidad de tener un stock congelado de las clonas.

### 6.7 Extracción proteica total de *E. Coli*.

Se realizó la extracción del plásmido (vector) de cada una de las clonas empleando un kit de extracción de plásmidos (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de DNA con un equipo Nanodrop. Se eligieron las 4 clonas al azar (Clonas 2, 4, 6 y 8) y se corrieron 400 ng en un gel de agarosa al 1 %. Comprobando en todas ellas la presencia de DNA de un peso molecular aproximado de 7.2 Kb. Se eligieron 2 clonas

(Clona 2 y 8) y se mandaron a secuenciar al Centro de Servicios Genómicos del LANGEBIO, Irapuato Gto.

### 6.8 Inducción proteica.

Se preparó un cultivo con la clona 8 en 3 mL de LB y 3  $\mu$ L de ampicilina a 37 °C en agitación, se dejó crecer durante toda la noche (12-16 horas de crecimiento). Al día siguiente se tomó 26  $\mu$ L del cultivo anterior y se inoculó 8 mL de cultivo con medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/mL), se dejó crecer a 37 °C en agitación constante y a las 4 horas,  $DO_{600}$  =0.4-0.7, se agregó IPTG (GoldBio) a una concentración final de 1 mM. Se creció por 4 hrs a 37 °C en agitación. Se centrifugaron las células 5 min. a 4600 x g a 4 °C y se resguardó la pastilla a -70 °C.

### 6.9 Lisis celular.

Se resuspendió la pastilla con las bacterias en 1.28 mL de buffer de lisis (960  $\mu$ L PBS 1x, 320  $\mu$ L de SDS 10 %) y se procedió a calentar durante 5 min. a 95 °C. Se centrifugó por 5 min a 4600 x g a 4 °C, se pasó el sobrenadante a un tubo Falcón de 15 mL nuevo y se agregaron 5 mL de acetona fría y se almacenó a -20 °C por 30 min. con el fin de precipitar las proteínas. Se centrifugó de nuevo y se desechó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 mL de acetona al 80%. Se procedió a secar la pastilla por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 600  $\mu$ L de Urea 8 M, se resguardó la pastilla a -70 °C.

### 6.10 Purificación proteica.

La purificación proteica se realizó con columnas IMAC (Zymo Research) conforme las recomendaciones del fabricante. Se usaron 4 cultivos de 8 mL cada uno para hacer una purificación en la columna. Únicamente se hizo una modificación, la cual consistió en agregar 1 vol. del buffer His-Binding a la muestra antes de pasar por la resina. Finalmente se procedió a realizar la elución con 200  $\mu$ L Elution Buffer, se centrifugó finalmente 2 min. a 800 x g a 4 °C, se repitió la elución, teniendo en total 400  $\mu$ L.

### 6.11 Desalación y concentración con columnas AMICON y digestión con proteasa TEV.

La muestra se pasó por una columna AMICON 3K (Millipore) con la finalidad de concentrar y eliminar las sales del buffer de elución, las cuales no son compatibles con la digestión de la proteasa TEV. Se hicieron 3 lavados con 300  $\mu$ L de agua ultrapura estéril, se centrifugó entre cada lavado a velocidad máxima a 4 °C por 15 min, dejando la muestra en 100  $\mu$ L de volumen final. Se tomaron 45  $\mu$ L de la

muestra y se agregó 5 µL de Buffer TEV + 1 µL de TEV Proteasa (New England Biolab) y se dejó incubar a 4 °C por 24 horas. La muestra ya digerida se pasó a una columna AMICON 3K lavando 3 veces con 300 µL de agua ultrapura estéril. Se centrifugó a velocidad máxima a 4 °C por 15 min, dejando un volumen final de aproximadamente 100 µL, la muestra desalada se almacenó a -70 °C.

### 6.12 Electroforesis de proteínas.

La electroforesis en gel de Dodecil Sulfato de Sodio-Poliacrilamida (SDS-PAGE), se realizó con previa preparación de gel con una concentración al 13 %. Se tomaron 16 µL de muestra proteica y se administraron 4 µL del buffer de carga Laemli 5x, se dejaron hervir las muestras a 95 °C durante 5 min. Se procedió a la instalación del equipo de electroforesis, armando el caset con el gel y vertiendo buffer de corrida 1x en el caset y en el tanque. Se cargó lentamente la muestra de proteína en cada pozo, así como, 5 µL de marcador de peso molecular. Se dejó funcionar a una corriente constante durante 20 min. a 15 mA y posteriormente de 45 a 60 min. a 25 mA. Algunos geles fueron teñidos directamente con azul de commassie.

### 6.13 Análisis de la proteína recombinante por espectrometría de masas.

La proteína recombinante Fra e 1 se corrió en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 13%, se tiñó con azul de commassie, se cortó la banda y se mandó analizar por espectrometría de masas en Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM), CINVESTAV Zacatenco, CDMX.

### 6.14 Inmunotransferencia.

Después de la electroforesis, se equilibró el gel en el buffer de transferencia durante 15 min. Se cortó una membrana PVDF y papel de filtro al tamaño del gel. El gel se humedeció en buffer de transferencia durante 15 min. La membrana PVDF se humedeció en metanol al 100% previo a su uso, y se humedeció en buffer de transferencia durante 15 min. El sándwich se colocó en el siguiente orden sobre el ánodo de platino:

1. Papel de filtro pre-húmedo.
2. Membrana pre-húmeda.
3. Gel equilibrado.
4. Papel de filtro pre-húmedo.

Se colocó el cátodo superior de acero inoxidable y la cubierta de seguridad. Se dejó funcionar a una corriente constante durante 60 min. a 15 V.

### 6.15 Inmunodetección con sueros de pacientes.

Posterior a la electrotransferencia se lavó la membrana durante 10 min con PBS. Se incubó la membrana durante 1 hora con solución EveryBlot Blocking Buffer (BioRad) y se procedió a lavar por 10 min. en PBS-Tween al 0.05 %. Se dejó incubando toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario (pull de sueros de pacientes sensibles y también con suero de pacientes no sensibles) a una concentración de 1:25 con EveryBlot Blocking Buffer. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05 %, 10 min. por lavado. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario que reconoce IgE de humano marcado con peroxidasa (HRP) a una concentración de 1:1000. Se lavó la membrana 6 veces con TBS-Tween al 0.05% durante 5 min. cada lavado. El lavado final se realizó con PBS. Se colocó la membrana con la proteína hacia arriba y se agregó 1 mL de solución de sustrato quimioluminiscente (Thermo-Scientific), incubando la membrana durante 5 min. Se drenó el exceso de líquido, se selló la membrana en un cuadro de acetato limpio y procedimos a realizar la lectura con el sistema ChemiDoc (BioRad).

## 7 Resultados.

### 7.1 Reclutamiento de pacientes.

Tanto las pruebas cutáneas como las muestras de suero se recolectaron en la clínica de alergia e inmunología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, esto conforme a lo establecido en los protocolos. Al momento de la toma de suero y realización de pruebas cutáneas estos pacientes no se encontraban bajo tratamiento con ninguno de los siguientes fármacos: antihistamínicos, corticosteroides o inmunoterapia.

Las pruebas cutáneas se realizaron con un panel de 48 alérgenos, entre los que se incluyeron acaro, cucaracha, epitelios, arboles, malezas y pastos. Se consideró una prueba de punción cutánea positiva a aquella roncha  $\geq 3$  mm a los 20 minutos respecto al control negativo (solución salina). En total se reclutaron a 11 pacientes con edades entre 23 a 36 años, con una edad promedio de 28.9 años, 3 mujeres, 8 hombres. Se realizó un interrogatorio para determinar si los pacientes contaban con antecedentes de síntomas sugerentes de patología alérgica: 8 pacientes contaban con síntomas sugestivos de padecimientos alérgicos, 3 pacientes no contaban con síntomas sugestivos de dichos padecimientos.

Las pruebas cutáneas de los pacientes que se incluyeron en nuestro estudio se organizaron en 3 grupos las de pacientes con reactividad a fresno y olivo (pacientes 5, 7, 11) y reactividad a fresno y trueno (pacientes 2, 3, 4, 10) y pacientes sin sintomatología alérgica resultaron con pruebas cutáneas negativas (pacientes 6, 8, 9) se incluyeron como grupo control. El paciente número 1 se excluyó de nuestro estudio debido a que no resultó con pruebas reactivas para los alérgenos de interés. En la tabla 1 se enlistan las características clínicas y los resultados de pruebas cutáneas de los 11 pacientes.

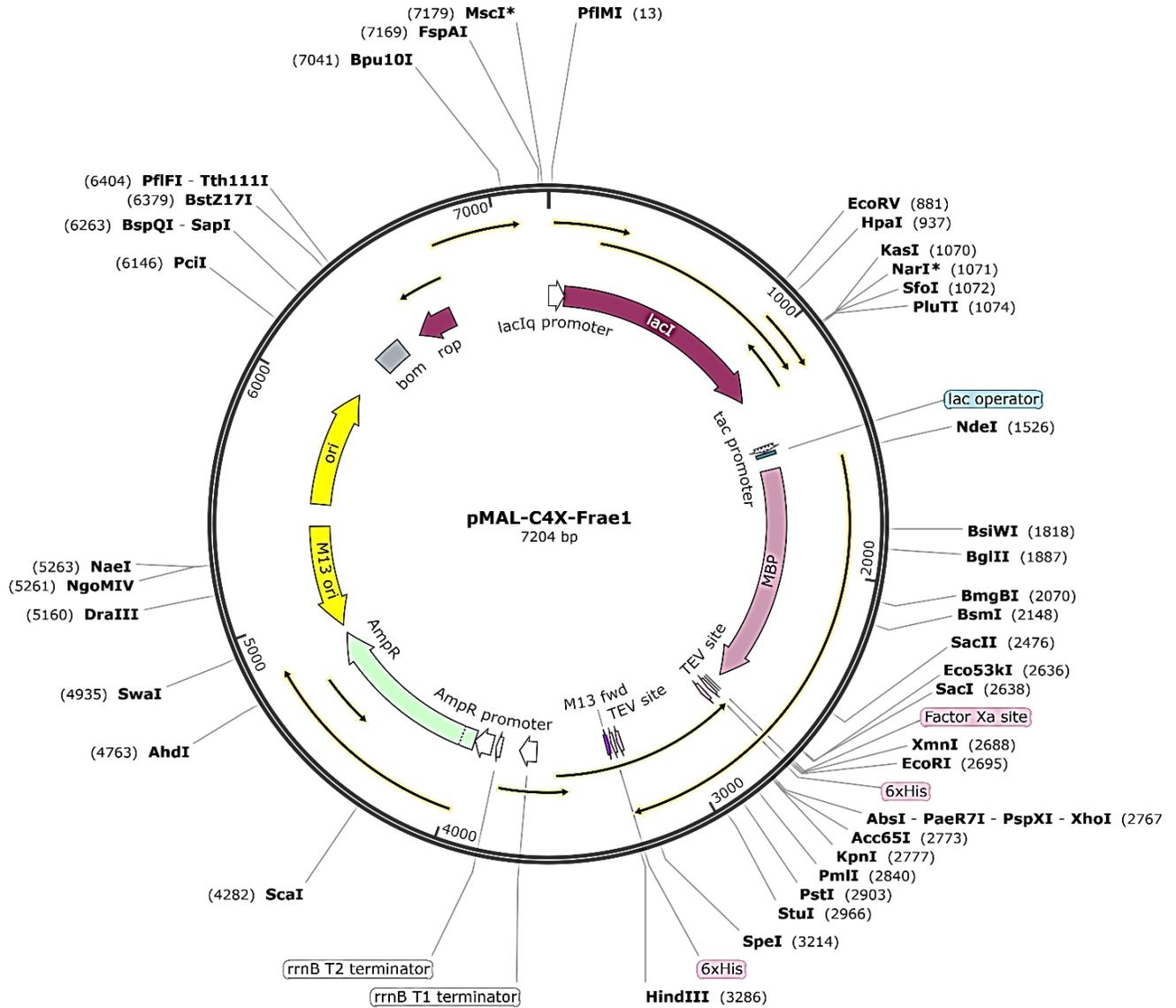
**TABLA 1. Características clínicas de pacientes**

Paciente	Edad	Sexo	Alérgenos positivos en pruebas cutáneas (SPT)	Cuadro clínico
1	23	F	<i>Liquidambar styraciflua, Schinus molle, Eucalyptus sp, Atriplex wrightii</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica
2	34	M	<i>Medicago sativa, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Cupressus arizonica, Alnus verrucosa, Populus tremoloides, Juniperus californica, Ligustrum vulgare, Eucalyptus sp, Quercus alba, Olea europeae, Acacia, Morus rubra, Artemisa tridentata, ambrosia trifida, Salsola kali, Amaranthus palmeri, Diente de leon, Atriplex wrightii, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Quercus rubra</i>	Rinitis alérgica Dermatitis por contacto alérgica ( <i>Cannabis Sativa</i> )
3	24	M	<i>Dermatophagoides pteronyssinus, cucaracha, perro, conejo, Zea mays, Triticum aestivum, Medicago sativa, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Ligustrum vulgare, Cupressus arizonica, Alnus verrucosa, Schinus molle, Juniperus californica, Eucalyptus, Quercus alba, Olea europeae, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Salsola kali, Amaranthus palmeri, Taraxacum officinale, Atriplex wrightii, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Ulmus americana, Carya ovate, Quercus rubra, Acer negundo, Populus deltoides.</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica Asma
4	35	M	<i>Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, cucaracha, pelo de gato, Zea mays, Triticum aestivum, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Ligustrum vulgare, Cupressus arizonica, Populus tremoloides, Eucalyptus sp, Olea europeae, Acacia sp, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Fraxinus excelsior, Platanus occidentalis</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica
5	23	M	<i>cucaracha, perro, pelo de gato, Medicago sativa, liquidambar, juniperus virginiana, alnus verrucosa, Olea europeae, Fraxinus excelsior, malezas mix</i>	Rinitis alérgica.
6	36	M	-	Rinitis no alérgica
7	25	F	<i>Medicago sativa, mezquite, Populus alba, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Alnus verrucosa, Schinus molle, Juniperus californica, Eucalyptus sp, Quercus alba, Olea europeae, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Salsola kali, Taraxacum officinale, Atriplex wrightii, Fraxinus Excelsior Betula verrucosa, Olmo, nogal, Quercus rubra, Platanus Occidentalis, Hacer negundo, Populus deltoides</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica Asma
8	31	M	-	-
9	29	F	-	Rinitis no alérgica
10	31	M	<i>Liquidambar styraciflua, Ligustrum vulgare, Artemisa tridentata, Betula verrucosa, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa.</i>	Dermatitis atópica.
11	27	M	<i>pelo de gato, Medicago sativa, Prosopis sp, Populus alba, Casuarina sp, Olea europea, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Carya ovate, Acer negundo.</i>	Rinitis alérgica Conjuntivitis alérgica

## 7.2 Selección del sistema de expresión.

Se consideró la realización de la expresión de Fra e 1 en el sistema de *E. Coli* BL21 (DE3) debido a distintas características favorables para la expresión del gen de interés; acorde a la literatura, es el tipo celular que con más frecuencia se utiliza para la expresión proteica y fue la cepa que se obtuvo con el tiempo esperado para la realización del protocolo. *E. Coli* BL21 (DE3) lleva una copia del fago T7 ARN polimerasa (T7RNAP) bajo el control del promotor LAC UV5, por lo que se denomina como DE3. Los genes de interés se deben clonar bajo el control de un promotor T7 en plásmidos de expresión para evitar la transcripción endógena de la bacteria, debido a que este promotor no es reconocido por la ARN polimerasa nativa de la bacteria. Con esto se evita la expresión no deseada (Lebendiker & Danieli, 2014). El único inconveniente es se tuvo que realizar la optimización del uso de codones para la expresión en bacterias.

Otra ventaja de expresar proteínas en *E. coli* es la disponibilidad una amplia gama de plásmidos de expresión. Se eligió el plásmido pMAL-c4x, el cual incluye características específicas como: la presencia de la bandera, *Flag*, MBP (*Maltosa Binding Protein*) que permitirán que Fra e 1 se mantenga soluble al realizar purificación proteica y ayuda a disminuir el riesgo de que nuestra proteína se fuera a cuerpos de inclusión (Baeshen et al., 2015). Así mismo, MBP puede ser reconocida por columnas de afinidad, lo que permite la purificación de proteínas mediante cromatografía alta afinidad. El vector pMAL-c4x además incluye un marcador de selección para ampicilina, el cual ayuda a asegurar la sobrevivencia de aquellas células que sólo contengan el plásmido (Fig. 12A). Con el fin de purificar la proteína recombinante Fra e 1 del resto de proteínas de la bacteria se agregó una cola de histidinas (6x his), la cual será reconocida por las columnas de afinidad de níquel (IMAC). También se agregaron dos sitios de la proteasa TEV, la cual nos ayudará a separar los elementos de la proteína de fusión, como MBP y la cola de histidinas, de la proteína Fra e 1 (Figura 12B).



B



Figura 12. A. Vector de expresión de bacteria pMAL-c4x. B. Componentes de la proteína heteróloga clonado en el vector de expresión de bacteria pMAL-c4x. Se agregaron elementos extra al vector como dos sitios de corte para TEV y dos colas histidinas que flanquean a la proteína Fra e 1.

### 7.3 Preparación de células competentes y transformación.

Se prepararon células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) y se transformaron por choque térmico con el vector pMAL-c4x-Fra e 1. Se plaquearon las células en cajas LB con ampicilina y se seleccionaron 8 colonias (clonas). Estas clonas seleccionadas se crecieron en cultivos líquidos y se hizo extracción de DNA plasmídico y se cuantificó la concentración aproximada de ADN mediante espectrofotometría con un equipo Nanodrop, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 2). Se observa que las clonas que produjeron una concentración superior a 20 ng/ml.

Tabla 2. Espectrofotometría de clonas de <i>E. coli</i> BL21			
<b>E. coli BL21</b>	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
<b>C1</b>	28.7	1.69	1.86
<b>C2</b>	31.9	1.47	1.73
<b>C3</b>	23.4	1.65	1.72
<b>C4</b>	23.9	1.77	1.55
<b>C5</b>	29.9	1.74	1.92
<b>C6</b>	24.9	1.75	1.69
<b>C7</b>	37.9	1.81	1.76
<b>C8</b>	29.3	1.89	2.14

Se uso un gel de agarosa al 1% para realizar electroforesis observando que las clonas 2,4,6 y 8 mostraron el vector de aproximadamente 7.2 kb; se puede observar otra banda de plásmido que corresponde a la forma super enrollada del mismo (Fig. 13).

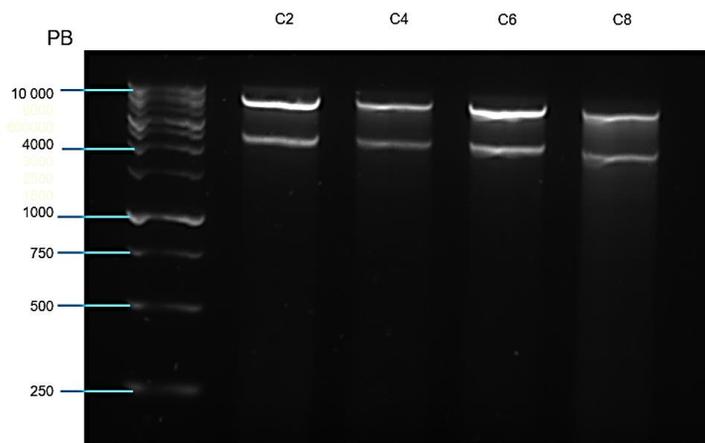


Figura 13. Electroforesis de los vectores digeridos. Todas las clonas fueron capaces de transformarse y clonar el plásmido, observamos 2 bandas correspondientes al ADN plasmídico una en su forma super enrollada y a una forma menos condensada del ADN, Gel de agarosa al 1%.

Las clonas C2 y C8 se enviaron a secuenciar, para la C2 el electroferograma dio una mala lectura de secuenciación, por lo que se descartó su uso durante el protocolo. Mientras que la clona 8 mostro un 100% de identidad con la secuencia previamente obtenida de Fra e 1 isoforma 1.0101 y no hubo cambios ni deleciones de nucleótidos (Fig. 14).

	Score 1435 bits(777)	Expect 0.0	Identities 777/777(100%)	Gaps 0/777(0%)	Strand Plus/Minus
Fra e 1	1		GTCTGCCGCCACCGCCCTGGAAATACAAGTTTTTCGTAATCCCATGGACTAGTCATATTCG		60
Fra e 1	789		GTCTGCCGCCACCGCCCTGGAAATACAAGTTTTTCGTAATCCCATGGACTAGTCATATTCG		730
Fra e 1	61		GCGGATACATACCCAGTTTGTGTAGACTTGCGGGCAC TTCGGAAGAACCTCCTTTTAA		120
Fra e 1	729		GCGGATACATACCCAGTTTGTGTAGACTTGCGGGCAC TTCGGAAGAACCTCCTTTTAA		670
Fra e 1	121		AGAAGCCAGCGGGTTAATGGTGCGAGTCGTGCCGTTACGGTATTCAGGATGAATTTCA		180
Fra e 1	669		AGAAGCCAGCGGGTTAATGGTGCGAGTCGTGCCGTTACGGTATTCAGGATGAATTTCA		610
Fra e 1	181		GGCTCGGTTTAAACCAGCCCTCGGTCGGAATTCGTCACAGTCCTTACGGTAGACGACA		240
Fra e 1	609		GGCTCGGTTTAAACCAGCCCTCGGTCGGAATTCGTCACAGTCCTTACGGTAGACGACA		550
Fra e 1	241		GCAACACGATTTACAAAACCTCGTTTTTATGATCACGTTCAATCACCATGGAGTACAGGC		300
Fra e 1	549		GCAACACGATTTACAAAACCTCGTTTTTATGATCACGTTCAATCACCATGGAGTACAGGC		490
Fra e 1	301		CTTCTGCGGGTATAACCCACCTCGGTAAGGTCACCTTGCCATTCTCTTTGTCCCTTG		360
Fra e 1	489		CTTCTGCGGGTATAACCCACCTCGGTAAGGTCACCTTGCCATTCTCTTTGTCCCTTG		430
Fra e 1	361		ACTGCAGACGAACACCAGCACCCCTGGATGAACTCGCTCAGCTCGGTGATAAAACCCGCAC		420
Fra e 1	429		ACTGCAGACGAACACCAGCACCCCTGGATGAACTCGCTCAGCTCGGTGATAAAACCCGCAC		370
Fra e 1	421		GGCACGTGTCGAGTAAACCTGGCCCTGGACATAAAACAGGCTCACAGGCGGCTGCGGAA		480
Fra e 1	369		GGCACGTGTCGAGTAAACCTGGCCCTGGACATAAAACAGGCTCACAGGCGGCTGCGGAA		310
Fra e 1	481		CATCCTCGGTACCCTCGAGGCCACCGCCCTGGAAATACAAGTTTTTCGGTCGTTGGACGCG		540
Fra e 1	309		CATCCTCGGTACCCTCGAGGCCACCGCCCTGGAAATACAAGTTTTTCGGTCGTTGGACGCG		250
Fra e 1	541		TGGGCCCGtgatgatgatgatgatgGAATTCTGAAATCCTTCCCTCGATCCCAGgttgt		600
Fra e 1	249		TGGGCCCGTGATGATGATGATGATGGAATTCTGAAATCCTTCCCTCGATCCCAGGTTGT		190
Fra e 1	601		tgttattgttattgttattgttattgttCGAGCTCGAATTAGTCTGCGCGTCTTTACAGGCTT		660
Fra e 1	189		TGTTATTGTTATTGTTGTTGTTGTTTCGAGCTCGAATTAGTCTGCGCGTCTTTACAGGCTT		130
Fra e 1	661		CATCGACAGTCTGACGACCCCTGGCGGCGTTGATCACCGCAGTACGCACGGCATAACCAGA		720
Fra e 1	129		CATCGACAGTCTGACGACCCCTGGCGGCGTTGATCACCGCAGTACGCACGGCATAACCAGA		70
Fra e 1	721		AAGCGGACATCTGCGGGATGTTTCGGCATGATTTACCTTTCTGGGCGTTTTCCATAG		777
Fra e 1	69		AAGCGGACATCTGCGGGATGTTTCGGCATGATTTACCTTTCTGGGCGTTTTCCATAG		13

Figura 14. Comparación entre las secuencias de Fra e 1 y el producto clonado en pMAL-c4X-Frae1 (Clona 8). Con líneas continuas se señalan las bases que están presentes tanto en el gen como en el fragmento clonado, las cuales son idénticas. Teniendo un 100% de identidad con Fra e 1 isoforma 1.0101

## 7.4 Inducción y extracción proteica.

Una vez validada la integridad del vector y de la secuencia de Fra e 1, se pusieron cultivos para inducir la síntesis de la proteína recombinante. La inducción se llevó a cabo con IPTG a una concentración de 1 mM, cabe mencionar que se probó realizar la inducción con etanol al 3% basándonos en un protocolo citado previamente. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Tabla 3) y posteriormente se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE al 13% con 16 µg de las 3 muestras: muestra control (no inducida), muestra inducida con IPTG, muestra inducida con IPTG y Etanol al 3%. Como se observa en la figura 9, cuando se agrega IPTG se induce la expresión de una proteína de aproximadamente 60 kDa, la cual es del tamaño esperado para nuestra proteína, con respecto al uso de etanol se vio una reducción en la síntesis de la misma, por lo que se descartó su uso para experimentos posteriores (Fig. 15).

Tabla 3. Cuantificación proteica por el método de Bradford	
Muestra	µg/µl de proteína
Control (No inducida)	5.5
Inducida con IPTG	6.3
Inducida con IPTG y etanol al 3%	4.8

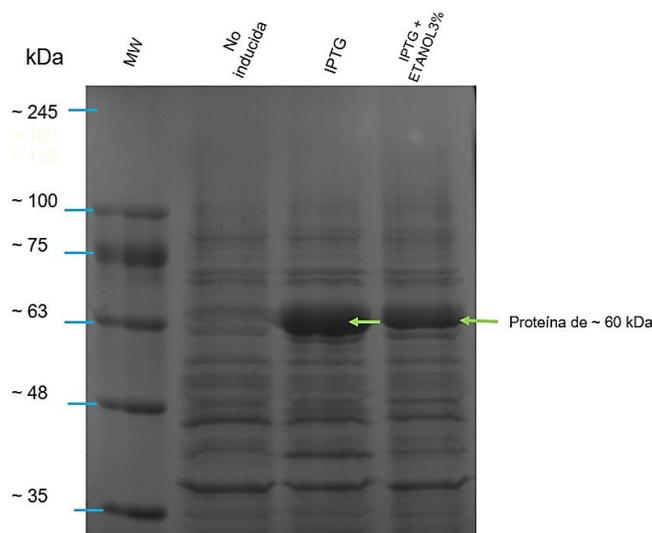


Figura 15. Electroforesis de la inducción de proteínas. Se muestran 3 condiciones distintas: No inducida, Inducción con IPTG 1 mM, Inducción con IPTG + Etanol al 3%, Marcador de peso molecular. Se observa una banda de un peso aproximado de 60 kDa en ambas condiciones de inducción, correspondiente al peso aproximado de nuestra construcción completa. Gel de Poliacrilamida al 13%.

## 7.5 Purificación de proteínas.

La purificación proteica se llevó a cabo con columnas de níquel, IMAC. Se guardó una alícuota de las proteínas no unidas a la columna (Output) y una muestra previa a su purificación (Input), para posteriormente realizar electroforesis de proteínas en un gel SDS-PAGE al 13%. En la figura 10 se observa una banda de aproximadamente 61 kDa, correspondiente a la construcción con Fra e 1, esta banda está presente en Input y en lo purificado con la columna IMAC; desapareciendo en Output, lo cual nos indica que la purificación funcionó correctamente (Fig. 16).

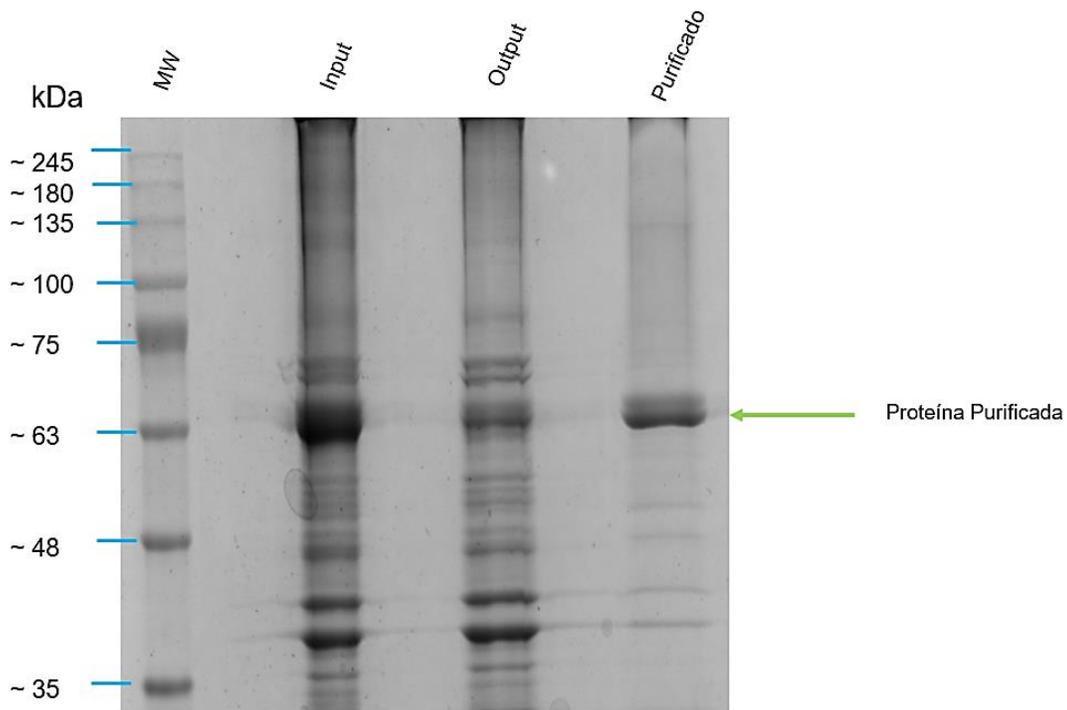


Figura 16. Electroforesis de la purificación proteica. Se muestran 3 condiciones distintas: Muestra no purificada (Input), Muestra no unida (Output), Muestra purificada. Gel de Poliacrilamida al 13%.

## 7.6 Digestión con proteasa TEV.

Posterior a la purificación se realizó una cinética de digestión a tiempos distintos (24, 48 y 72 hrs) con la proteasa TEV y con dos condiciones de resuspensión distintas de la proteína. El primer medio de resuspensión fue con urea 2 M y el segundo fue con urea 1 M más buffer TEV 1x. Esto con la finalidad de ver la solubilidad de la proteína y ver en qué condiciones se digería con la proteasa. Observamos en todos los casos una digestión parcial ya que aparece la

proteína completa (61 kDa), seguido de MBP (41 kDa), la proteasa TEV (28 kDa) y finalmente Fra e 1 (20 kDa). A mayor tiempo de digestión usando el buffer de urea 1 M se observa una mayor digestión (Fig. 17).

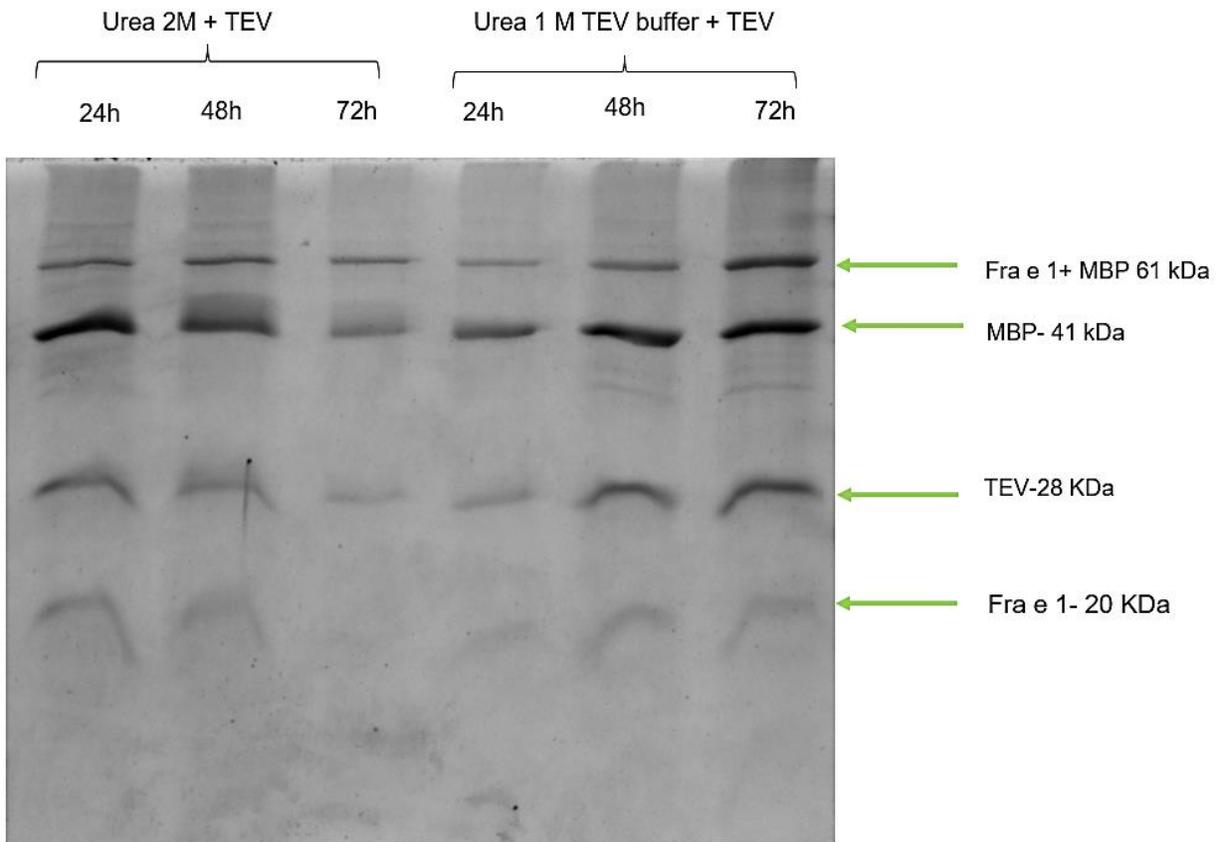


Figura 17. Electroforesis de digestión proteica. Se muestran 2 condiciones distintas y 3 tiempos distintos: Del lado derecho en los carriles 1,2 y 3 se observan muestras resuspendidas en Urea 2M + TEV proteasa a 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs, Carriles 4,5,6 muestras resuspendidas en Urea 1M y buffer TEV + TEV proteasa 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs, se observa en cada una de las condiciones una digestión parcial, pues se aprecian 4 bandas correspondientes 61 kDa (construcción completa), 41 kDa (MBP), 28 kDa (Proteasa TEV) y finalmente con 20 kDa Fra e 1. Gel de Poliacrilamida al 13%.

Al observar que la digestión se llevaba a cabo de forma parcial, se revisó que los componentes del buffer en el que se eluyen las proteínas de la columna IMAC no son compatibles con la proteasa TEV, por lo que la digestión se puede ver afectada. Por este motivo se decidió probar dos métodos para precipitar proteínas y eliminar estos compuestos. El primer método es la precipitación de proteínas con acetona fría al 100 % y el segundo fue empleando columnas AMICON 3K con el fin de poder desalar la muestra. Una vez desaladas las muestras se procedió a digerir con la proteasa TEV y se realizó una electroforesis de proteínas con un gel SDS-PAGE

al 13%. Se observa que las muestras únicamente precipitadas con acetona no mostraron una adecuada digestión, mientras que al desalar con las columnas AMICON 3K se ve una digestión casi completa y fue donde se puede observar una banda que corresponde a Fra e 1 (Fig. 18).

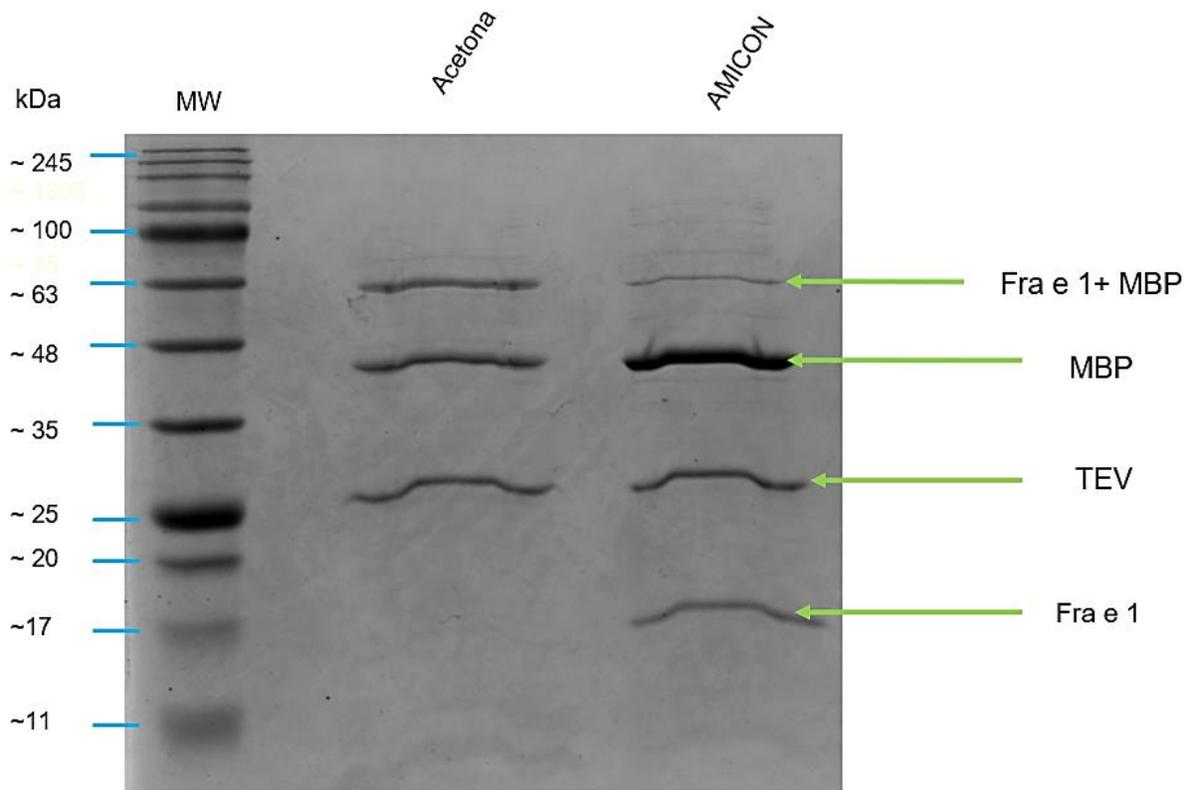


Figura 18. Electroforesis de proteínas digeridas con TEV y con dos métodos para eliminar sales y concentración. Se muestran 2 condiciones distintas: muestra precipitada con acetona y la desalada con columnas AMICON 3K. Las bandas correspondientes a la proteína completa, MBP, TEV y Fra e 1 se señalan con flechas. Gel de Poliacrilamida al 13%.

De este gel teñido con azul de comassie se cortó la banda correspondiente a Fra e 1 y se mandó analizar por espectrometría de masas. El análisis se realizó en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) del CINVESTAV Zacatenco. Se pudo confirmar por espectrometría de masas que la proteína corresponde a Fra e 1.

### 7.7 Validación del potencial alergénico de Fra e 1.

Posterior a la purificación, desalación y concentración de la proteína digerida con TEV, se realizó una electroforesis en SDGD-PAGE al 13% en 3 distintas muestras: proteína completa purificada con IMAC (Fra e 1 IMAC, 61 kDa), proteína digerida con TEV y desalada con columna AMICON 3K (Fra e 1 AMICON) y extracto proteico total de fresno a manera de control. Se

procedió a transferir las proteínas a una membrana PVDF para realizar el inmunoblot. Se incubó la membrana con el pool de suero de 4 pacientes sensibles a trueno y fresno. Se observa que hubo reconocimiento a la proteína recombinante completa de Fra e 1 (61 kDa); mientras que en la muestra digerida con la proteasa hubo reconocimiento de MBP, la proteasa TEV y a Fra e 1. Con respecto al extracto proteico total de polen de fresno se pueden identificar varias bandas con las cuales hubo reconocimiento por parte del suero de los pacientes sensibles, el cual concuerda con lo encontrado en otros experimentos similares llevados a cabo en el laboratorio (datos no mostrados), hubo también en este extracto reconocimiento en una zona cercana a los 20 kDa, la cual pudiera ser Fra e 1 nativa (Fig. 19).

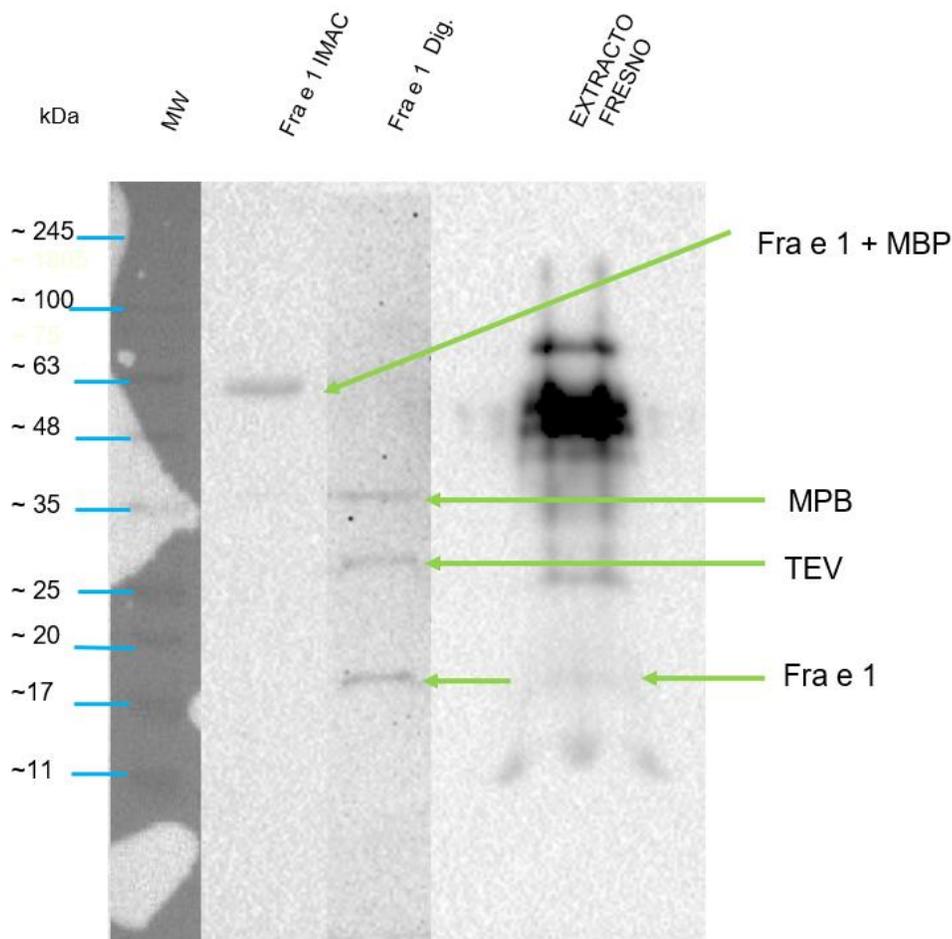


Figura 19. Inmunoblot con la proteína recombinante de Fra e 1 y extractos proteicos totales de polen de fresno. Se muestran 3 condiciones distintas: muestra purificada con columnas IMAC, muestra digerida y extracto total de polen de fresno. Se muestran con flechas los principales componentes de la proteína heteróloga y a la proteasa TEV.

Para validar este resultado se repitió el inmunoblot, pero esta vez se utilizó el suero de un paciente sensible a fresno y olivo. Se observa que el suero únicamente reconoció a MBP y a TEV, no hubo reconocimiento de Fra e 1, en el cuadro rojo se indica la zona donde esperábamos que apareciera Fra e 1 (Figura 20).

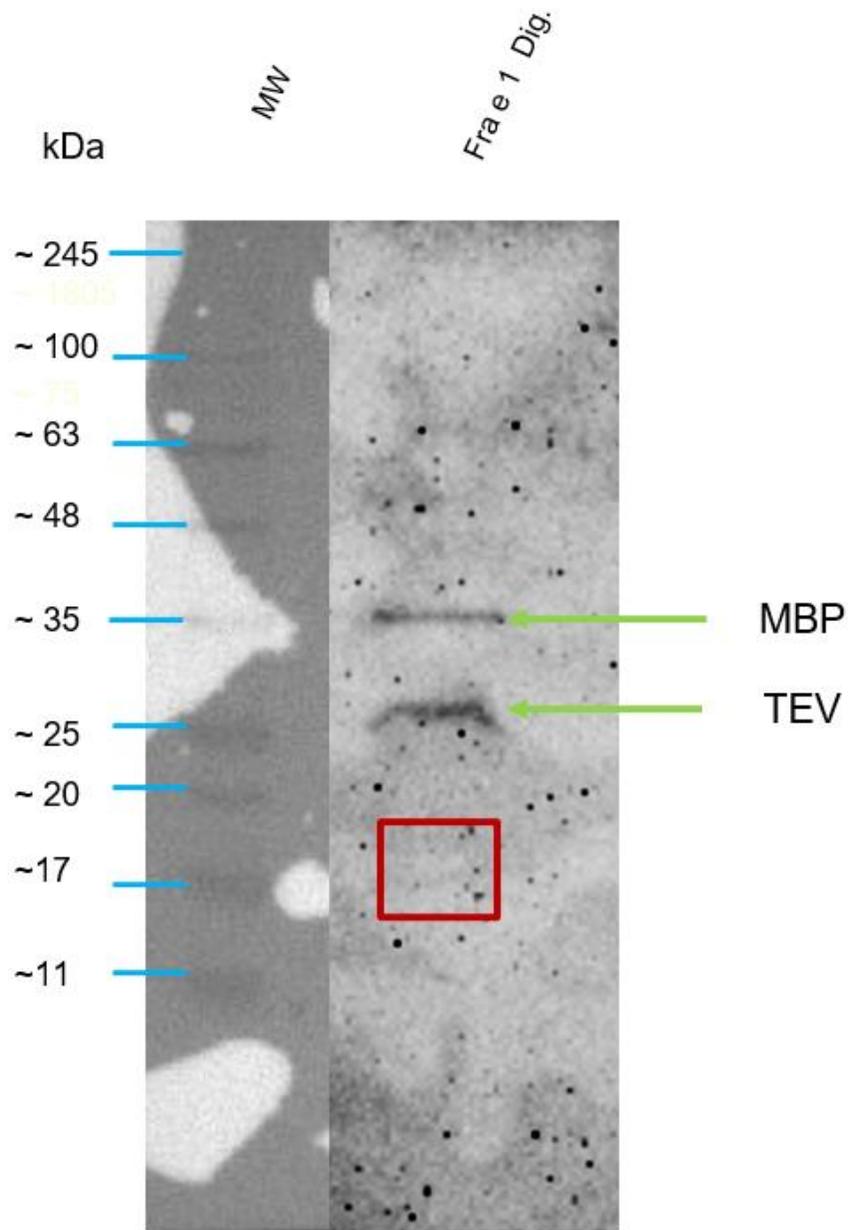


Figura 20. Inmunoblot de paciente sensible a fresno y trueno con la proteína recombinante digerida con TEV. Se señalan con flechas los elementos de la proteína recombinante y en el recuadro rojo donde se esperaba a Fra e 1.

Nuestra validación incluyó un último inmunoblot, en el cual se utilizó el suero de un paciente no sensibilizado a Oleáceas. No hubo reconocimiento de Fra e 1 ni de los elementos MBP ni de la proteasa TEV (Figura 21).

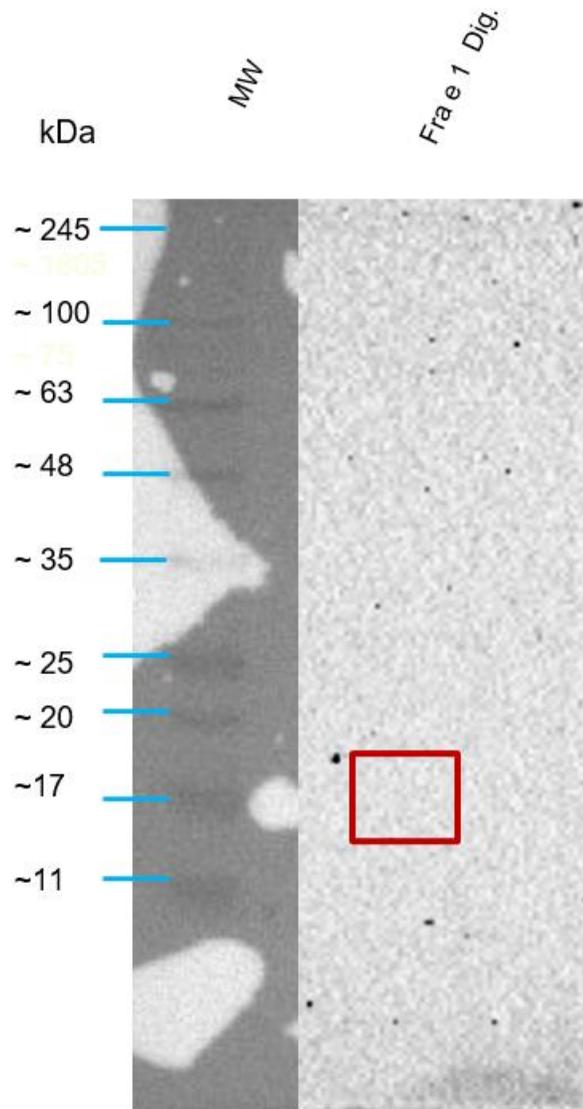


Figura 21. Inmunoblot de paciente control proteína recombinante digerida con TEV. En el recuadro rojo se marca donde se esperaba a Fra e 1. Membrana PVDF

## 8 Discusión.

La importancia de un diagnóstico y tratamiento adecuado de los padecimientos alérgicos respiratorios radica en el alto porcentaje de personas afectadas por dichas patologías, se estima que al menos el 25 % de la población mundial sufre de enfermedades alérgicas respiratorias (Morales-Amparano et al., 2021). Tales padecimientos disminuyen la calidad de vida al propiciar una mala calidad de sueño, que condiciona una disminución de la función cognitiva, acompañada de irritabilidad y fatiga, con un impacto importante a nivel laboral. A nivel pediátrico se ha relacionado con una disminución del rendimiento escolar especialmente durante la temporada alta de polen (Brožek et al., 2017; Burks, 2020).

El diagnóstico adecuado de enfermedades alérgicas depende de distintos factores que condicionan la elección de una prueba específica que sea capaz de orientar el actuar médico en pro del bienestar del paciente en cuestión. Si bien la realización de pruebas cutáneas ha sido desde el inicio una herramienta útil para el diagnóstico de alergias mediadas por IgE, la metodología que se usa en dicha prueba no se encuentra libre de sesgo; ya que es una prueba que requiere un entrenamiento específico para realizarla de forma adecuada. Otro inconveniente es que se emplean extractos proteicos totales de la fuente alérgica para el diagnóstico y tratamiento, la mayoría de estos no están estandarizados y dentro de su composición se encuentran proteínas en muchos casos no identificadas. Así mismo, sumado a la poca disponibilidad de materia prima para su fabricación y que muchos de estos pólenes con los que se elaboran los extractos son de árboles que a veces no están presentes en la región donde se diagnostican y tratan estas alergias respiratorias. Aunque es posible abordar y monitorear algunas de estas variables, no es posible controlar todas ellas, en particular, el clima, contaminación y la composición del suelo donde crecen las plantas y se recolecta el polen (Ansotegui et al., 2020; Codina et al., 2015). Ciertos contaminantes como  $PM_{2.5}$  y el ozono incrementan los recuentos de polen (Rahman et al., 2019). Además, los contaminantes del aire dañan la membrana y la pared celular de los granos de polen, incrementando la liberación de materiales de polen (Ortega-Rosas et al., 2021). Tal incremento de la liberación de polen se ha asociado al aumento de la sensibilización alérgica, un ejemplo claro se reporta en una publicación reciente del servicio de Alergia e inmunología de nuestro instituto, en el cuál, se evidenció que el aumento de los recuentos de polen se asoció con incrementos en la frecuencia

de sensibilización para algunas especies de árboles (*Fraxinus* sp., familia Cupressaceae y *Alnus* sp.) (Pavón-Romero et al., 2022)..

Para la obtención proteica de la fuente nativa se requiere de una serie de procesos complejos, que están a expensas de distintas condiciones las cuáles son responsables de la composición alergénica del polen; en otras palabras, distintos métodos de extracción pueden hacer variar la composición y la concentración de alérgenos presentes en la muestra. Lo que condiciona una gran variación de contenido proteico incluso en extractos del mismo fabricante, a menudo difieren en valor diagnóstico y su uso como tratamiento (Codina et al., 2015; Wallner et al., 2013). Por ejemplo, en el caso de el extracto proteico comercial de fresno, el cual no se encuentra estandarizado, al momento de utilizarlo se está probando la alergenicidad del extracto proteico total, no el de las proteínas que han sido identificadas como alérgenos del fresno. Esto es un problema ya que durante el tratamiento se pueden generar nuevas sensibilizaciones en los pacientes, por el simple hecho de usar extractos proteicos totales de la fuente alergénica. Los principales pólenes identificados durante los años 2014 a 2018 en la Ciudad de México acordé a un reciente estudio correspondieron a árboles pertenecientes a *Fraxinus* sp. (32.5%), familia Cupressaceae (31.1%), *Alnus* sp. (16.1%), *Casuarina* sp. (9.5%), *Pinus* sp. (3.7%), *Quercus* sp. (2.7%), familia Myrtaceae (2.6%), familia Salicilacea (2.9%), familia Moraceae (1.5%) y *Schinus* sp. (1.2%) (Pavón-Romero et al., 2022). El principal alérgeno de fresno es Fra e 1, perteneciente a la familia de proteínas similares a Ole e 1. Presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 82 %, 88 % y 91 % con otros alérgenos como Syr v 1 de lila, Ole e 1 de olivo y Lig v de trueno, respectivamente. Fra e 1 presenta una fuerte reactividad cruzada a Ole e 1 de olivo. La reacción cruzada puede producirse si la homología es >70 %, por lo que consideramos que las pruebas cutáneas de los pacientes con otras posibles sensibilizaciones a alérgenos que contienen proteínas similares a Ole e 1 no se trata de un cruce alergénico. Entre los miembros de la familia Oleaceae, el polen de *O. europea* se considera el más alergénico, y se ha asociado con enfermedades alérgicas a través de extensas áreas de Europa, América del Norte, América del Sur, Sudáfrica y Australia (Calzada et al., 2019; Robledo-Retana et al., 2020). En México se ha reportado que el árbol de la familia Oleaceae que causa mayor sensibilización alérgica es el fresno, pues su distribución en el país es por mucho más representativa que la de olivo.

Con el fin de realizar un diagnóstico dirigido que ayude a resolver la problemática de dichos cruces alérgicos que generan diagnósticos imprecisos fue que decidimos hacer clonación y expresión de Fra e 1 en la bacteria *E. coli*. Previamente un grupo logró expresarla en levadura, aunque trabajar con levadura es un proceso menos eficiente y con mayor complejidad que realizarlo con bacterias (Barderas et al., 2005, 2006).

La elección del sistema de clonación se vio influenciado por varios factores, entre ellos la disponibilidad inmediata de la cepa *E. coli* BL21 (DE3), ya que al momento de realizar este proyecto fue la única cepa en conseguirse de manera rápida. Considerando además que resulta ser un excelente sistema de clonación para los objetivos aquí planteados. Se mandó sintetizar y clonar el gen de Fra e 1 optimizado para su expresión en bacterias en el vector pMAL-c4x, el cuál fue verificado por secuenciación. Se empleó IPTG como inductor de la expresión, aunque también se probó usar etanol al 3 %. Hubo una disminución en la cantidad de proteína recombinante empleando etanol al 3 % que usando únicamente IPTG, sumado a que no hubo problemas para poder extraer y purificar la proteína recombinante fue que decidimos únicamente inducir con IPTG sin etanol.

El proceso de purificación de la proteína recombinante implica el retiro de aquellas proteínas que no son de interés, incluyendo aquellas propias del sistema de expresión. La bandera MBP, además de mejorar la solubilidad, ayuda con el proceso de purificación proteica pues es reconocido por columnas de afinidad a MBP (Lénon et al., 2021). Se ha usado MBP como parte de protocolos similares al nuestro, un ejemplo es el uso de MBP de en la síntesis de un alérgeno de *Cupressus sempervirens* (Cop s 3) el cual se expresó en *E. coli* como proteína de fusión (Togawa et al., 2006). Otro protocolo consistió en el uso de una cepa de *E. coli* B origami, el plásmido utilizado contenía mutación MBP para la síntesis del alérgeno principal de cacahuate Ara h 2 (Mueller et al., 2011). Otro elemento presente en nuestra proteína de fusión fue la cola de histidinas para poder purificar la proteína expresada del resto de proteínas endógenas de *E. coli* usando columnas de afinidad de níquel. Al momento de realizar la electroforesis de las proteínas purificadas con la columna IMAC se evidenció una banda de aproximadamente 61 kDa, correspondiente al tamaño esperado de nuestra construcción completa. Posterior a el aislamiento de nuestra construcción proteica, se requería aún retirar aquellas banderas que nos auxiliaron en su síntesis, por lo que se incluyó una digestión con proteasa TEV. Se realizó una cinética de digestión con distintos tiempos para encontrar las condiciones ideales de digestión.

En un protocolo del Laboratorio de Cristalografía de *Johns Hopkins University* se menciona que la duración de la reacción de escisión suele darse durante toda la noche, aunque se producirá una gran cantidad de escisión en las primeras horas, los tiempos de incubación prolongados pueden no conducir a aumentos proporcionales en la digestión (Waugh, s. f.). En nuestra cinética se observó en todos los casos una digestión parcial, este inconveniente se asoció al buffer de resuspensión, pues éste no era compatible con la proteasa TEV para tener una eficiencia de proteólisis del 100%. Por este motivo se decidió probar dos métodos de precipitación y desalación de proteínas. El método de desalación con columnas AMICON 3K resultó ser el mejor, ya que la digestión con TEV fue casi total.

Una vez que ajustamos las condiciones ideales para la digestión con la proteasa TEV se pudo ver banda de aproximadamente 20 kDa correspondiente a Fra e 1, la cual se confirmó por espectrometría de masas. Ahora solamente faltaba validar la alergenicidad de nuestra proteína, para lo cual se usó suero de los pacientes previamente descritos. Se realizó electroforesis y transferencia a membrana PVDF de la proteína recombinante digerida con TEV, y se hizo la inmunodetección. La proteína recombinante completa (61 kDa) fue reconocida por el suero de pacientes sensibilizados a fresno/ligustrum, mientras que con la proteína digerida con TEV hubo reconocimiento para MBP, la proteasa TEV y para Fra e 1. Cuando se repitió este experimento con el suero del paciente no sensibilizado no hubo reconocimiento a ninguno de los elementos de la proteína recombinante antes mencionados. Esto se puede explicar mediante distintos supuestos, uno de ellos es que dichas proteínas (MBP y TEV) causen reactividad por sí mismas. Revisando la literatura no se encontraron reportes que indiquen si estas proteínas son consideradas alérgenos o si parte de su secuencia está presente en otros alérgenos. Sin embargo, en un reporte sobre la síntesis y prueba de alergenicidad de un alérgeno recombinante de cacahuate en el cual usan MBP se mostró reducción de la unión de IgE al MBP-Ara h 2 comparado con el alérgeno nativo, ellos concluyen que el MBP protege una región del epítipo inmunodominante cerca de la primera hélice de Ara h 2 (Mueller et al., 2011). En nuestro caso no encontramos en el inmunoblot de pacientes reactivos a fresno/trueno que MBP evitara el reconocimiento por IgE cuando se usó la proteína recombinante completa, sin digerir.

Las proteasas son omnipresentes en la biología, con frecuencia iniciando o terminando cascadas de señalización endógenas (Sanchez & Ting, 2020). Aunque existen algunas proteasas que han sido reportadas como alérgenos, por ejemplo, la cisteína proteasa del acaro

(Der p 1), no descartamos la idea de que TEV sea reconocida por el suero de pacientes reactivos debido a alguna secuencia en sus péptidos. Las personas alérgicas tienen niveles elevados de anticuerpos IgE específicos; como resultado, los FcεRI están unidos en mayor medida con IgE específica logrando una densidad que permite el entrecruzamiento de los FcεRI al exponerse a alérgenos (Bernstein et al., 2016b), si bien dicha unión puede darse por la conservación en dicha proteasa de algún epítipo dominante, no existe descripción en la literatura que nos haga concluir que se trata de una sensibilización clínicamente relevante.

En el caso del inmunoblot usando el suero del paciente positivo a fresno/trueno, hubo únicamente reconocimiento con MBP y TEV, no así con Fra e 1. Se puede interpretar este resultado como que el paciente es reactivo a alérgenos de polen de fresno, pero no a Fra e 1. En otras palabras, el paciente está sensibilizado a una proteína o varias proteínas, pero no a Fra e 1. Si bien la IUIS no reconoce otros alérgenos del fresno (*Allergen Search Results*, s. f.), en algunas publicaciones se describe la identificación de otras proteínas alergénicas del fresno, considerando a una proteína de 14 kDa como profilina nombrándola Fra e 2 y otra proteína de 9 kDa homóloga de Bet v 4 y Ole e 3 considerada como Fra e 3 (Hrabina et al., 2007; Poncet et al., 2010). Aunque faltaría hacer una prueba de inmunoblot usando extractos proteicos totales de fresno y el suero del paciente para validar este resultado. Esta hipótesis que tenemos se puede inferir del hecho de que al hacer inmunoblot con extractos proteicos totales de polen de fresno y suero de los pacientes reactivos a trueno y fresno se detectan otras bandas proteicas, lo que nos indica la variedad de proteínas en el polen que pueden ser reconocidas. Otra posibilidad es que el alérgeno responsable sea otro árbol, el cual es correspondiente al orden de las Fabáceas *Prosopis juliflora*, pues, aunque como se mencionó previamente, la reactividad cruzada es poco probable (Matricardi et al., 2016) el paciente salió positivo con pruebas SPT. En resumen, Fra e 1 recombinante fue reconocida por el suero de pacientes reactivos a fresno/trueno, pero no fue reconocida con el suero de paciente fresno/olivo, lo que nos indica que es otra proteína del polen de fresno la causante de la sensibilidad. Todo esto refuerza la necesidad de hacer diagnóstico de manera individual con los principales alérgenos y no usando extractos totales de proteínas de polen.

## 9 Conclusiones.

*E. coli* BL21 (DE3) y el vector de expresión pMAL-c4X resultaron ser excelentes candidatos para usarse como metodología de la expresión de la proteína recombinante Fra e 1.

Fra e 1 recombinante fue reconocido por suero de pacientes positivos a trueno/fresno, pero no por el suero de paciente positivo a fresno/olivo.

Con los pacientes reactivos a fresno/trueno y fresno/olivo hubo reconocimiento de otros elementos como MBP y la proteasa TEV, pero no fueron detectados por el suero del sujeto control.

La validación de la reactividad de la proteína recombinante demuestra que sí existe un reconocimiento específico por parte de los sueros de los pacientes sensibles a oleáceas, incluso en caso de reactividad cruzada.

## 10 Perspectivas a futuro.

Estamos conscientes de que nuestra proteína recombinante requiere más pruebas de validación con más pacientes, sin embargo, la situación pandémica disminuyó en una medida considerable el flujo de pacientes en nuestra consulta, por lo que la poca cantidad de pacientes fue una limitante importante en pro de valorar la alergenicidad de nuestra proteína recombinante. Sería interesante hacer inmunoblot con extractos proteicos totales de polen de fresno con el suero del paciente reactivo a fresno/olivo con el fin de identificar a que proteína es reactivo.

Se planea a corto plazo estandarizar la cantidad de proteína recombinante de Fra e 1 a utilizar en pruebas cutáneas SPT, por lo que se pretenden realizar diluciones y probarlas en pacientes con antecedente de prueba cutánea positiva a extracto de fresno comercial y comparar la alergenicidad de nuestra proteína recombinante. A largo plazo, se tiene el propósito de utilizar dicho extracto incluso como tratamiento alérgico específico en pacientes donde se valide la sensibilización a Fra e 1.

## 11 Bibliografía.

- Akdis, C. A. (2006). Allergy and hypersensitivity. *Current Opinion in Immunology*, 18(6), 718-726. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.09.016>
- Akdis, M. (2009). Immune tolerance in allergy. *Current Opinion in Immunology*, 21(6), 700-707. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.07.012>
- Allergen Search Results*. (s. f.). Recuperado 3 de septiembre de 2022, de <http://allergen.org/search.php?Species=Fraxinus%20excelsior>
- Ansotegui, I. J., Melioli, G., Canonica, G. W., Caraballo, L., Villa, E., Ebisawa, M., Passalacqua, G., Savi, E., Ebo, D., Gómez, R. M., Luengo Sánchez, O., Oppenheimer, J. J., Jensen-Jarolim, E., Fischer, D. A., Haahtela, T., Antila, M., Bousquet, J. J., Cardona, V., Chiang, W. C., ... Zuberbier, T. (2020). IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organization Journal*, 13(2), 100080. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100080>
- Arthur, G. K., & Cruse, G. (2022). Regulation of Trafficking and Signaling of the High Affinity IgE Receptor by FcεRIβ and the Potential Impact of FcεRIβ Splicing in Allergic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 788. <https://doi.org/10.3390/ijms23020788>
- Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens—An update from a molecular perspective. *Allergy*, 70(10), 1201-1211. <https://doi.org/10.1111/all.12696>
- Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 953-962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>
- Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G., & Villalba, M. (2005). Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.001>
- Barderas, R., Purohit, A., Rodríguez, R., Pauli, G., & Villalba, M. (2006). Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: Comparison of the natural and recombinant forms. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 96(4), 557-563. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63550-8](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63550-8)
- Bernstein, D. I., Schwartz, G., & Bernstein, J. A. (2016a). Allergic Rhinitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36(2), 261-278. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.12.004>
- Bernstein, D. I., Schwartz, G., & Bernstein, J. A. (2016b). Allergic Rhinitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36(2), 261-278. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.12.004>
- Brożek, J. L., Bousquet, J., Agache, I., Agarwal, A., Bachert, C., Bosnic-Anticevich, S., Brignardello-Petersen, R., Canonica, G. W., Casale, T., Chavannes, N. H., Correia de Sousa, J., Cruz, A. A., Cuello-Garcia, C. A., Demoly, P., Dykewicz, M., Etxeandia-Ikobaltzeta, I., Florez, I. D., Fokkens, W., Fonseca, J., ... Schünemann, H. J. (2017). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 950-958. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.050>
- Burks, A. W. (Ed.). (2020). *Middleton's allergy: Principles and practice* (Ninth edition). Elsevier.

- Calderon-Ezquerro, M. C., Guerrero-Guerra, C., Galán, C., Serrano-Silva, N., Guidos-Fogelbach, G., Jiménez-Martínez, M. C., Larenas-Linnemann, D., López Espinosa, E. D., & Ayala-Balboa, J. (2018). Pollen in the atmosphere of Mexico City and its impact on the health of the pediatric population. *Atmospheric Environment*, *186*, 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.05.006>
- Calzada, D., Cremades-Jimeno, L., Pedro, M. Á. de, Baos, S., Rial, M., Sastre, J., Quiralte, J., Florido, F., Lahoz, C., & Cárdbaba, B. (2019). Therapeutic potential of peptides from Ole e 1 in olive-pollen allergy. *Scientific Reports*, *9*(1), 15942. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52286-3>
- Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, *2*, 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>
- Codina, R., Crenshaw, R. C., & Lockey, R. F. (2015). Considerations About Pollen Used for the Production of Allergen Extracts. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *3*(5), 676-682. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.04.003>
- Fra e 1 Allergen Details*. (s. f.). Recuperado 6 de agosto de 2022, de <http://allergen.org/viewallergen.php?aid=331>
- Frati, F., Incorvaia, C., Cavaliere, C., Di Cara, G., Marcucci, F., Esposito, S., & Masieri, S. (2018). The skin prick test. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, *32*(1 Suppl. 1), 19-24.
- Fresno (Fraxinus uhdei)*. (s. f.). Naturalista Mexico. Recuperado 31 de agosto de 2022, de <https://www.naturalista.mx/taxa/134212-Fraxinus-uhdei>
- Gaspar-López, A., López-Rocha, E. G., Rodríguez-Mireles, K. A., Segura-Méndez, N. H., & Del Rivero-Hernández, L. G. (2014). Prevalencia de polinosis en pacientes con asma, rinitis y conjuntivitis alérgicas en la zona sur del Distrito Federal, 2007-2013. *Revista Alergia México*, *61*(3), 147-152. <https://doi.org/10.29262/ram.v61i3.39>
- Ghiani, A., Aina, R., Asero, R., Bellotto, E., & Citterio, S. (2012). Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy*, *67*(7), 887-894. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02846.x>
- Hamilton, R. G., MacGlashan, D. W., & Saini, S. S. (2010). IgE antibody-specific activity in human allergic disease. *Immunologic Research*, *47*(1-3), 273-284. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8160-3>
- Holzhauser, T., Schuler, F., Dudek, S., Kaul, S., Vieths, S., & Mahler, V. (2020). Rekombinante Allergene, Peptide und Virus-like Particles in der Immuntherapie von Allergien. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, *63*(11), 1412-1423. <https://doi.org/10.1007/s00103-020-03231-7>
- Hrabina, M., Purohit, A., Oster, J.-P., Papanikolaou, I., Jain, K., Pascal, P., Sicard, H., Gouyon, B., Moingeon, P., Pauli, G., & André, C. (2007). Standardization of an Ash (*Fraxinus excelsior*) Pollen Allergen Extract. *International Archives of Allergy and Immunology*, *142*(1), 11-18. <https://doi.org/10.1159/000095994>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 803-822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kaur, R., & Chupp, G. (2019). Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *144*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.031>

Konishi, S., Ng, C. F. S., Stickley, A., & Watanabe, C. (2016). Pollinosis and all-cause mortality among middle-aged and elderly Japanese: A population-based cohort study. *Clinical & Experimental Allergy*, 46(8), 1083-1089. <https://doi.org/10.1111/cea.12638>

Labib, B. A., & Chigbu, D. I. (2022). Therapeutic Targets in Allergic Conjunctivitis. *Pharmaceuticals*, 15(5), 547. <https://doi.org/10.3390/ph15050547>

Larenas-Linnemann, D., Michels, A., Dinger, H., Shah-Hosseini, K., Mösges, R., Arias-Cruz, A., Ambriz-Moreno, M., Barajas, M. B., Javier, R. C., Prado, M., Moreno, M. A. C., Almaráz, R. G., García-Cobas, C. Y., Garcia Imperial, D. A., Muñoz, R. G., Hernández-Colín, D., Linares-Zapien, F. J., Luna-Pech, J. A., Matta-Campos, J. J., ... Rodríguez-Ortiz, P. G. (2014). Allergen sensitization linked to climate and age, not to intermittent-persistent rhinitis in a cross-sectional cohort study in the (sub)tropics. *Clinical and Translational Allergy*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-4-20>

Larsen, J. N., & Dreborg, S. (2019). Standardization of Allergen Extracts. En P. Lympny & M. G. Jones (Eds.), *Allergy* (Vol. 2020, pp. 63-76). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9591-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9591-2_5)

Lebendiker, M., & Danieli, T. (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*, 588(2), 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.044>

Lénon, M., Ke, N., Ren, G., Meuser, M. E., Loll, P. J., Riggs, P., & Berkmen, M. (2021). A useful epitope tag derived from maltose binding protein. *Protein Science*, 30(6), 1235-1246. <https://doi.org/10.1002/pro.4088>

Liva, G. A., Karatzanis, A. D., & Prokopakis, E. P. (2021). Review of Rhinitis: Classification, Types, Pathophysiology. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3183. <https://doi.org/10.3390/jcm10143183>

Lucas, J. A., Gutierrez-Albanchez, E., Alfaya, T., Feo-Brito, F., & Gutiérrez-Mañero, F. J. (2019). Oxidative stress in ryegrass growing under different air pollution levels and its likely effects on pollen allergenicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.018>

Martin Katharine. (s. f.). *A Deep Dive Into Induction with IPTG*. <https://www.goldbio.com/articles/article/a-deep-dive-into-iptg-induction>

Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R. C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Biedermann, T., Bilò, M. B., Blank, S., Bohle, B., Bosshard, P. P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Ollert, M. (2016). EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27, 1-250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>

Morales-Amparano, M. B., Valenzuela-Corral, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Escobedo-Moratilla, A., Pastor-Palacios, G., Ovando-Vázquez, C., Teran, L. M., & Huerta-Ocampo, J. Á. (2021). Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen. *Journal of Proteomics*, 248, 104348. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104348>

Mueller, G. A., Gosavi, R. A., Pomés, A., Wünschmann, S., Moon, A. F., London, R. E., & Pedersen, L. C. (2011). Ara h 2: Crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity: Structure and IgE binding of Ara h 2. *Allergy*, 66(7), 878-885. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02532.x>

Observaciones. (s. f.). iNaturalist. Recuperado 31 de agosto de 2022, de [https://www.inaturalist.org/observations?taxon\\_id=57140](https://www.inaturalist.org/observations?taxon_id=57140)

- Okubo, K., Kurono, Y., Ichimura, K., Enomoto, T., Okamoto, Y., Kawauchi, H., Suzaki, H., Fujieda, S., & Masuyama, K. (2020). Japanese guidelines for allergic rhinitis 2020. *Allergology International*, 69(3), 331-345. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.04.001>
- Ortega-Rosas, C. I., Meza-Figueroa, D., Vidal-Solano, J. R., González-Grijalva, B., & Schiavo, B. (2021). Association of airborne particulate matter with pollen, fungal spores, and allergic symptoms in an arid urbanized area. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(5), 1761-1782. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00752-7>
- Pavón-Romero, G. F., Calderón-Ezquerro, M. del C., Rodríguez-Cervantes, M. A., Fernández-Villanueva, D., Melgoza-Ruiz, E., Ramírez-Jiménez, F., & Teran, L. M. (2022). Association of Allergic Sensitivity and Pollination in Allergic Respiratory Disease: The Role of Pollution. *Journal of Asthma and Allergy, Volume 15*, 1227-1243. <https://doi.org/10.2147/JAA.S373307>
- Pointner, L., Bethanis, A., Thaler, M., Traidl-Hoffmann, C., Gilles, S., Ferreira, F., & Aglas, L. (2020). Initiating pollen sensitization – complex source, complex mechanisms. *Clinical and Translational Allergy*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13601-020-00341-y>
- Poncet, P., Senechal, H., Clement, G., Purohit, A., Pauli, G., & Peltre, G. (2010). *Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients*. 10.
- Rahman, A., Luo, C., Khan, M. H. R., Ke, J., Thilakanayaka, V., & Kumar, S. (2019). Influence of atmospheric PM2.5, PM10, O3, CO, NO2, SO2, and meteorological factors on the concentration of airborne pollen in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, 212, 290-304. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.05.049>
- Raran-Kurussi, S., Cherry, S., Zhang, D., & Waugh, D. S. (2017). Removal of Affinity Tags with TEV Protease. En N. A. Burgess-Brown (Ed.), *Heterologous Gene Expression in E.coli* (Vol. 1586, pp. 221-230). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_14)
- Robledo-Retana, T., Mani, B. M., & Teran, L. M. (2020). Ligustrum pollen: New insights into allergic disease. *World Allergy Organization Journal*, 13(2), 100104. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100104>
- Rojas-Méndez, I. C., Arana-Muñoz, O., López-García, A. I., Rivero-Yeverino, D., Caballero-López, C. G., Papaqui-Tapia, S., Camero-Martínez, H., & Vázquez-Rojas, E. (2017). Frecuencia de reactividad cutánea hacia antígenos inhalables en pacientes con cuadro clínico de enfermedad alérgica. *Revista Alergia México*, 64(1), 7-12. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i1.185>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Sanchez, M. I., & Ting, A. Y. (2020). Directed evolution improves the catalytic efficiency of TEV protease. *Nature Methods*, 17(2), 167-174. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0665-7>
- Schatz, M., & Rosenwasser, L. (2014). The Allergic Asthma Phenotype. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(6), 645-648. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2014.09.004>
- Smith, M., Berger, U., Behrendt, H., & Bergmann, K.-C. (2014). Pollen and Pollinosis. En K.-C. Bergmann & J. Ring (Eds.), *Chemical Immunology and Allergy* (Vol. 100, pp. 228-233). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000358743>
- Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73-S80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>

- Sutton, B. J., & Davies, A. M. (2015). Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunological Reviews*, 268(1), 222-235. <https://doi.org/10.1111/imr.12340>
- Terán, L. M., & Haselbarth-López, M. M. M. (2009). *Alergia, pólenes y medio ambiente*. 145(3), 8.
- Togawa, A., Panzani, R. C., Garza, M. A., Kishikawa, R., Goldblum, R. M., & Midoro-Horiuti, T. (2006). Identification of Italian cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 97(3), 336-342. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60798-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60798-3)
- Tscheppe, A., & Breiteneder, H. (2017). Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 172(4), 187-202. <https://doi.org/10.1159/000464104>
- Wallner, M., Pichler, U., & Ferreira, F. (2013). Recombinant allergens for pollen immunotherapy. *Immunotherapy*, 5(12), 1323-1338. <https://doi.org/10.2217/imt.13.114>
- Waugh, D. S. (s. f.). *TEV Protease FAQ*. [https://pages.jh.edu/fleming/Local/Protocols/Waugh\\_TEV\\_faq.pdf](https://pages.jh.edu/fleming/Local/Protocols/Waugh_TEV_faq.pdf)
- Weber, R. W. (2014). On The Cover—Green Ash. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 112(3), A13. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.01.016>
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 80(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>