UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Química

Caracterización de epítopos conformacionales en profilinas de plantas relevantes para su reconocimiento por mAbs IgGs (anti-rHev b 8)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Maria Gabriela Teran Olvera

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química

COMITÉ TUTOR:

Dr. Enrique Ortega Soto

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria. Ciudad de México. Junio, 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México CDMX

Dra. Nuria Sánchez Puig.
Departamento de Química de Biomacromoléculas.
Correo-e: nuriasp@unam.mx, Tel: (+52) 55 56224468

María Gabriela Terán Olvera
Presente

Por este medio hago de su conocimiento que el Comité Académico en su sesión 553 realizada el 11 de abril del presente año aprobó su cambio de título de tesis por el que a continuación se menciona:
"Caracterización de epítopos conformacionales en profilinas de plantas relevantes para su reconocimiento por mAbs IgGs (anti-rHev b 8*)"*

Además designó como miembros del jurado de grado a los siguientes investigadores:

Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros	Instituto de Química	Presidente
Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química	Secretario
Edda Lydia Sciutto Conde	Instituto de Investigaciones Biomédicas	Vocal
Lorenzo Patrick Segovia Forcella	Instituto de Biotecnología	Vocal
Horacio Reyes Vivas	Instituto Nacional de Pediatría (externo)	Vocal

Agradeciendo de antemano la atención que sirva dar a la presente.

Atentamente
Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 12 de abril 2024

DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMEDICAS
COMITE ACADEMICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Ccp. Dr. Adela Rodríguez Romero.
Ccp. Dr. Armando Hernández García.
Ccp. Paula Ximena García Reynaldos.

Dedicatoria

"A mi familia que me ha inspirado a ser fuerte y luchar por mis sueños. Aunque ya no están conmigo a mis tíos amados Oscar Reyes y Martha Quiroz por su amor incondicional y ejemplo de disciplina."

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estudiar y por poner a cada una estas personas en mi camino para aprender de ellos durante este camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

A los miembros de mi comité tutoral al Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez que me guiaron y aconsejaron durante el doctorado para seguir mejorando en mi formación. Al Dr. Enrique Ortega Soto por sus consejos, retroalimentación y por permitirme colaborar en este proyecto.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por darme la oportunidad de desarrollar el doctorado en su grupo de trabajo, por su enseñanza y paciencia.

Al CONACYT por la beca 735952 y por los proyectos 2019—87163 para A.R.R. y A DGAPA-UNAM por los apoyos PAPIIT (IN208320 E.O) para A.R.R.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por su apoyo para realizar cursos y asistencia a congresos.

A los miembros del jurado del examen de grado que revisaron la tesis por sus comentarios y retroalimentación.

Al Dr. Benjamín García Ramírez, Dr. Israel Mares Mejía, Dra. Annia Rodríguez Hernández y Dra. Carol Siseth Martínez Caballero por su amistad, consejos y guianza durante el doctorado.

Al Dr. Maksymilian Chruszcz y a la Dra. Andrea O'Malley de University of South Carolina, Columbia y Michigan State University, East Lansing, USA por permitirme colaborar con este trabajo.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM, al Dr. Homero Gómez Velasco por sus consejos, enseñanzas y amistad. Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ) y la M. en C. Georgina Espinosa Pérez por su apoyo. A la Dra. Patricia Cano Sánchez por apoyo en el laboratorio de biología molecular y a Q. Eréndira García Ríos por su apoyo en los experimentos de espectrometría de masas.

A mi amigos M. en C. Miguel Alejandro Rodríguez Ramírez por su apoyo, retroalimentación, paciencia en los experimentos del laboratorio que me ayudaron a mejorar durante el doctorado, así como montar las diversas pruebas de cristalización de profilina de fresno. Asimismo, al Dr. Josaphat Miguel Montero Vargas, Dr. Juan Carlos Vizuet de Rueda, M. en C. Jessica Terrón Hernández, M. en C. Arely Martínez, M. en C. Jessica y M. en C. Jeanette Loera Ruvalcaba, Lic. Francisco Olvera Lucio, M. en C. Yahel López Reyes, Lic. Ximena Hernández Hernández, Lic. Lenin Cruz Pinacho por cada una de sus enseñanzas, críticas constructivas, retroalimentación, apoyo y amistad.

A mi padre Luis Manuel Terán porque con su ejemplo de perseverancia y experiencia me allanó el camino para terminar el doctorado. A mi madre Irma Olvera por darme confianza con sus palabras de sabiduría. A mis hermanos Adriana Terán (y familia Álvarez), Miguel Terán (y familia) por apoyarme a cumplir mis metas. De manera muy especial a mis abuelitas (Irma Olvera y María Terán) por ser mujeres fuertes de ejemplo y a mis tíos (Roxana, Marisa, Sandy, Oscarin, Fanny Oliva y familia) por ser mi fortaleza y parte de mi red de apoyo emocional. Finalmente, a Whitefeet y Hannoh por darme apoyo emocional, pues a través de ellos aprendí el amor incondicional.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS **4**

ABREVIATURAS **5**

ABSTRACT **6**

RESUMEN **8**

INTRODUCCIÓN **10**

Proceso aerobiológico de los pólenes y su impacto en la alergia respiratoria 10
Reacción de Hipersensibilidad de Tipo I 11
Mecanismo de Hipersensibilidad de Tipo I 12
Profilinas 14
Diferencias entre Inmunoglobulinas IgE e IgGs y su implicación en la alergia 19

ANTECEDENTES **22**

JUSTIFICACIÓN **27**

HIPOTESIS **27**

OBJETIVO **28**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. PRIMERA PARTE **28**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. SEGUNDA PARTE **28**

METODOLOGIA. PRIMERA PARTE **29**

2.1 Purificación de anticuerpos monoclonales murinos (anti-rHev b 8) IgGs1B4 y 2D10 29
2.2 Profilinas recombinantes rArt v 4, rAmb a 8, rPhl p 12, rBet v 2, rFra e 2 29
2.3 Reconocimiento de profilinas de plantas (rArt v 4, rAmb a 8, rPhl p 12, rBet v 2 y rFra e 2) por mAbs IgGs 2D10 y 1B4 (anti-rHev b 8) 29
2.4 Caracterización de sitios de reconocimiento de los mAbs (1B4 y 2D10) con las mutantes rZea m 12 30
2.5 Evaluación del reconocimiento de las mutantes de rZea m 12 con sueros de pacientes alérgicos al maíz 30
2.6 Análisis estadísticos 30
2.7 Análisis computacional 31

METODOLOGIA. SEGUNDA PARTE **31**

2.8 Purificación de profilina del polen de fresno 31
2.9 Construcción del gen para la expresión del alérgeno rFra e 2.2 31
2.10 Sobreexpresión y purificación de rFra e 2 32
2.11 Caracterización de estructura secundaria de rFra e 2 mediante dicroísmo circular 33
2.12 Determinación del pH de mayor estabilidad de rFra e 2 mediante termofluorescencia 33
2.13 Pruebas de cristalización de rFra e 2 34
2.14 Obtención del modelos de rFra e 2.2 con Alphafold 34

RESULTADOS. PRIMERA PARTE **35**

3.1 Purificación del mAb de 2D10 35
3.2 Curva de titulación del mAb anti-rHev b 8 (2D10) con rHev b 8 35
3.3 Evaluación del reconocimiento de los mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 2D10 y 1B4 por las profilinas alergénicas de plantas 36

3.4 Caracterización de los sitios de reconocimiento de los mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 1B4 y 2D10 con las dos mutantes de profilina de maíz (rZea m 12)....37
3.5 Evaluación del reconocimiento de IgE de sueros de pacientes alérgicos al látex y maíz con las mutantes rZea m 12 39
3.6 Mapeo de sitios de reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (Anti-rHev b 8) en las secuencias de aminoácidos de profilinas de plantas....40
3.7 Elementos estructurales relevantes en profilinas de plantas para el reconocimiento por el mAb 2D10 (Anti-rHev b 8) 43
3.8 Análisis de la superficie electrostática entre las profilinas de plantas 44

RESULTADOS. SEGUNDA PARTE. 45

3.9 Sobreexpresión de rFra e 2.2 45
3.10 Purificación rFra e2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas y espectrometría masas 45
3.11 rFra e 2.2 y espectrometría de masas 46
3.12 Caracterización bioquímica de rFra e 2.2....46
3.13 Estabilidad térmica de rFra e 2.2 47
3.14 Pruebas de cristalización 48
3.15 Análisis estructural del modelo de Fra e 2 con Hev b 8 (PDB:5FDS) 48

DISCUSIÓN. PRIMERA PARTE. 50

DISCUSIÓN. SEGUNDA PARTE. 53

CONCLUSIONES....55

PERSPECTIVAS 56

REFERENCIAS 57

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Proceso aerobiológico.. 10
Figura 2. Mecanismo de la reacción de Hipersensibilidad Tipo I.....13
Figura 3. Alineamiento de secuencias de profilinas alergénicas de diferentes fuentes.. 14
Figura 4. Estructura cristalográfica de la profilina de hule (Hev b 8 – PDB:5FDS) y su topología.....15
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de anticuerpos IgGs e IgE humanos, y sus glicosilaciones.....20
Figura 6. Interacciones relevantes que estabilizan el complejo Fab 2F5/IgE - rHev b 8.....23
Figura 7. Residuos diferentes entre las profilinas Hev b 8 y Zea m 12.. 24
Figura 8. Diagrama de listones del acoplamiento molecular teórico de los Fv de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 con rHev b 8 (PDB 5FDS). 25
Figura 9. Nueva construcción para la expresión de rFra e 2.2 en el véctor original pET-28a(+).....31
Figura 10. Purificación del mAb 2D10 por afinidad a una resina Affi-gel 15 unido a rHev b 8.. 35
Figura 11. Curva de titulación del mAb 2D10 y 1B4 contra rHev b 8.....36
Figura 12. Evaluación del reconocimiento de los mAbs (anti-rHev b 8) IgGs 2D10 y 1B4 hacia las profilinas alergénicas de plantas.. 37
Figura 13. Caracterización de sitios de reconocimiento de los mAbs (1B4 y 2D10) con mutantes rZea m 12.....38
Figura 14. Unión específica de IgE a rHev b 8, rZea m 12 y mutantes rZea m 12.. 39
Figura 15. Mapeo de sitios de reconocimiento de los mAbs 2D10 y 1B4 en secuencias de profilinas de plantas.. 40
Figura 16. Comparación de la estructura tridimensional de profilinas de plantas entre las reconocidas y menos reconocidas por mAb 2D10.. 43
Figura 17. Comparación del potencial electrostático de profilinas plantas.. 44
Figura 18. Cinética de expresión de rFra e 2.2.. 45
Figura 19. Purificación de rFra e 2.2 fusionado a la estiqueta de histidinas.. 45
Figura 20. Espectro de masas de rFra e 2.2 purificada, sin la etiqueta de histidinas.. 46
Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de rFra e 2.2 en la región del UV-lejano.. 47
Figura 22. Condiciones de mayor estabilidad térmica de rFra e 2.2 donde se indica la temperatura de fusión (Tm) en °C. 47
Figura 23. Esférulos de rFra e 2.2 en 100 mM acetato de sodio pH 4, 2M $(NH_4)_2SO_4$. 48
Figura 24. Modelo de rFra e 2 obtenido con Alphafold. 48
Figura 25. Residuos diferentes en el sitio de reconocimiento teórico de mAb 2D10 en las profilinas Fra e 2 y Hev b 8.....49

Tabla 1- Profilinas de plantas reportadas como alérgenos por la IUIS 18
Tabla 2-Comparación de los diferentes residuos en el sitio teórico del mAb 2D10 con el reconocimiento obtenido por las profilinas de plantas 42
Tabla 3-Comparación de los diferentes residuos en el sitio teórico del mAb 1B4 con el reconocimiento obtenido por las profilinas de plantas 42

ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etillbenzotiazolin-6-sulfónico)
BLI: interferometría de biocapa (por sus siglas en ingles Biolayer Interferometry)
CDR: Región determinante de complementaridad
CCL2: quimiocina motivo C-C ligando 2 o proteína quimioatrayente de monocitos
CXCL8:quimiocina motivo C-X-C ligando – 8
DSF: Fluorimetría diferencial de barrido
DTT: Ditiotreitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (acrónimo del inglés Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay)
Fab: Fabs (Fab, del inglés Fragment antigen-binding)
FBS: suero fetal bovino
Fc: Fracción cristalizables
FcεRI: Receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E
FcεRII: Receptor de baja afinidad para inmunoglobulina E (CD23)
FD:Fracción desplegable
FUC:Fucosa
Fv:Fragmentos variables
GAL: galactosa
HRP: Marcado con peroxidasa de rábano picante
IgE: Innmunoglobulina E
IgG: Innmunoglobulina G
LTB4: leucotrieno B4
IUIS: Sociedad Internacional de las Sociedades Inmunológicas (acrónimo del inglés International Union of Immunological Societies)
K_D:Constante de afinidad
Ka: constante de velocidad de asociación
mAb: anticuerpo monoclonal murino
MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption-Time of flight por sus siglas en inglés
MAN:Manosa
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
NAG: N-acetilglucosamina
NLR: Receptores Tipo NOD
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAR: patrones de reconocimiento
PBS: Amortiguador salino de fosfatos
PDB: Protein data bank
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride)
PRR: patrones de reconocimiento
rAmb b 8: isoforma recombinante Amb b 8.0101
rArt v 4: isoforma recombinante Art v 4.0101
rBet v 2: isoforma recombinante Bet v 2.0101
rFra e 2: isoforma recombinante Fra e 2.2
rHev b 8: isoforma recombinante Hev b 8.0102
rPhl p 12: isoforma recombinante Phl p 12.0101
rZea m 12: isoforma recombinante Zea m 12.0105
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute (en inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*)
SIA: ácido siálico.
TEV: proteasa del virus del tabaco, Tobacco Etch Virus (TEV)
Th0: Linfocitos T ayudadores vírgenes
Th2: Linfocitos T ayudadores tipo II
TLR4: receptores de tipo Toll
TM: temperatura de fusion por sus siglas en ingles melting temperature
TSLP: linfopoyetina estromal tímica, por las iniciales de su denominación en inglés (Thymic Stromal Lymphopoietin)
VH: Cadena pesada
VL: Cadena ligera
WAO: Organización Mundial de Alergia (en inglés Allergy Organization).

ABSTRACT
Pollen profilins are an important cause of respiratory allergies, such as rhinoconjunctivitis and asthma. In general, profilins are ubiquitous allergens with conserved structural elements, and exposure to profilins from diverse sources leads to IgE-cross-reactivity and the pollen–latex–food syndrome. It has also been reported that respiratory allergic patients to pollen profilins may develop another allergic response, including oral allergic syndrome and anaphylaxis. These highlight the importance of plant profilin sensitization in allergic diseases.

Monoclonal antibodies (mAbs) against specific allergens have become effective biological tools for diagnosis and IgE-epitope mapping. They are used in immunotherapy for respiratory allergic patients, such as those suffering from chronic rhinitis and asthma. We generated murine monoclonal antibodies (mAbs) IgE 2F5 and IgGs 1B4, and 2D10, against latex profilin (anti-rHev b 8). Recently, we reported structural studies of Fab 2F5/IgE in complex with recombinant latex profilin (rHev b 8) (PDB 7SBD). We identified the relevant interactions that stabilize the complex and the Hev b 8 conformational epitopes at α-helices 1 and 3, including residue N98 from the loop that connects β-strands 6 and 7. To prove if these residues are involved in IgE cross-reactivity, we used maize profilin (Zea m 12), which mAb 2F5/IgE did not recognize, and which differences in these amino acids: Hev b 8 has N98 and D128, while rZea m 12 has G98 and E128. Therefore, we generated two rZea m 12 mutants: E128D and the double mutant G98N-E128D, and evaluated the recognition with mAb 2F5/IgE, which resulted in 16% with the single mutant rZea m 12, while the double mutant showed 56% IgE/2F5 recognition, compared to rHev b 8 recognition. However, the mAbs IgGs 1B4, and 2D10 inhibit the interaction of IgE and IgG_4 antibodies from sera of latex- and maize-allergic patients by 90% and 40%, respectively. Their recognition with other plant profilins has not been evaluated nor analyzed at the structural level, which may explain the basis of the cross-reactivity of profilins.

Therefore, we evaluated mAbs 1B4 and 2D10 recognition towards different plant profilins. Interestingly, mAb 2D10 highly recognized rArt v 4.0101 from *Artemisia vulgaris* (mugwort) and rAmb a 8.0101 from *Ambrosia artemisiifolia* (ragweed), and to a lesser extent, rBet v 2.0101 from *Betula verrucosa* (birch tree), and rFra e 2.2 from *Fraxinus excelsior* (ash tree), while 1B4 showed recognition for rPhl p 12.0101 from *Phleum pratense* (weed Timothy) and rAmb a 8.0101.

Furthermore, we used maize profilin mutants rZea m 12 Glu128Asp and the double mutant Gly98Asn-Glu128Asp to characterize the mAbs recognition site. mAb 2D10 recognizes Asp130

in the α-helix 3 in profilins, while IgE from latex and maize allergic patients' sera recognizes Asn98. The structural analysis suggests that the profilins containing Glu130 (rPhl p 12.0101, rFra e 2.2, and rZea m 12.0105) show less binding with mAb 2D10. The distribution of negative charges on the profilins' surfaces at the α-helices 1 and 3 are relevant for the 2D10 recognition and explain profilins' IgE cross-reactivity. Specific mAbs showing high recognition for diverse profilins may represent a promising tool in the allergy field for diagnosis, immuno-localization studies, and even the development of personalized immunotherapy.

RESUMEN

Las profilinas de pólenes son una causa importante de enfermedades respiratorias alérgicas, como son rinitis alérgica y asma. Estas proteínas son panalérgenos, debido a su ubicuidad y a su estructura terciaria conservada, responsables del síndrome polen-látex-frutos. Es decir, aquellos individuos que presentan enfermedades respiratorias alérgicas a profilinas de pólenes pueden desarrollar otra respuesta alérgica a profilinas de alimentos, manifestando el síndrome oral alérgico o un caso más grave como la anafilaxia.

Actualmente, el uso de biológicos son una herramienta importante para el tratamiento de pacientes alérgicos. Un ejemplo importante son los anticuerpos monoclonales (mAb) contra alérgenos específicos, que constituyen una herramienta eficaz para el diagnóstico y el mapeo de epítopos conformacionales de IgE. En nuestro grupo de trabajo se produjo un conjunto de anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) contra la profilina del látex de *Hevea brasiliensis* (anti-rHev b 8) que fueron IgE/2F5 y dos IgGs 1B4 y 2D10. Se hicieron estudios estructurales del complejo Fab IgE/2F5-rHev b 8 (profilina de látex recombinante) y se identificó que los residuos Asp128, que está en la hélice α-3, y Asn98 que conecta las hebras β - 6 y 7 estabilizan el complejo. Para identificar si estos residuos participaban en la reactividad cruzada, se usó profilina de maíz (rZea m 12), que no fue reconocida por IgE/2F5, y se identificaron diferencias en estos aminoácidos: Hev b 8 tiene Asn98 y Asp128, mientras que rZea m 12 tiene Gly98 y Glu128. Por lo tanto, se generaron dos mutantes: la mutante sencillas rZea m 12: Glu128Asp y la doble mutante Gly98Asn-Glu128Asp, y se evaluó el reconocimiento con mAb IgE/2F5. El resultado fue que la mutante simple fue reconocida en un 16%, mientras que la doble mutante mostró un 56%, en comparación con el control rHev b 8. Mientras que los mAbs 1B4 y 2D10 mostraron una inhibición en la interacción de los anticuerpos IgE e IgG_4 de sueros de pacientes alérgicos al látex en un 90 % y al maíz en un 40%.

Además, el uso de las mutantes de profilinas de maíz rZea m 12 (Glu128Asp y la doble mutante Gly98Asn-Glu128Asp) permitió la caracterización de una parte del epítopo reconocido por 2D10, que es el residuo Asp130 presente en la hélice α-3 de las profilinas estudiadas. Por otra parte, el residuo Asn98 es reconocido por IgE de sueros de pacientes alérgicos a látex y maíz. El análisis estructural de profilinas de plantas sugiere que aquellas que contienen el residuo Glu130 (rPhl p 12.0101, rFra e 2.2 y rZea m 12.0105) son las que muestran menor unión con el mAb 2D10. Asimismo, hipotetizamos que el mAb 2D10 reconoce un área con una distribución de cargas negativas en las superficies de las hélices α-1 y 3 de las profilinas, lo que es relevante para

explicar la reactividad cruzada con las IgE. Por tanto, el uso de mAbs IgGs con la capacidad de reconocer distintas profilinas de plantas pueden ser una herramienta en el diagnóstico, mapeo de determinantes antigénicos e incluso el desarrollo de inmunoterapias personalizadas para pacientes alérgicos a profilinas.

INTRODUCCIÓN

Proceso aerobiológico de los pólenes y su impacto en la alergia respiratoria

El proceso aerobiológico es inducido por un conjunto de factores meteorológicos como temperatura, precipitación, humedad que influyen en el período de floración de las plantas y la maduración de granos de polen, Figura 1 (Lacey, 1996).

Los granos de polen son gametofitos presentes en las anteras de la flor en plantas, que al madurarse, se desprenden para la fecundación o polinización (Taketomi et al., 2006). Esta última, ocurre de dos maneras: entomófila, donde una variedad de insectos y aves transportan los granos de polen, y anemófila, donde el viento es el principal agente polinizador (Cecchi, 2013). La liberación y dispersión de granos de polen en la atmósfera impacta en la vía aéreas de los individuos, siendo la fuente principal de aeroalérgenos extradomiciliarios que sensibilizan a los individuos susceptibles causando enfermedades respiratorias alérgicas como rinitis, conjuntivitis, dermatitis y asma, Figura 1 (Brożek et al., 2017).

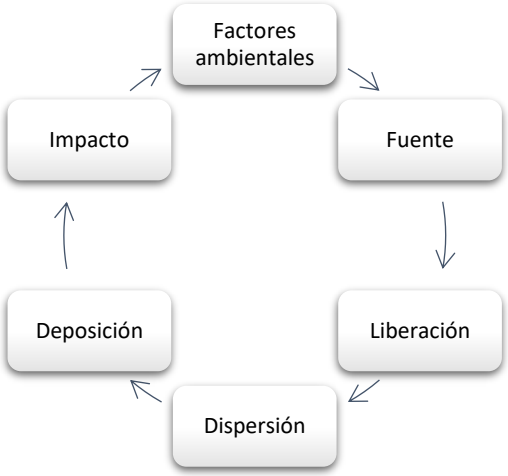

Figura 1. Proceso aerobiológico. Un conjunto de factores meteorológicos influye en la liberación y dispersión de granos de polen que son liberados a la atmósfera e impactan en las vías respiratorias de los individuos.

Reacción de Hipersensibilidad de Tipo I

Las enfermedades alérgicas son un problema de salud pública que padece el 40% de la población mundial, y según la Organización Mundial de Alergia (WAO) el número de pacientes con enfermedades alérgicas se incrementa en un 50% cada 10 años (Pawankar et al., 2012); por lo tanto, se estima que en el 2050 unos 4 mil millones de individuos sufrirán alergias (EAACI, 2014). La constante exposición a los aeroalérgenos en individuos susceptibles desarrolla enfermedades respiratorias alérgicas como rino-conjuntivitis, que es frecuente en un 40% a nivel mundial, y que llega a agravarse a una asma severa. En regiones urbanas la prevalencia alérgica a pólenes de plantas es del 60%, y esto tiene un gran impacto en los pacientes (Burbach et al., 2009).

La reacción de Hipersensibilidad de Tipo I se define como una respuesta exacerbada del sistema inmune de un individuo con predisposición genética (atopia), donde se producen anticuerpos IgE que reconocen proteínas inocuas generando reacciones alérgicas. Estos alérgenos pueden provenir de ácaros, alimentos, cucarachas, hongos, caspa de animales, látex, pólenes, veneno de abejas y avispas, entre otros.

Una de las principales fuentes de sensibilización a aeroalérgenos exteriores son los pólenes (Osterballe et al., 2005; De Roos et al., 2020; Shrestha et al., 2018). En Estados Unidos se ha reportado que son las principales fuentes de sensibilización en niños (malezas en un 91%, árboles en un 83% y pastos en un 82%) (Guryanova et al., 2022). Asimismo, al estar en contacto con dichos alérgenos vía inhalatoria, inducen al desarrollo de enfermedades alérgicas, tales como rino-conjuntivitis y asma (Kim et al., 2019; Wassmann-Otto et al., 2018). La constante exposición del individuos susceptibles a estos alérgenos pueden llegar a agravarse, siendo algunas a veces necesaria la hospitalización por crisis asmática (Erbas B et al. 2007) (Newson R et al. 1997) (Nitschke M et al. 2022). Por estas razones, las enfermedades alérgicas son un factor de riesgo que impactan en la calidad de vida del paciente, no solo a nivel socioeconómico, sino también en la morbilidad y mortalidad (Pawankar et al., 2012; Lai et al., 2009).

Mecanismo de Hipersensibilidad de Tipo I

El primer paso de la reacción de Hipersensibilidad tipo I es la sensibilización del individuo al alérgeno. Los pólenes al ser inhalados entran en contacto con las mucosas del epitelio respiratorio, la humedad de las mucosas promueve la hidratación del polen, así como la liberación de moléculas bioactivas, es decir, alérgenos proteicos que desestabilizan la integridad de la barrera epitelial (Taketomi et al., 2006; González Roldán et al., 2019; Obersteiner et al., 2016). Los alérgenos que atraviesan el epitelio respiratorio, vía transcelular, activan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores de tipo Toll (TLR4), Receptores Tipo NOD (NLR) y el receptor activador de proteasas (PAR) (Bergougnan et al., 2020).

La activación de PRR conlleva al reclutamiento de células dendríticas que endocita a los alérgenos (Knight and Holgate et al. 2003). Asimismo, las células epiteliales sintetizan citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNFα), y alarminas pro-alérgicas, como la Linfopoyetina del Estroma Tímico (TSLP), IL-33 e IL-25 (Bergougnan et al., 2020). La síntesis de TSLP activa a células dendríticas, macrófagos, y a su vez a las células T para que produzcan citocinas IL-4 y IL-13, siendo éstas últimas de gran importancia para la iniciación de la respuesta de linfocitos T (Th2) (Lee et al., 2014; Liu, 2009: Al-Ghouleh et al., 2012).

Las células dendríticas maduras que hayan capturado al alérgeno migran al ganglio linfático y exhiben los péptidos del alérgeno procesados a los linfocitos T vírgenes (Th0) $CD4^+$, mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II (MHC II). Estos Th0 se diferencian de los linfocitos Th2 por la expresión de interleucinas IL-4 y IL-13, que se activan mediante las siguientes: señales del gen transductor de señales STAT-6 (del inglés Signal transducer and activator of transcription 6) y de factores de transcripción (GATA-3) vía intracelular (Conejero et al., 2007).

La presencia de IL-4 y IL-13 activa la respuesta humoral y promueven la interacción entre linfocitos Th2 y el linfocito B, a través de las moléculas co-estimuladoras (linfocitos T: CD40L, CD28 y linfocito B: CD40 y CD80 o CD86), fundamentales para que el linfocito B genere el cambio de isotipo y produzca anticuerpos IgE alérgeno-específicos (Figura 2). Estos anticuerpos producidos migran al torrente sanguíneo y sensibilizan a las células efectoras (mastocitos, basófilos y eosinófilos) mediante su unión a los receptores específicos de alta afinidad (FcεRI) y receptores específicos de baja afinidad (FcεRII o CD23) (Galli et al., 2008).

Ante una re-exposición con el aeroalérgeno, activan la fase temprana en cuestión de segundos a minutos. En esta fase, las células efectoras sensibilizadas reconocen al alérgeno y, mediante

la formación del complejo receptor de alta afinidad (FcεRI), la IgE y el alérgeno, que desencadena la activación de señales intracelulares liberando mediadores de la inflamación como: histamina, prostaglandinas, leucotrienos, triptasa, citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, responsables de causar las enfermedades alérgicas (Galli et al., 2008; Bischoff, 2007).

La fase tardía ocurre usualmente de 2 a 6 horas después de la fase-temprana. Los mediadores inflamatorios liberados son: IL-4, IL-13, IL-8, TNF-α (factor de necrosis tumoral α), LTB4 (leucotrieno B4), CXCL8 (quimiocina motivo C-X-C ligando – 8), CCL2 (quimiocina motivo C-C ligando 2). Estos mediadores de la inflamación reclutan células Th2, eosinófilos, basófilos y monocitos, que mantienen la activación y proliferación de las células efectoras, y una persistente desgranulación de las células. Esto último contribuye a las manifestaciones clínicas como son vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular e incremento de la mucosa (Galli et al., 2008).

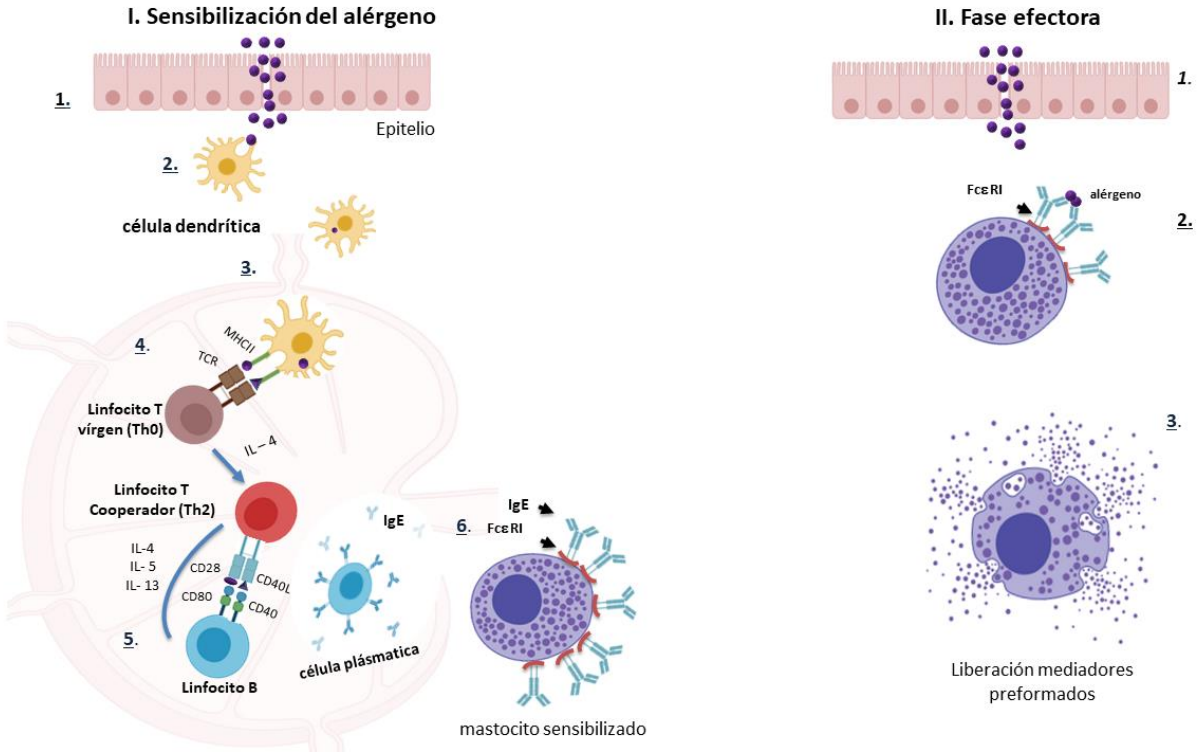

Figura 2. Mecanismo de la reacción de Hipersensibilidad Tipo I. I) Fase de sensibilización. 1. Exposición al alérgeno: Las proteínas alergénicas entran en contacto con las mucosas sensibilizando el tracto digestivo, epitelio respiratorio y piel. 2. Captura y procesamiento del alérgeno: Las células dendríticas capturan a las proteínas alergénicas y procesan al antígeno vía endososomal. 3. Las células dendríticas maduras migran al ganglio linfático. 4. Presentación del antígeno a los linfocitos T: Las células dendríticas presentan los péptidos procesados mediante el complejo MHC II y el receptor TCR de los linfocitos T vírgenes (Th0), la producción de citocinas IL-4, IL-5 y IL-13 inducen la respuesta humoral y permite la diferenciación del linfocito Th0 a un

linfocito cooperador de tipo (Th2). 5. Los linfocitos Th2 presentan el antígeno a los linfocitos B mediante la interacción de moléculas co-estimuladoras. Esta interacción conlleva al cambio de isotipo para la producción de anticuerpos IgE alérgeno-específicos. 6. Sensibilización de células efectoras: Los anticuerpos IgE alérgeno-específicos se unen a las células efectoras (mastocitos, basófilos y eosinófilos) a través de los receptores de alta afinidad FcεRI para sensibilizarlas ante una segunda re-exposición. II) Fase efectora: 1. Re-exposición al alérgeno. 2. Reconocimiento de alérgenos por los anticuerpos IgE unidos a células efectoras. 3. Desgranulación del mastocito y liberación de mediadores de la inflamación como histamina, leucotrienos, citocinas, entre otros.

Profilinas

Las profilinas son panalérgenos de 12-15 KDa, son ubicuas, ya que están presentes en plantas, levaduras, animales, protozoos e incluso en humanos y virus. Estas proteínas presentan un alto porcentaje de similitud en su secuencia de aminoácidos (75-80%), por lo tanto, tienen una estructura tridimensional conservada, Figura 3 (Hauser et al., 2010; Jockusch et al., 2007).

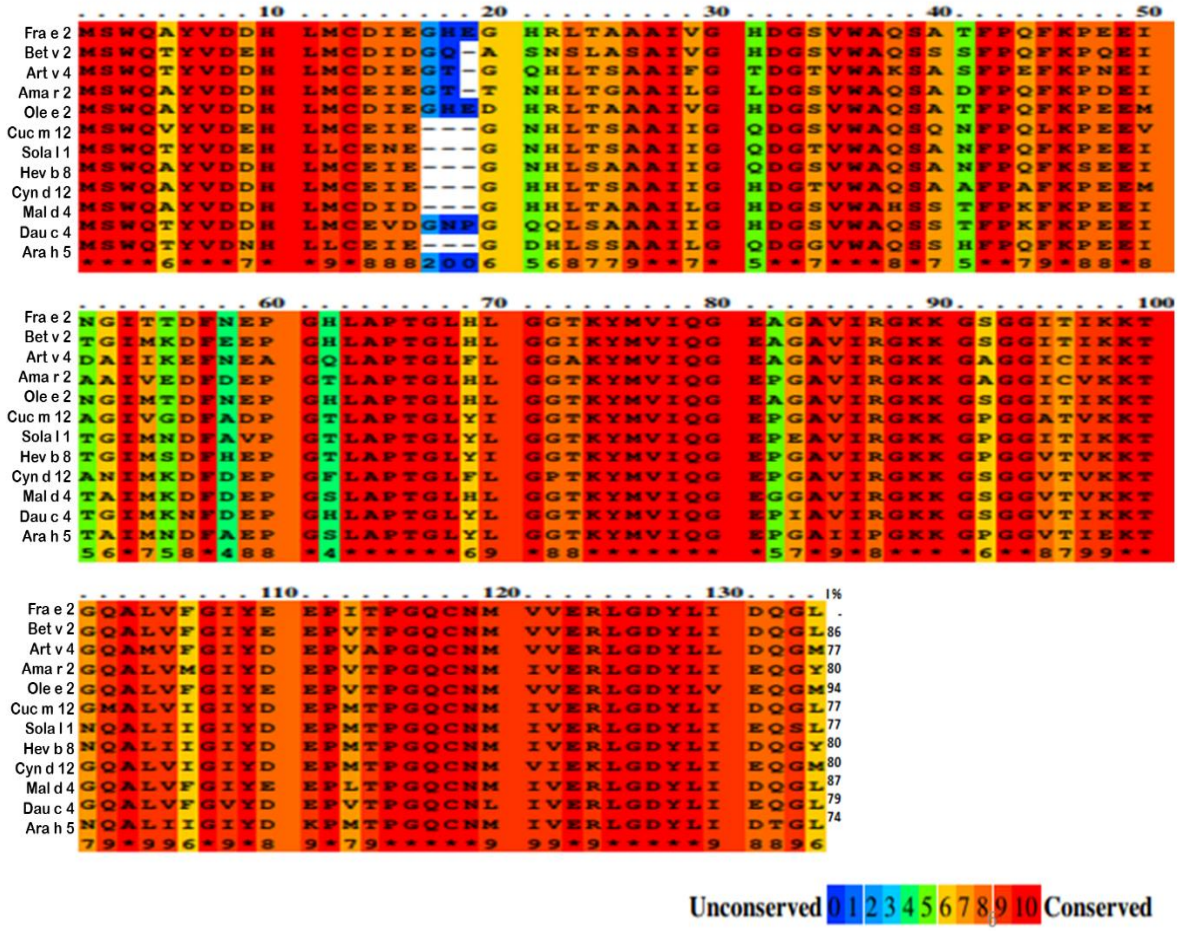

Figura 3. Alineamiento de secuencias de profilinas alergénicas de diferentes fuentes. En rojo están subrayadas las regiones conservadas y de amarillo a azul las menos conservadas. Las profilinas comparadas son Fra e 2 de Fresno-*Fraxinus excelsior*; Bet v 2 de abedul-*Betula verrucosa*, Art v 4 de ajenjo- Artemisia absinthium; Ama r 2 de amaranto- Amaranthus; Ole e 2

de olivo- Olea europaea; Cum m 1 de melón-*Cucumis melo*, Sola l 1 de tomate-Solanum lycopersicum; Hev b 8 de hule-*Hevea brasilensis*; Cyn d 12 de pasto Bermuda- *Cynodon dactylon* ; Mal d 4 de manzana-Malus domestica; Dau c 4 de zanahoria-*Daucus carota*; y Arah 5 de cacahuate- *Arachis hypogaea*.

La estructura tridimensional de las profilinas se caracteriza por presentar 3 hélices α, y 7 hebras β anti-paralelas que forman una hoja β, que están conectadas mediante giros y 3 asas (Thorn et al., 1997), (Figura 4).

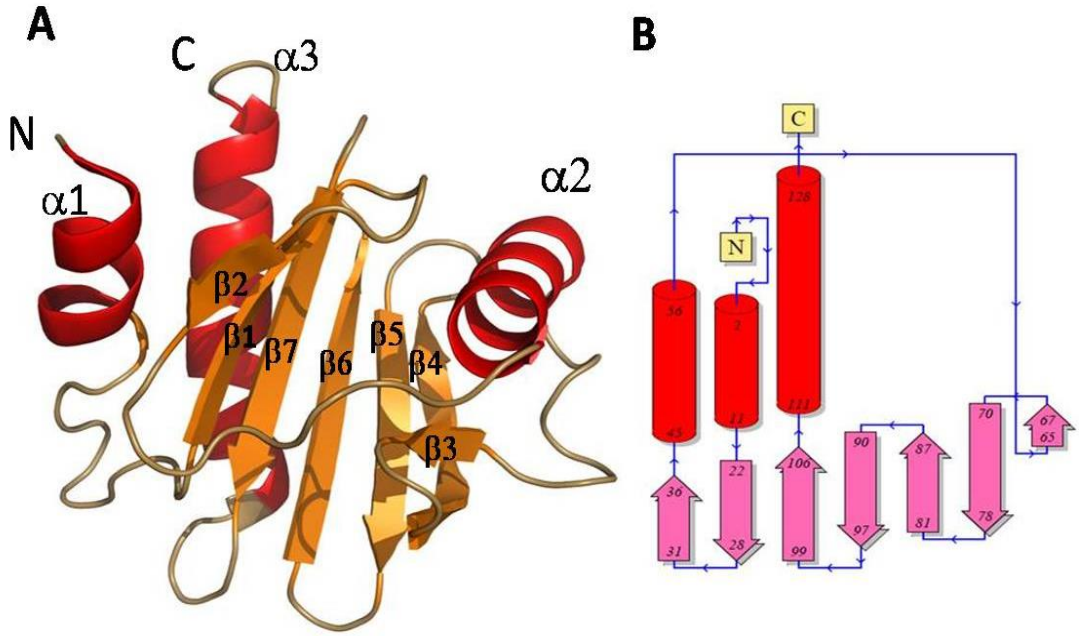

Figura 4. Estructura cristalográfica de la profilina de hule (Hev b 8 – PDB:5FDS) y su topología. **A)** Plegamiento común de las profilinas: en rojo las 3 hélices α y en naranja las 7 hebras β-plegadas anti-paralelas que forman una hoja beta, con sus respectivos giros y asas conectoras. **B)** Topología estructural de Hev b 8 (PDBsum EMBL-EBI).

Las profilinas pueden presentar epítopos lineales que son péptidos cortos de la secuencia de aminoácidos, los cuales también se conocen como epítopos continuos. En cambio, los epítopos conformacionales o discontinuos son regiones en la superficie del alérgeno plegado. En el caso de aeroalérgenos, su estructura tridimensional es vital para su reconocimiento por las IgE. Por esto, es relevante estudiar la estructura de las profilinas, ya que nos permite identificar los aminoácidos que están más expuestos en su superficie que pueden interaccionar con el anticuerpo y, de esta forma, mapear de epítopos conformacionales. Asimismo, los alineamientos estructurales entre el mismo alérgeno de diferentes fuentes permiten predecir residuos similares que pueden ser claves en la reactividad cruzada con IgE (Dall'antonia F et al. 2016).

En general, las técnicas utilizadas para mapeo de epítopos son métodos de competencia entre alérgenos, la modificación de antígenos, el uso de péptidos sintéticos, que se combinan con estudios *in silico* para la predicción de epítopos. Por otro lado, para el mapeo de epítopos conformacionales, la cristalografía de proteínas es una de las técnicas más precisas para determinar las interacciones entre alérgeno-anticuerpo. Así también, las técnicas de resonancia magnética nuclear y la criomicroscopía electrónica permiten determinar las interacciones entre proteínas (Dall'antonia F et al. 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS, por sus siglas en inglés International Union of Immunological Societies) ha designado una nomenclatura específica para alérgenos, (www.allergen.org) (Chapman et al., 2007), donde se utilizan las tres primeras letras del género (ejemplo: Bet de *Betula*), la primera letra de la especie (ejemplo: v de *verrucosa*) y un número de acuerdo con el orden consecutivo de descubrimiento, ejemplo: Bet v 2. Las profilinas reportadas en la base de datos de alérgenos de www.allergen.org y https://www.allergome.org/ se encuentran en Tabla 1.

La expresión abundante de profilinas en pólenes, así como su ubicuidad conlleva a que el polen sea la principal fuente de sensibilización en un individuo con atopia (Guillén et al., 2001; Morales et al., 2008). Por lo tanto, las profilinas presentes en pólenes están asociadas a enfermedades alérgicas respiratorias, tales como rinoconjuntivitis y asma (Ruiz-Hornillos et al., 2020). Además, la estructura tridimensional conservada de las profilinas conlleva a que los epítopos conformacionales sean conservados, por lo tanto, las profilinas homólogas son reconocidas por anticuerpos IgE, lo que se conoce como reactividad-cruzada. Es decir, un individuo que sea sensibilizado vía inhalación a una profilina, en una subsecuente exposición a este mismo alérgenos de diferente fuente vía ingestión, inhalación y/o contacto, los anticuerpos IgE reconocen epítopos similares de las profilinas, desencadenando la degranulación del mastocito y basófilo, generando las enfermedades clínicas de la alergia (Radauer et al., 2006). Por lo tanto, la sensibilización a profilinas de pólenes de plantas en individuos susceptibles hace que sean marcadores importantes en la reactividad cruzada (Huertas et al. 2014).

La interacción de anticuerpos IgE anti-profilina desencadena múltiples reacciones alérgicas, dependiendo de la fuente de exposición. Por lo tanto, los pacientes con enfermedades respiratorias alérgicas, también pueden desarrollar otras respuestas a profilinas de alimentos, condición denominada como Síndrome Oral Alérgico (Ferreira, 2004). Este síndrome provoca signos localizados en la mucosa oral y en vías respiratorias superiores que son: urticaria, dolor punzante, edema vascular en los labios, lengua y paladar, y en la zona nasofaríngea, edema

generalizado, prurito y sensación de presión en la garganta. También incluye manifestaciones sistémicas como náusea y dolor abdominal (Kondo & Urisu, 2009) o bien, la manifestación más grave que es la anafilaxia (Nucera et al., 2016). Esto resalta la importancia de la sensibilización a profilinas de plantas en las enfermedades alérgicas (Ruiz-Hornillos et al., 2020).

En el sur de Europa se ha reportado que del 20 al 30% de individuos alérgicos son positivos a profilinas (Barderas et al., 2004). Los pastos son la principal fuente de sensibilización a profilinas en individuos susceptibles, ya que estos tienen una amplia distribución en el mundo (Europa, EUA, Asia, Australia y Nueva Zelanda) (Ruiz-García et al., 2011). En pacientes alérgicos a *Phleum pratense* (82 niños y 42 adultos) el 12.5% de adultos y el 22% de niños fueron alérgicos a Phl p 12 (Sekerkova et al., 2012). También las profilinas de malezas son una fuente importante que causa enfermedades alérgicas, como son Amb a 8 de ambrosía *(Ambrosia artemisiifolia)* y Art v 4 (*Artemisia vulgaris)* de *artemisa*. Especialmente, en Europa, Art v 4 tiene una prevalencia del 34-36%, y estas dos últimas comparten un 89% en la identidad en su secuencia de aminoácidos, lo que conlleva a su reactividad cruzada con IgE de pacientes alérgicos (Cudowska et al., 2020).

La segunda fuente de sensibilización a profilinas relevantes son los pólenes de árboles. En 1992, Valenta y colaboradores caracterizaron a la primera profilina (Bet v 2) del polen del abedul (*Betula verrucosa*), que se ha reportado su amplia reactividad cruzada con otras profilinas de distintas fuentes que incluyen pólenes, alimentos, látex y pastos. Es por esto, que se estableció como un marcador importante de sensibilización en pacientes alérgicos (Wolbing F *et al*. 2017). Así como Bet v 2, Fra e 2 es una profilina abundante en el polen del fresno (*Fraxinus*), árbol distribuido en distribuido en Europa, Asia y América (Calderón-Ezquerro et al., 2018). En la Ciudad de México se estima que el 80% de árboles pertenecen a la familia de *Fraxinus uhdei* y *Ligustrum lucidum* (árbol del trueno), pues estos se utilizan para la forestación de áreas urbanas con alta contaminación (Sánchez-Landero, 2013). De *Fraxinus excelsior* se han reportado dos isoformas de profilina (rFra e 2.1 y rFra e 2.2) con una identidad de secuencia del 72%, del cual únicamente se caracterizó la primera isoforma. En Francia, de un grupo de 25 pacientes alérgicos al fresno el 52 % fueron alérgicos a Fra e 2 (S. Mas et al., 2014). Además, se ha reportado reactividad cruzada de profilinas de fresno, olivo, malezas, abedul y maíz, indicando que comparten epítopos conformacionales (Ledesma et al., 1998; Hrabina et al., 2006).

Tabla 1- Profilinas de plantas reportadas como alérgenos por la IUIS					
Pólenes		**Alimentos**		**Látex**	
Alérgeno	**Nombre común**	**Alérgeno**	**Nombre común**	**Alérgeno**	**Nombre común**
Bet v 2	abedul	Act d 9	kiwi	Hev b 8	Árbol de hule
Car b 2	abedulillo	Ana c 1	piña		
Fra e 2	fresno	Cit s 2	naranja		
Ole e 2	olivo	Cum m 2	melón		
Pho d 2	palmera datilera	Fra a 4	fresa		
Aca f 2	acacia farnesiana	Lit c 1	litchi		
Cyn d 12	césped	Mal d 4	manzana		
Lol p 12	Ballico annual	Mus a 1	plátano		
Phl p 12	gráminea	Pru du 4	almendra		
Poa p 12	espiguilla	Pru av 4	cereza		
Amb a 8	ambrosia	Pru p 4	durazno		
Art v 4	artemisa	Pyr c 4	pera		
Che a 2	quinuilla - *Chenopodiaceae*	Api g 4	apio		
Hel a 2	girasol	Cap a 2	pimiento		
Mer a 1	mercurial	Dau c 4	zanahoria		
Par j 3	pelitre esparcido	Zea m 12	maíz		
Koc s 2	*arbusto - Kochia scoparia*	Gly m 3	soya		
		Ara h 5	cacahuate		
		Cor a 2	avellana		
		Ama r 2	amaranto		
		Cro s 2	azafrán		
		Hor v 12	trigo		
		Ory s 12	arroz		

Nota: Las profilinas de plantas subrayadas son las que se estudiaron en este trabajo.

La exposición prolongada al látex de *Hevea brasiliensis*, presente en guantes y material quirúrgico, en pacientes pediátricos con espina bífida y en trabajadores al servicio de la salud, da lugar a una prevalencia del 40-60% de alergia al látex, y 12.4%, respectivamente, (Nucera et al., 2020; Wu et al., 2016). La profilina de látex (Hev b 8) es un alérgeno relevante, ya que induce reactividad cruzada con profilinas de pólenes y alimentos. A este padecimiento se conoce como el síndrome polen-látex-alimentos (Ganglberger et al., 2001).

En Latinoamérica y México, hay una escasa documentación acerca de la prevalencia a profilinas, lo que dificulta calcular con precisión su incidencia real (O'Farrill-Romanillos, P.M. *et al.* 2022). Asimismo, cabe resaltar, que los valores de prevalencia que se mencionan varían según la región geográfica y, por consiguiente, según el tipo de polen predominante.

Diferencias entre Inmunoglobulinas IgE e IgGs y su implicación en la alergia

Las inmunoglobulinas estimulan a células y moléculas del sistema inmune a responder contra los antígenos. Estas tienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas y dos ligeras con regiones variables (V) y regiones constantes (C). El fragmento cristalizable (Fc) está conformado por dominios constantes, cuya función es unirse al receptor y llevar a cabo las funciones efectoras. Asimismo, define al isotipo, ya sea $\alpha, \delta, \mu, \gamma$ o ε. Los fragmentos que se unen al antígeno (Fab, por sus siglas en inglés Fragment antigen binding) son dos y está compuestos por regiones marco (Fw, Framework regions) que se mantienen unidos por regiones determinantes de la complementariedad (CDR, siglas en inglés complementarity determining regions) cuyo pleglamiento son asas y cuya función principal es el parátopo y unirse al epítopo de su antígeno correspondiente, Figura 5 (Culang 2013).

Las inmunoglobulinas IgE tienen una fracción cristalizable (Fc) que está compuesta por seis dominios que comprenden a los dímeros de los dominios $C\varepsilon2$- $C\varepsilon3$- $C\varepsilon4$, los cuales se acomodan de forma compacta. Además, tiene dos fragmentos Fabs (Fab, del inglés Fragment antigen-binding), que presentan los CDRs de unión al antígeno (región hipervariable). La cadena-ε de la IgE adopta una conformación extendida en forma de Y, y no tiene una región bisagra, a diferencia de las IgG que sí la tiene (Figura 5-B) (Sutton et al, 2019). Las inmmunoglobulinas IgE presentan una gran flexibilidad en la Fc, lo que les permite reconocer a sus receptores FcεRI y CD23, que es clave para la activación celular y degranulación (Beavil et al.,1995).

En cambio, los anticuerpos IgGs en el Fc presentan dos dominios constantes $C\gamma2$ y $C\gamma3$ de la cadena pesada y que están conectados a dos Fabs formados por los dominios $C\gamma1$ (cadena pesada) y VL y $C\kappa/\lambda$ (cadena ligera), y la región bisagra unida por puentes disulfuro (Figura 5).

Las IgGs son bi-específicos y monovalentes, y la región Fc es responsable de las funciones efectoras, mientras que los Fab se unen al antígeno mediante los dominios variables (Davies et al., 2014).

Las inmunoglobulinas IgE presentan mayor número de glicosilaciones en sus cadenas pesadas, comparadas a las IgGs que están en sus dominios contantes (Cγ2) y en los Fabs de las células maduras. El tipo de glicosilación de las IgGs es tipo compleja mediante la unión biantenada con un núcleo de quitiobiosa (GlcNAc2) unido a fucosa, un núcleo de manosa, unido a galactosa y/o ácido siálico. Mientras, que las inmunoglobulinas IgE humanas tienen seis glicosilaciones biantenadas de tipo complejas y de tipo oligomanosas descritas en la Figura 5. Las glicosilaciones de las IgE son necesarias para la maduración de los anticuerpos, afectan significativamente la capacidad de las IgE para unirse a su receptor de alta afinidad FcεRI y ejercen funciones efectoras como la degranulación de células sensibilizadas (Holdom et al., 2011). La glicosilación de las IgG afecta la vida media de los anticuerpos, su afinidad, avidez por los antígenos, regula la estructura del fragmento cristalizable (Fc) y la señalización del receptor Fcγ, así como la función efectora del anticuerpo (Shade & Anthony, 2013).

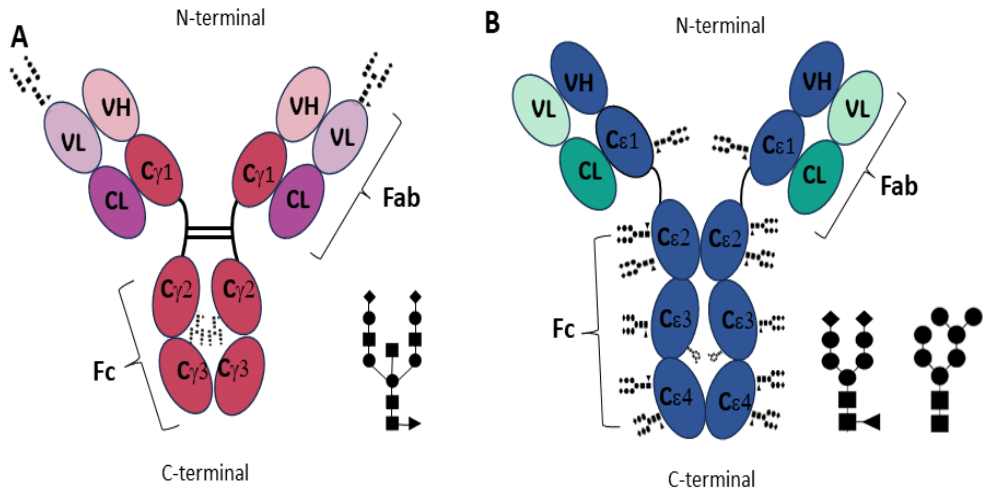

Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las IgGs e IgE humanos, y sus glicosilaciones. **A)** De inmunoglobulina IgG, la composición de los glicanos están unidos a Asn en el domino Cγ2 y en la región Fab de las células maduras. La composición de los glicanos en IgGs humanas es tipo compleja biantenada con un núcleo de quitiobiosa (GlcNAc2) (línea continua) unidos a fucosa y extensiones variables (línea discontinua), un núcleo de manosa, unidos a galactosa y/o ácido siálico. **B)** Anticuerpo IgE. La composición de glicanos puede ser tipo compleja y tipo oligomanosa y están unidos a Asn. En la tipo compleja, es biantenado unido a un núcleo de de quitibiosa (GlcNAc) con fucosa, y extensiones variables (línea discontinua), núcleo de manosas, unidos a galactosa, y ácido siálico. La composición del glicano de tipo oligomanosas de 4-8 manosas unidos al núcleo de quitibiosa (GlcNAc2) (Shade & Anthony,

2013). Representación: GlcNAc (cuadrado), fucosa (triangulo), galactosa (círculo) y ácido siálico (rombo).

Como se mencionó anteriormente, las inmunoglobulinas IgE tienen un papel esencial en la reacción alérgica (Sutton et al., 2019). Los dominios Cε3 y Cε4 son relevantes para la unión con los receptores de alta afinidad (FcεRI). Este receptor se expresa en mastocitos, basófilos, eosinófilos y células de Langerhans, y el receptor de baja afinidad (FcεRII y CD23) está presente en células B, linfocitos T, células presentadoras de antígenos, intestino y epitelio respiratorio (Kraft & Kinet, 2007).

Cabe mencionar que las inmunoglobulinas IgE alérgeno-específico se producen a concentraciones bajas < 200 ng/mL, pero tienen una alta especificidad por el alérgeno (Romero Lenin-Pavón, 2016). La afinidad de las IgE por FcεRI es de 10^{-10} M^{-1} y por el receptor CD23/ FceRII es de 10^{-6} M^{-1} (Sutton et al., 2019). La vida media de la IgE sérica es más corta, es de 2 a 2.5 días, en comparación con la IgGs, que tiene una vida media de aproximadamente tres semanas en humanos.

Por el contrario, las IgGs son de los más abundantes en suero y están en un 5% total del mismo. En el caso de las inmunoglobulinas IgG_4 compiten por el reconocimiento del alérgeno como “anticuerpos bloqueadores” (James LK 2012; Dodev 2015). Los IgG_4 tienen un papel protector en la alergia y pueden alcanzar hasta un 75% de los IgGs totales en una exposición crónica ante el antígeno (Aalberse & Schuurman, et al. 2002; Aalberse & Rispens, et al 2009). Estas se unen al receptor FcγRIIb (FcγR) presente en el mastocito, con una afinidad de Ka = 10^{-8} M^{-1}, y al unirse producen un efecto inhibitorio en la desgranulación celular (Bruhns et al., 2009).

Por estas razones, los anticuerpos IgG_4 tienen un gran atractivo terapéutico. Dado que los anticuerpos IgE nativos son muy difíciles de obtener, debido a su baja abundancia. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) IgGs, con la capacidad de inhibir la unión de IgE en los alérgenos, se utilizan como sustitutos para mapear epítopos conformacionales. Una vez identificados dichos epítopos, se puede hacer mutagénesis dirigida para producir alérgenos con baja reactividad (hipoalérgenos) que pueden ser candidatos para inmunoterapia (Smith S. A et al. 2023).

ANTECEDENTES

Los anticuerpos monoclonales (mAb) contra alérgenos específicos se han convertido en herramientas biológicas eficaces para el diagnóstico y el mapeo de epítopos conformacionales. Además, tienen aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas (Landolina & Levi-Schaffer et al, 2016; Ecker, Jones, & Levine, 2015). A la fecha, los mAbs se han utilizado contra profilinas para su cuantificación a partir de la fuente natural (Sankian, et al., 2008; Abedini et al., 2011) y para el mapeo de determinantes antigénicos a través de péptidos sintéticos superpuestos (Asturias et al., 2002).

En nuestro grupo de trabajo se obtuvieron anticuerpos monoclonales murinos: un IgE/2F5 y dos IgGs 1B4 y 2D10 mediante la técnica del hibridoma. Brevemente, se inmunizaron ratones (Balb/c) con la profilina de látex (rHev b 8), utilizando el adyuvante Freund´s, cada dos semanas durante 2 meses. Posteriormente, se utilizó el suero de los ratones inmunizados para evaluar la presencia de anticuerpos positivos al alérgeno mediante ELISA. Con los ratones seleccionados se obtuvieron las células de bazo y se procedió a la fusión celular con células de mieloma, lo que se conoce como células de hibridoma. La presencia de IgE e IgGs con reconocimiento a rHev b 8 en las células de hibridoma se determinó mediante una ELISA. Finalmente, se aisló cada clona que fue secretada por el hibridoma, seleccionando los anticuerpos mediante dilución limitada y se caracterizando el isotipo de cada mAb (Mares-Mejía et al., 2016). Una vez purificados, se evaluó la afinidad por el alérgeno rHev b 8 mediante interferometría de biocapa (BLI por sus siglas en inglés Biolayer Interferometry) en el que se determinó la K_D (constante de afinidad) $1.67X10^{-9}$ M para la IgE/2F5, y de los mAbs IgGs para 1B4 fue de $1.6x10^{-12}$ M para mAb 2D10 $8.33x10^{-11}$ M, y (Mares-Mejía et al., 2020).

Además, usando el mAb IgE/2F5, se formó el complejo Fab IgE/2F5 con la profilina de látex *de H. brasiliensis* recombinante (rHev b 8) y se determinó la estructura 3D del complejo (Fab IgE/2F5-rHev 8) (PDB 7SBD). El análisis del complejo permitió identificar interacciones relevantes que lo estabilizan, este epítopo conformacional se localiza en las hélices α 1 y 3 (Figura 6-A), que incluyen al residuo Asp128, el cual establece dos puentes salinos con Arg50 y Arg52 (CDR2-H) del parátopo. Además, otra interacción relevante es el residuo Asn98 que conecta las hebras β-6 y 7 en Hev b 8, a través de puentes de hidrógeno con Thr55 en el CDR2-H, (Figura 6-B) (García-Ramírez et al., 2022).

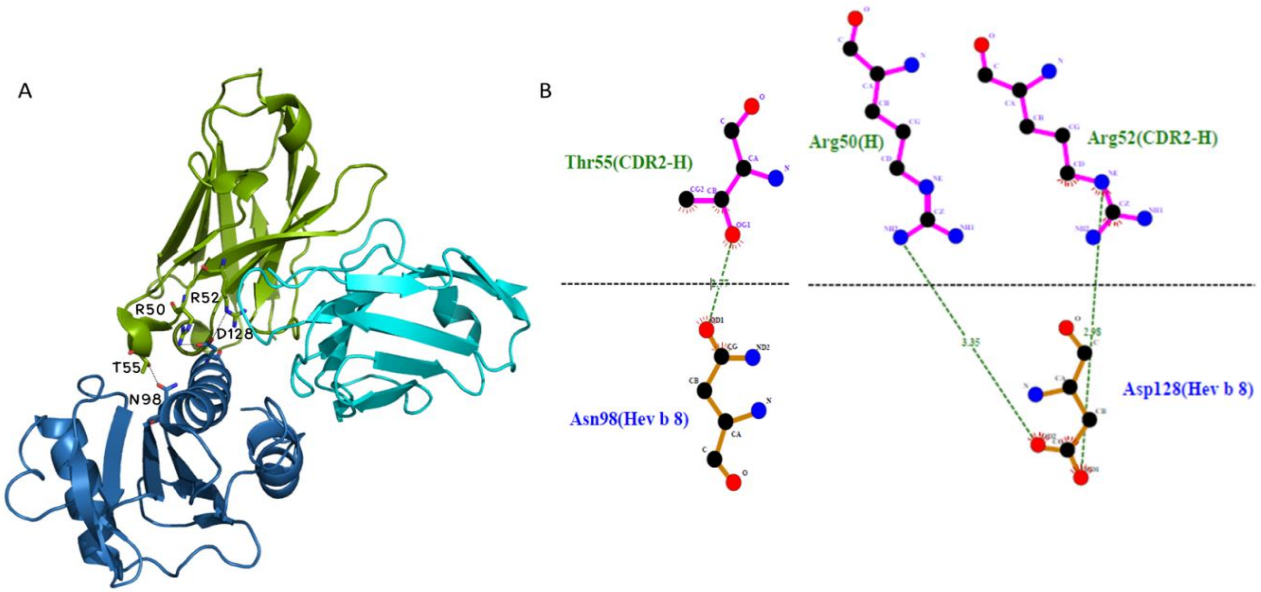

Figura 6. Interacciones relevantes que estabilizan el complejo Fab 2F5/IgE - rHev b 8. A) Estructura del complejo Fab 2F5/IgE - rHev b 8 (PDB 7SBD). **B)** Unas de las interacciones que estabilizan son puentes de hidrógeno del residuo Asn98con la Thr55 del parátopo (CDR2-H) y dos puentes salinos que establece el residuo Asp128 con Arg50 y Arg52 (CDR2-H). Se muestra en color azul a rHev b 8, verde a la cadena pesada y azul turquesa cadena ligera del Fab/IgE, y sus interacciones.

En este mismo estudio, para determinar los epítopos conformacionales relacionados con la reactividad cruzada con IgE, se usó profilina de maíz (Zea m 12), ya que esta profilina no es reconocida por el mAb IgE/2F5. Además, al superponer la estructura de Zea m 12 con Hev b 8 y con las de otras profilinas de plantas, se obtiene un RMSD menor a 0.3 Å. Entonces, se superpuso la estructura cristalográfica de Fab IgE/2F5-rHev b 8 (PDB:7SBD) con rZea m 12 (PDB:5FEF). En este análisis se encontró diferencias en los aminoácidos involucrados en el epítopo conformacional, Hev b 8 tiene los residuos Asn98 y Asp128, mientras que rZea m 12 tiene Gly98 y Glu128, Figura 7-A. Es claro que Gly98 de rZea m 12 no puede establecer el puente de hidrógeno con Thr55 en el CDR2-H, y Glu128 genera un impedimento estérico relevante, Figura 7-B.

A

```
                    10         20         30         40         50         60
Hev b 8    MSWQAYVDDH  LMCEIEGNHL SAAAIIGQDG SVWAQSANFP QFKSEEITGI MSDFHEPGTL
Zea m 12   MSWQAYVDDH  LLCDIEGQHL SAAAIVGHDG SVWAQSENFP ELKPEEVAGM IKDFDEPGTL

                    70         80         90         100        110        120
Hev b 8    APTGLYIGGT KYMVIQGEPG  AVIRGKKGPG  GVTVKKTNQA  LIIGIYDEPM  TPGQCNMIVE
Zea m 12   APTGLFVGGT KYMVIQGEPG  VVIRGKKGTG  GITIKKTGMS  LIIGIYDEPM  TPGQCNMVVE

                    130
Hev b 8    RLGDYLIDQG  Y
Zea m 12   RLGDYLIEQG  F
```

B

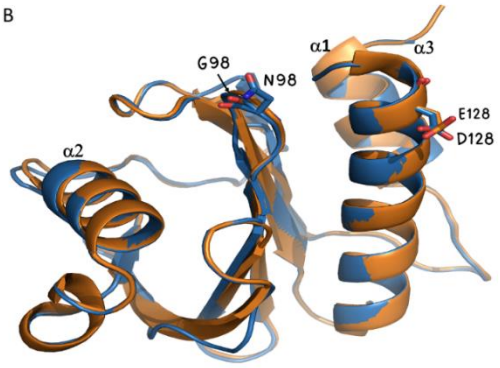

Figura 7. Residuos diferentes entre las profilinas Hev b 8 y Zea m 12. A) Alineamiento secuencias de Hev b 8 con Zea m 12, se muestra subrayado en color naranja los residuos diferentes. **B)** Superposición estructural de Hev b 8 (PDB 5FDS, azul) con Zea m 12 (PDB:5FEF, naranja) mostrando los residuos que participan en la interacción de Hev b 8 con el anticuerpo IgE/2F5 y los residuos que están en la misma posición en Zea m 12.

Para tratar de inducir el reconocimiento de Zea m 12 por la IgE/2F5, se generaron dos mutantes de rZea m 12: Glu128Asp (G128D) y la doble mutante rZea m 12: Gly98Asn-Glu128Asp (G98N-E128D), y se evaluó su reconocimiento con dicho anticuerpo. El resultado fue que la mutante simple fue reconocida en un 16 %, mientras que la doble mutante mostró un 56 %, en comparación con el control rHev b 8 (García-Ramírez et al., 2022).

Por otra parte, nuestro grupo demostró que los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 inhibieron el reconocimiento de los anticuerpos IgE e IgG_4 de sueros de pacientes alérgicos al látex, un 23 % con 1B4, y un 74 % con 2D10. Además, interesantemente, la combinación de estos dos mAbs, podían imitar la interacción de los anticuerpos IgE e IgG_4 de los sueros de pacientes alérgicos al látex y al maíz, inhibiendo su unión a la Hev b 8 en un 90 % y un 40 %, respectivamente. Notablemente, la formación del complejo de rHev b 8 - 2D10, resulto en la inhibición de la

desgranulación de las células de basófilos de rata sensibilizadas con el anticuerpo IgE/2F5, lo que, corrobora que 2D10 bloquea la interacción de IgE/2F5 con este alérgeno (Mares-Mejía et al., 2020).

Además, se secuenciaron los Fvs de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 mediante la compañía GenScript. Una vez secuenciados, se obtuvo un modelo de las regiones Fvs de ambos, y se realizó un acoplamiento molecular de Hev b 8 (PDB:5FDS) formado por el complejo anticuerpo-antígeno, Figura 8-C. Esto fue con el fin de mapear los sitios de reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 en Hev b 8. De acuerdo con los análisis teóricos, el epítopo de 2D10 comprende las hélices α - 1 y 3 en la región que corresponde a los extremos N y C-terminales; que también corresponde con la región reconocida por IgE/2F5 en Hev b 8, Figura 8-A. Cabe resaltar, en otras profilinas como la del melón, Cuc m 2, se ha reportado como epítopo las hélices $\alpha -$ 1 y 3 (Tordesillas et al., 2010). Por el contrario, 1B4 reconoce el lado opuesto en la superficie de profilina, Figura 8-B (Mares-Mejía et al., 2020).

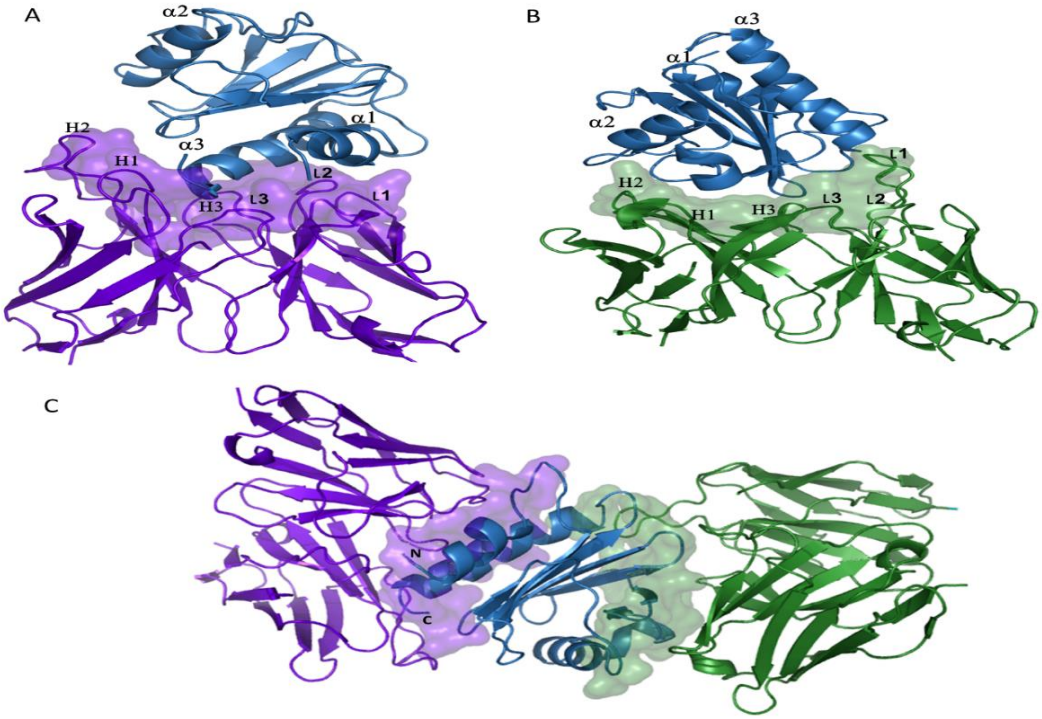

Figura 8. Diagrama de listones del acoplamiento molecular teórico de los Fv de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 con rHev b 8 (PDB 5FDS). A) Se propone que el Fv-2D10 (morado) pudiera interaccionar con la hélices α 1 y 3 de Hev b 8 (azul). **B)** El Fv-1B4 (verde) pudiera interaccionar el extremo opuesto en la Hev b 8. **C)** Los Fv de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 reconocen epítopos conformacionales opuestos en la superficie de rHev b 8.

Por otra parte, para los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 sólo evaluó su reconocimiento con profilinas de maíz y látex, y no con otras profilinas de pólenes. Tampoco se ha analizado este reconocimiento a nivel estructural, lo que puede aportar información sobre las bases de la reactividad cruzada de inmunoglobulinas IgE con profilinas de plantas.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el reconocimiento de los mAbs 1B4 y 2D10 por profilinas alergénicas de diversas plantas, centrándonos en las profilinas que son las principales fuentes de sensibilización como son: los árboles (rBet v 2.0101/abedul-*Betula berrucosa*, rFra e 2.2/fresno-*Fraxinus excelsior*), de malezas (rAmb a 8.0101/ambrosía- *Ambrosia artemisiifolia* y rArt v 4.0101/artemisa-*Artemisa vulgaris*), de pasto (rPhl p 12.0101/pasto Timothy-*Phaleum pratense*) y de alimento (Zea m 12.0105/maíz-*Zea mays*). Además, usar estas mutantes de rZea m 12 (rZea m 12: G128D y la doble mutante rZea m 12: G98N-E128D) para caracterización de los sitios de reconocimiento de los dos mAbs anti-rHev b 8. Los mAbs IgGs anti-Hev b 8 que tengan mayor reconocimiento con las profilinas de distintas fuentes pueden representar una herramienta prometedora en el campo de la alergia para el diagnóstico, para el mapeo de determinantes antigénicos e incluso el desarrollo de inmunoterapias personalizadas en pacientes alérgicos a profilinas.

JUSTIFICACIÓN

Las profilinas de pólenes de plantas son una causa importante de enfermedades respiratorias alérgicas, como son rinitis alérgica y asma, y están involucradas en el síndrome oral alérgico. Por lo tanto, los mAbs IgGs con la capacidad de reconocer profilinas de distintas fuentes de plantas pueden ser una herramienta en el diagnóstico, mapeo de determinantes antigénicos e incluso el desarrollo de inmunoterapia personalizada para pacientes alérgicos a profilinas.

HIPOTESIS

El mAb 2D10 reconoce epítopos conformacionales como Asp128 en la hélice α– 3, y Asn98 en el giro que conecta las hebras β - 6 y 7 en profilinas de plantas, mientras que el mAb 1B4 reconoce el sitio opuesto. Estos mismos residuos son relevantes en el reconocimiento de IgE de sueros de pacientes alérgicos a profilinas de maíz y látex.

OBJETIVO

Identificar epítopos conformacionales en profilinas de plantas relevantes para su reconocimiento de mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 1B4 y 2D10, e inmunoglobulinas IgEs de sueros de pacientes alérgicos a látex y a maíz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. Primera parte

- Purificar los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (anti-rHev b 8) a partir de los hibridomas.
- Evaluar el reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (anti-rHev b 8) por profilinas de plantas: como abedul (rBet v 2.0101), fresno (rFra e 2.2), artemisa (rArt v 4.0101), maleza (rAmb a 8.0101) y pasto (rPhl p 12.0101).
- Explicar las diferencias en el reconocimiento de los mAbs por las diferentes profilinas mediante la comparación de su secuencia primaria, estructura tridimensional y su potencial electrostático.
- Evaluar si los residuos Asn98 y Asp128 en las mutantes rZea m 12 (rZea m 12:E128D y rZea m12:G98N-E128D) son reconocidos por los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 y por inmunoglobulinas IgEs de sueros de pacientes alérgicos al látex y maíz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. Segunda parte

- Sobreexpresar, purificar y realizar la caracterización biofísico-estructural de la profilina de fresno (rFra e 2.2)
- Obtener un modelo teórico de rFra e 2.2 usando al algoritmo de Alphafold y comparar su estructura tridimensional con Hev b 8.

METODOLOGIA. Primera parte

2.1 Purificación de anticuerpos monoclonales murinos (anti-rHev b 8) IgGs1B4 y 2D10

Las células del hibridoma que producen los mAbs (1B4 y 2D10) se cultivaron en medio RPMI-1640 con piruvato de sodio, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, antibióticos y 3 % de suero fetal bovino (FBS), y se incubó a 37 °C con 5% de CO_2. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de las células que los producen, el cual se centrifuga a 13, 000 g durante 15 min, y se filtra por membrana millipore de 0.45 y 0.22 µm. Dicho sobrenadante (300 mL) se pasó por una columna de afinidad conteniendo rHev b 8 unido covalentemente a una resina Affi-gel 15 (8 mL-volumen columna) (Biorad, CA, USA). Esta columna se equilibró con 5 volúmenes de amortiguador PBS. La elución de los anticuerpos se realizó con un amortiguador de glicina-HCl 0.2 M, 1M NaCl pH 2.8 y se colectaron en fracciones de Tris HCl 2.0 M pH 8.0 (0.2mL) por cada 1 mL (1/5) para neutralizar el pH. La pureza de los anticuerpos fue verificada por geles SDS-PAGE 10%. Los mAbs purificados se dializaron contra PBS, y se concentraron en un centricon de 30,000 MWM a 1 mg/mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La concentración se determinó con un coeficiente de extinción de $A_{280\,nm}^{0.1\%}$1.4 mL $mg^{-1}cm^{-1}$.

2.2 Profilinas recombinantes rArt v 4, rAmb a 8, rPhl p 12, rBet v 2, rFra e 2

Las profilinas de malezas (rArt v 4.0101 y rAmb a 8.0101), pasto (rPhl p 12.0101) y abedul (rBet v 2.0101) fueron donadas por los doctores Maksymilian Chruszcz y Andrea O'Malley de Michigan State University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, East Lansing, USA y de University of South Carolina, Department of Chemistry and Biochemistry, Columbia, SC 29209, USA, con quienes se estableció una colaboración. La purificación de rFra e 2.2 se encuentra descrita en la segunda parte apartado 2.8-2.10.

2.3 Reconocimiento de profilinas de plantas (rArt v 4, rAmb a 8, rPhl p 12, rBet v 2 y rFra e 2) por mAbs IgGs 2D10 y 1B4 (anti-rHev b 8)

Se realizaron ELISAs-indirectas para evaluar el reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (anti-Hev b 8) por las profilinas de plantas rArt v 4, rAmb a 8, rPhl p 12, rBet v 2 y rFra e 2. En una microplaca de 96 pozos (SARSTEDT AG, 82.1581.200 Alemania), se sensibilizó con 10 µg/mL con 100 µL de cada alérgeno, y se incubó toda la noche a 4°C. La placa se lavó tres veces con 200 µl de 0.05% Tween 20 en PBS, entre cada paso de incubación. En seguida se bloqueó con 150 µL de albumina 1 % en PBS, incubándola toda la noche a 4°C. Se adicionó 100 µL por pozo de 1B4 y 2D10 en concentración de 2 µg/mL, individualmente, y se incubó toda la noche a 4°C. Después, se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario anti-IgG Goat anti-Mouse IgG H+L HRP (Sigma-Aldrich, MO, US), en una dilución de 1:3000 en PBS y se incubó durante 1 h a 37°C. La placa se reveló con 100 µL de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etillbenzotiazolin-6-

sulfónico, Invitrogen, USA) durante 15 min y se leyó en un lector de placas (BioTek Instruments Inc, VT, US) a 405 nm. El resultado es el promedio de tres experimentos por separado, considerando la desviación estándar que se restó al blanco de los pozos sin sensibilizar.

2.4 Caracterización de sitios de reconocimiento de los mAbs (1B4 y 2D10) con las mutantes rZea m 12

Se sensibilizó la microplaca (SARSTEDT AG, 82.1581.200 Alemania) con 10 µg/mL de la profilina de maíz (rZea m 12), y mutante sencilla rZea m 12 Glu128Asp y la doble mutante rZea m 12 Gly98Asp-Glu128Asp; como control positivo se utilizó rHev b 8 y como control negativo rHev b 7 y se incubó toda la noche a 4°C. Los siguientes pasos se hicieron tal como se indica en el apartado 2.3.

2.5 Evaluación del reconocimiento de las mutantes de rZea m 12 con sueros de pacientes alérgicos al maíz

Para identificar los residuos relevantes involucrados en la unión de IgE con sueros de pacientes alérgicos a profilina de látex y maíz, se realizó ELISA-indirecto. La microplaca se sensibilizó con 100 µL (10 µg/mL) por pozo de rHev b 8, rZea m 12 y las mutantes de rZea m12 (mutante sencilla rZea m 12 Glu128Asp y la doble mutante rZea m 12 Gly98Asp-Glu128Asp), y se incubó a 4°C durante la noche. Al final de cada incubación, se lavaron los pocillos con 200 µl de Tween 20 al 0.05 % en PBS. La microplaca se bloqueó con 150 µL de BSA al 1% en PBS, y se incubó a 4°C, durante la noche.

Como control negativo se utilizaron dos sueros de individuos que no reconocen a rHev b 8 y rZea m 12, y como control positivo un suero que reconoce a rHev b 8. Se utilizó un conjunto de cinco sueros de individuos alérgicos a la profilina de hule (rHev b 8), y a la profilina de maíz (rZea m 12), estos sueros se utilizaron 1:5 en PBS contra rZea m 12 y las dos mutantes de rZea m 12, y se incubó como en los pasos anteriores. A continuación, se lavó la microplaca y se añadió el anticuerpo secundario (anti-IgE humana HRP marcada, específica de cadena ε; Sigma Aldrich, A9667), y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Los siguientes pasos fueron los mismos que los descritos para ELISA-indirecto apartado 2.3.

2.6 Análisis estadísticos

El análisis estadístico de ELISA se realizó utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de un procedimiento de comparación múltiple por pares (método Šídák). Un valor de $p < .05$ se consideró estadísticamente significativo (Abdi 2007). Todos los análisis y estadísticas de

resumen se realizaron con el software Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, California) https://www.graphpad.com.

2.7 Análisis computacional

Las secuencias de las profilinas Amb a 8.0101, Art v 4.0101, Bet v 2.0101, Phl p 12.0101, Zea m 12.0105, Hev b 8.0102 y Fra e 2.2 se alinearon en el servidor Clustal Omega https://www.ebi.ac.uk /Herramientas/msa/clustalo/. Para obtener el modelo de Fra e 2.2 se utilizó AlphaFold (Jumper J, Evans R & Pritzel A. 2021).

El alineamiento tridimensional de profilinas Hev b 8 (PDB 5FDS), Art v 4 (PDB 5EM0), Amb a 8 (PDB 5EM1), Phl p 12 (PDB 7KYW), Fra e 2, y Bet v 2 (PDB 5NZB) se realizó con PYMOL (DeLano, 2002 The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, 20), y el análisis de superficie de potencial electrostático se obtuvo con APBS (Jurrus et al., 2018).

METODOLOGIA. Segunda parte

2.8 Purificación de profilina del polen de fresno

La profilina del polen de fresno se purificó a partir de 0.3 g del polen. Este se lavó con una mezcla etanol-acetona 1:1 (v/v), se homogeneizó por 10 min y se centrifugó a 30, 000 g por 15 min. El botón del polen se resuspendió en amortiguador de extracción con 50 mM carbonato-bicarbonato de sodio, 5 mM de EDTA y 0.5 mM de PMSF a pH 8, se homogeneizó durante 2 hrs, y se centrifugó a 13,000 g por 30 min. El extracto proteico se filtró por una membrana de 0.22 µm, y se incubó con la resina de poli-L-prolina toda la noche con agitación suave. Posteriormente, se realizaron lavados con amortiguador de extracción hasta que la absorbancia del sobrenadante llegara a cero. La elución de la proteína se realizó añadiendo 1 mL de cloruro de guanidinio 4M, durante toda la noche. Finalmente, la profilina purificada se aplicó a un gel de poliacrilamida (15 %), y se realizó una electroforesis. La banda correspondiente a la profilina se recortó y fue enviada al servicio de secuenciación de la Universidad de Arizona, donde se identificaron dos péptidos YMVIQGEAGAVIR y LDYLIEQGL que corresponden a la isoforma Fra e 2.2, a la cual no se ha reportado la caracterización biofísica-estructural.

2.9 Construcción del gen para la expresión del alérgeno rFra e 2.2

Con base en los péptidos identificados de la profilina del polen de fresno, se determinó que pertenecían a la isoforma Fra e 2.2, el cual no se ha realizado su caracterización biofísico-estructural. Por tanto, se solicitó a la empresa GenScript la síntesis de la secuencia del gen depositada en el NCBI (GenBank: AF5262Figura 995.1) en el vector pET-28a(+). La construcción del gen para la expresión de rFra e 2 quedó de la siguiente manera: En el extremo N-terminal se

encuentran la etiqueta de His, el sitio de trombina, el tag T7, el sitio de corte TEV y la secuencias de Fra e 2 entre los sitios de corte *Bam HI* y *Hind III.* Dicha construcción tiene masa molecular teórica de 18 kDa.

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGEEMGRI*ENLYFQG*MSWQAYVDEHLMCNIEDTGN
HLTSSAIVGVDGSIWAQSSNFPQVKPQEIEAINKEFDGPNTLAPTGLFLGGEKYMVIQGEPGAVI
RGKKGPGGVCIKKTTQALIFGIYDEPVAPGQCNMVVERLGDYLIEQGL

Figura 9. Nueva construcción para la expresión de rFra e 2.2 en el vector original pET-28a(+). Lo subrayado corresponde a la etiqueta de histidinas, y la secuencia que corresponde al sitio de corte TEV.

2.10 Sobreexpresión y purificación de rFra e 2

La sobreexpresión de rFra e 2.2 se hizo en *E. coli Rosetta (DE3*) en un pre-inóculo de 30 mL en medio LB, suplementado con cloranfenicol y kanamicina, durante toda la noche a 37°C. Dicho pre-inóculo se añadió a un 1 L en el medio Luria Bertani, y se dejó incubando a 37°C hasta que llegara a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La inducción se hizo con 0.5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a 30°C por 6 h con 180 rpm en agitación. Para obtener el botón celular, se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C, y se guardó a -20°C.

Para la extracción de proteínas, el botón celular se resuspendió en 30 mL de amortiguador lisis 50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se lisó en un sonicador Misonix 300 (10 s encendido, tiempo de espera 20 s, potencia de 5, hasta completar 10 min). El extracto se centrifugó a 35,000 g por 30 min y el sobrenadante se filtró en una membrana millipore de 0.22 μm, y se pasó en una columna de afinidad a Ni^{2+} His Trap (Invitrogen) de 5 mL a un flujo de 1 mL/min. La columna se lavó con amortiguador de equilibrio 50mM Tris-HCl pH 8, 300mM NaCl, 20mM Imidazol y 50mM Tris-HCl pH 8, 20mM Imidazol, y se eluyó con 500 mM imidazol y se dializó con 50 mM Tris pH 8.

Para remover la etiqueta de histidinas fusionada a rFra e 2, se usó la proteasa TEV en una relación 1:20 en 2 mM DTT, 0.8 mM urea, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8 por 3 días a 4°C. La profilina purificada se dializó en 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, y se re-circuló por la columna de afinidad a Ni^{2+} His Trap. La concentración de rFra e 2.2 se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar teórico a $A_{280\,nm}^{0.1\%}$ 1.17 mL $mg^{-1}cm^{-1}$y se aplicó a un gel de acrilamida SDS-PAGE 15%.

La pureza y la masa de la proteína se verificaron usando espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption-Time of flight), en un espectrómetro Microflex Bruker. Los estándares de calibración usados fueron taumatina (22 kDa) y heveína (4.7 kDa) y la matriz usada fue ácido sinapínico. Los resultados se analizaron con el software Flex analysis 3.0TM de Bruker y los datos se procesaron con GraphPad Prism versión 10.0.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts EE. UU., www.graphpad.com".

2.11 Caracterización de estructura secundaria de rFra e 2 mediante dicroísmo circular

Se determinó el dicroísmo circular de rFra e 2 para verificar su plegamiento. El espectro de dicroísmo circular se obtuvo en la región del UV-lejano 185-260 nm a 20°C, utilizando una celda de 0.1 cm de paso de luz. La profilina de fresno tenía concentración de 0.282 mg/mL en amortiguador de 10 mM de fosfato de sodio pH 8. El análisis de contenido de estructura secundaria se hizo con el software (*BeStSel)* https://bestsel.elte.hu/results.php.

2.12 Determinación del pH de mayor estabilidad de rFra e 2 mediante termofluorescencia

La estabilidad de la rFra e 2.2 en diferentes amortiguadores se evaluó mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF). Esta proteína (0.2 mg/mL en 20 mM Tris pH 8.5) se mezcló con el fluoróforo SYPRO orange (ThermoFisher, Waltham, MA), 1:1000, incubando 10 minutos en la obscuridad. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 10 µl de muestra por pozo y se adicionaron 10 µl de cada una de las 45 condiciones del kit de Hampton Research HR2-241 (pH 2.2 -11) a cada pozo. Esta microplaca se selló y se incubó 10 min en la obscuridad. Al cabo de ese tiempo, la placa se colocó en el termociclador (QuantStudio 3) aplicando una rampa de temperatura de 0.016 °C/s, temperatura inicial a 25°C y temperatura final 99°C. El fluoróforo SYPRO Orange se midió con el filtro Aby y Vic a 588 nm, 608 nm, que corresponden a la longitud de onda de excitación y emisión respectivamente.

Una vez concluido el experimento, se hizo el análisis de las gráficas de fluorescencia contra la temperatura para cada punto a determinado pH. En este gráfico se determinaron los valores máximos y mínimos. La fracción desplegada (FD) para cada uno de los puntos de fluorescencia se obtuvo con la siguiente fórmula: $FD=(y-y1)/(y2-y1)$, donde y son todos los puntos de fluorescencia entre los mínimos y máximos, $y1$ es el valor mínimo y $y2$ el valor máximo. Posteriormente, se obtuvo el gráfico de la temperatura contra la fracción desplegada y se ajustó hasta obtener una línea sigmoide. El punto de inflexión de la sigmoide a 0.5 se consideró la temperatura de fusión (Tm). Las gráficas y normalización de los datos se ajustaron a una función

sigmoidal de Boltzmann mediante el programa GraphPad8 versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., USA).

2.13 Pruebas de cristalización de rFra e 2

Se montaron las pruebas de cristalización de rFra e 2 recién purificada a una concentración de 5.96 mg/mL en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, de 6.72 mg/mL en 10 mM Citrato de sodio tribásico pH 5.4 a y 10 mM Citrato de sodio tribásico pH 6.6 a 6.82 mg/mL mediante el método de difusión en fase de vapor, modalidad gota sedente, utilizando los kits de crystal screen HR2-110 y HR2-110 de los kits de Hampton research.

Además, también se montaron las pruebas de cristalización de las dos construcciones de rFra e 2: la fusionada a la etiqueta de histidinas en10 mM Tris-HCl pH 7.5, a una concentración de 7.42 mg/mL, y de rFra e 2 fusionada a la etiqueta de histidinas (construcción del gen rFra e 2.2-pET28a) en 10 mM Tris-HCl pH 7.5 a 6.63 mg/mL. Además, en dichas pruebas se usó a rFra 2.2, sin la etiqueta de histidinas, en 10 mM Tris-HCl pH 7.5 a 7.23 mg/mL. En todos los casos se usó el método de difusión en fase de vapor, modalidad gota sedente, utilizando una matriz de 0.5 - 2M $(NH4)_2SO_4$ y 0.5- 1.5 M citratos pH 2.2 -10. Las pruebas de cristalización se montaron con el robot de Cristalización Gryphon (marca Art Robbins) en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM).

2.14 Obtención del modelos de rFra e 2.2 con Alphafold

A partir de la secuencia de aminoácidos de rFra e 2.2, se obtuvo un modelo teórico de su estructura tridimensional mediante los servidores AlphaFold (Jumper et al., 2021). La evaluación de calidad de los modelos se realizó con los servidores MOLPROBITY (Williams et al., 2018), revisando el gráfico de Ramachandran y las colisiones entre los residuos.

RESULTADOS. Primera parte

3.1 Purificación del mAb de 2D10

El mAb 2D10 se purificó a partir del sobrenadante del hibridoma que se pasó por la columna de afinidad de rHev b 8 covalentemente unida a la resina Affi-gel 15, el perfil de elución se muestra en la Figura 10-A. Cabe mencionar, que, se había purificado mAb 1B4, el cual se utilizó en este trabajo. En la Figura 10-B se muestra un gel de acrilamida al 10% en condiciones reductoras, donde se observa la cadena pesada y ligera de ambos anticuerpos (mAbs 1B4 y 2D10). En cuanto al rendimiento, se obtuvieron 4 mg de mAb 2D10 por litro de sobrenadante de células del hibridoma.

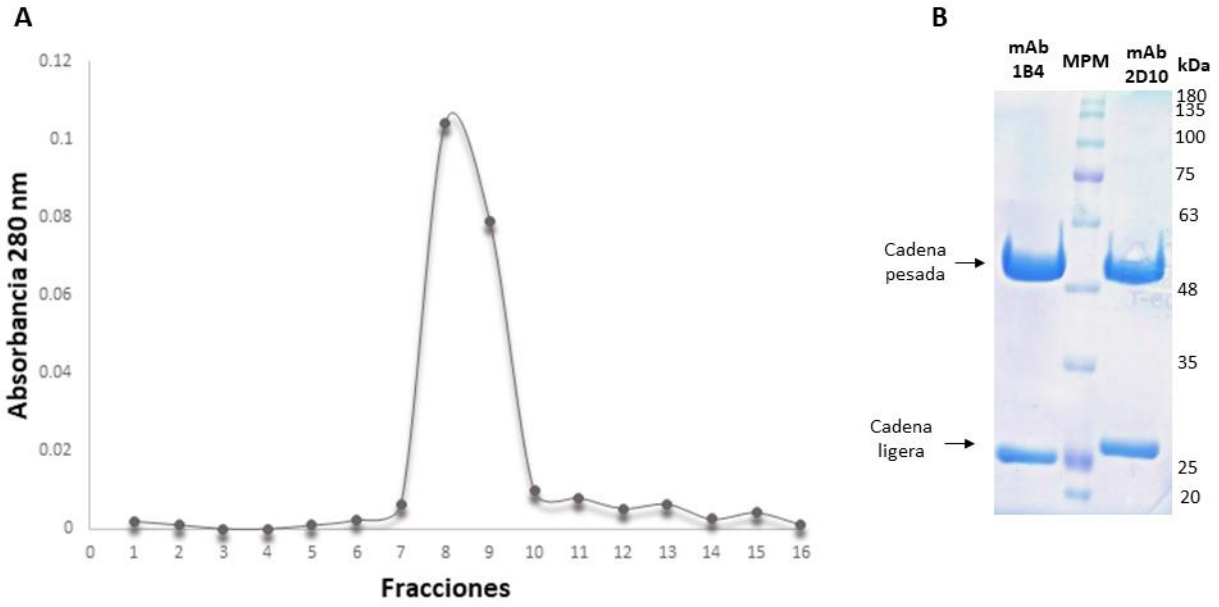

Figura 10. Purificación del mAb 2D10 por afinidad a una resina Affi-gel 15 unido a rHev b 8. A) Perfil de elución del mAb 2D10. B) Gel SDS-PAGE 10 % en condiciones reductoras del mAbs IgGs 1B4 y 2D10, se observan la cadena pesada y ligera.

3.2 Curva de titulación del mAb anti-rHev b 8 (2D10) con rHev b 8

Para determinar la concentración óptima de mAbs 1B4 y 2D10 para los ensayos de reconocimiento contra las profilinas alergénicas. Se realizaron dos curvas de titulación de 0.02 - 10 µg/mL de ambos mAbs 1B4 y 2D10 contra 10 µg/mL de rHev b 8 mediante ELISAS-indirecto. Con los datos mostrados en la Figura 11 se estableció una concentración de 2 µg/mL de mAbs como la necesaria para realizar los ensayos posteriores.

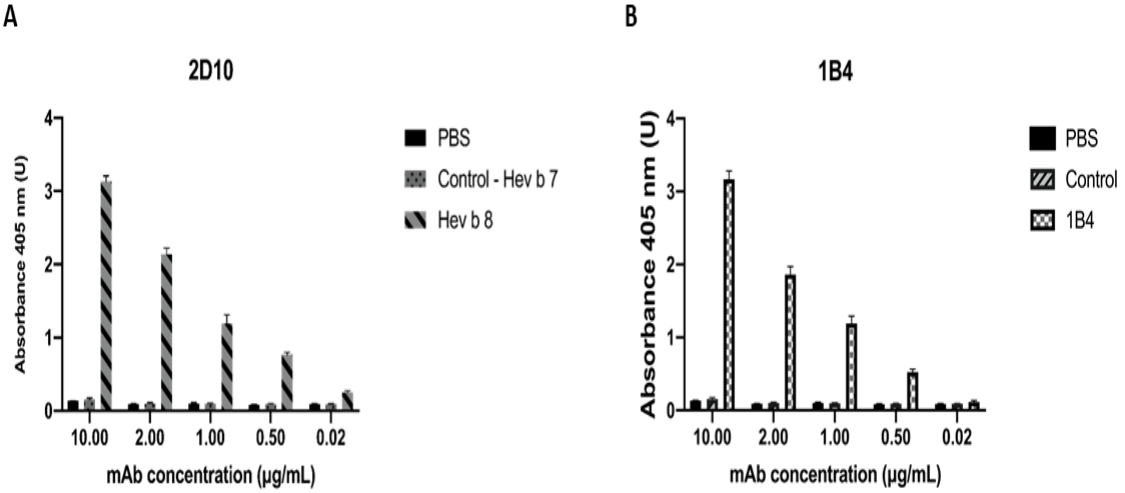

Figura 11. Curva de titulación del mAb 2D10 y 1B4 contra rHev b 8. El resultado es el promedio de tres experimentos por separado, y se muestra la desviación estándar. Los controles negativos utilizados fueron Hev b 7 (patatina), que no es reconocido por los mAbs 1B4 y 2D10 y el PBS como control de fondo.

3.3 Evaluación del reconocimiento de mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 2D10 y 1B4 por las profilinas alergénicas de plantas

Los mAbs IgGs 2D10 y 1B4 mostraron diferentes patrones de reconocimiento hacia las profilinas de las plantas. En la Figura 12-A, el mAb 2D10 tuvo mayor reconocimiento por rArt v 4 en comparación con rHev b 8. Por lo tanto, considerando el reconocimiento de rArt v 4 como el 100%, las demás profilinas tuvieron un reconocimiento de: rAmb a 8 de un 88%; Hev b 8 del 87.2%, rBet v 2 del 56%; rFra e 2 del 44%; del 15.2% con rZea m 12, y rPhl p 12 del 4%, que no fue reconocida, ya que su reconocimiento es tal como el control negativo BSA. Mientras que en la Figura 12-B, el mAb 1B4 reconoce a rHev b 8 en un 100%, y con las demás profilinas es de 84.2% para rZea m 12, de 72.6% para rPhl p 12, y de 52.6% para rAmb a 8. Las rBet v 2 y rFra e 2 su reconocimiento fue del 5.2%. La profilina rArt v 4 no fue reconocida por este mAb, siendo igual a los controles negativos.

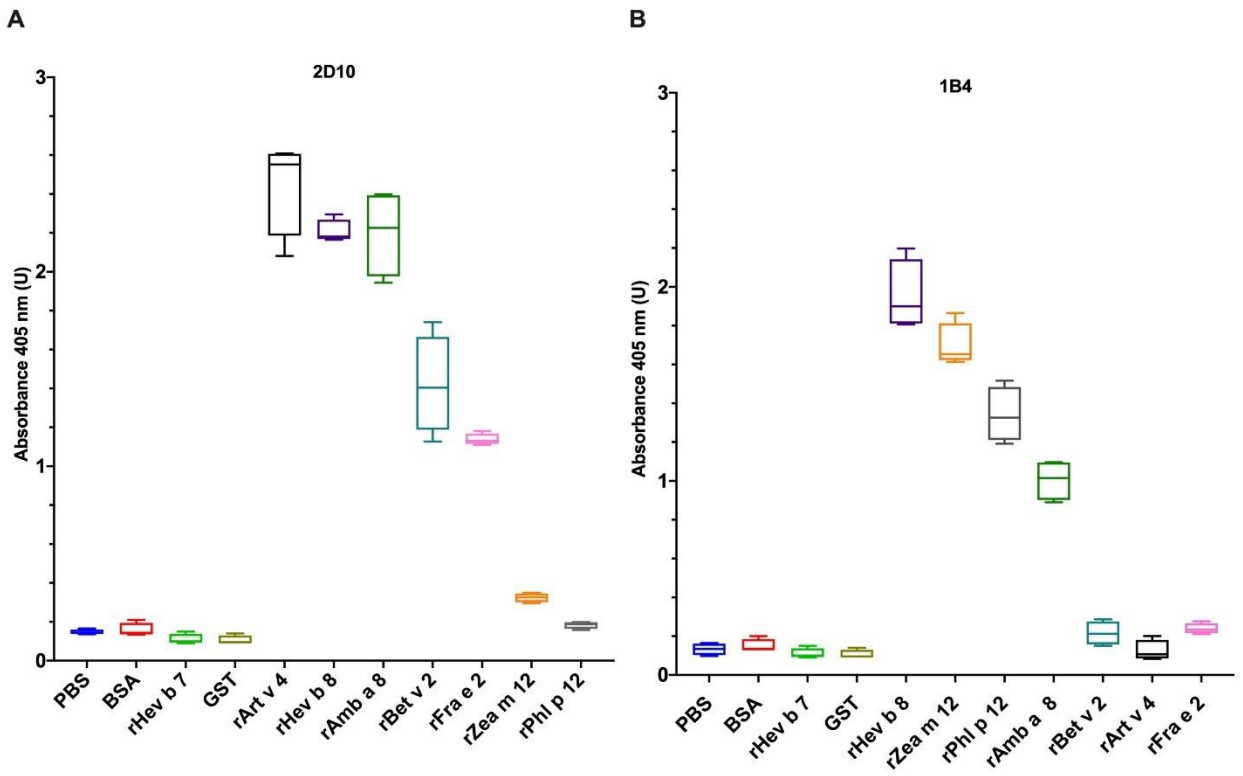

Figura 12. Evaluación del reconocimiento de los mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 2D10 y 1B4 hacia las profilinas alergénicas de plantas. La gráfica de caja y bigotes representa la media y la desviación estándar de tres experimentos de unión de los mAbs con las profilinas mediante ELISA-indirecto. Los controles negativos son BSA, rHev b 7 (patatina), glutatión S-transferasa (GST) de *Tenia solium* y PBS como control de fondo, y el control positivo es rHev b 8. A) Reconocimiento del mAb 2D10 por las rArt v 4, rHev b 8, rAmb a 8, rBet v 2 y rFra e 2. B) Reconocimiento de mAb 1B4 por rHev b 8, rZea m 12, rPhl p 12 y rAmb a 8.

3.4 Caracterización de los sitios de reconocimiento de los mAbs IgGs (anti-rHev b 8) 1B4 y 2D10 con las dos mutantes de profilina de maíz (rZea m 12)

Para identificar los residuos involucrados en el reconocimiento de las profilinas por los mAbs 2D10 y 1B4, se realizó un ELISA con las dos mutantes de profilina de maíz (rZea m 12). La Figura 13-A, se observa que 2D10 reconoce tanto a las mutantes: sencilla rZea m 12 Glu128Asp y la doble mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp, sin embargo, no presentan diferencias significativas entre sí. Por lo tanto, al no tener la mutante sencilla de rZea m 12 Gly98Asn, sugiere que el Asp128 puede ser un residuo esencial para el reconocimiento de 2D10.

Por otro lado, 1B4 se observa que con la doble mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp se incrementa levemente el reconocimiento (Figura 14-B), pero no hay cambios estadísticamente significativos con esta mutante con la profilina de maíz, lo que sugiere que este mAb no reconoce estos residuos y que no comparte el sitio de unión con 2D10.

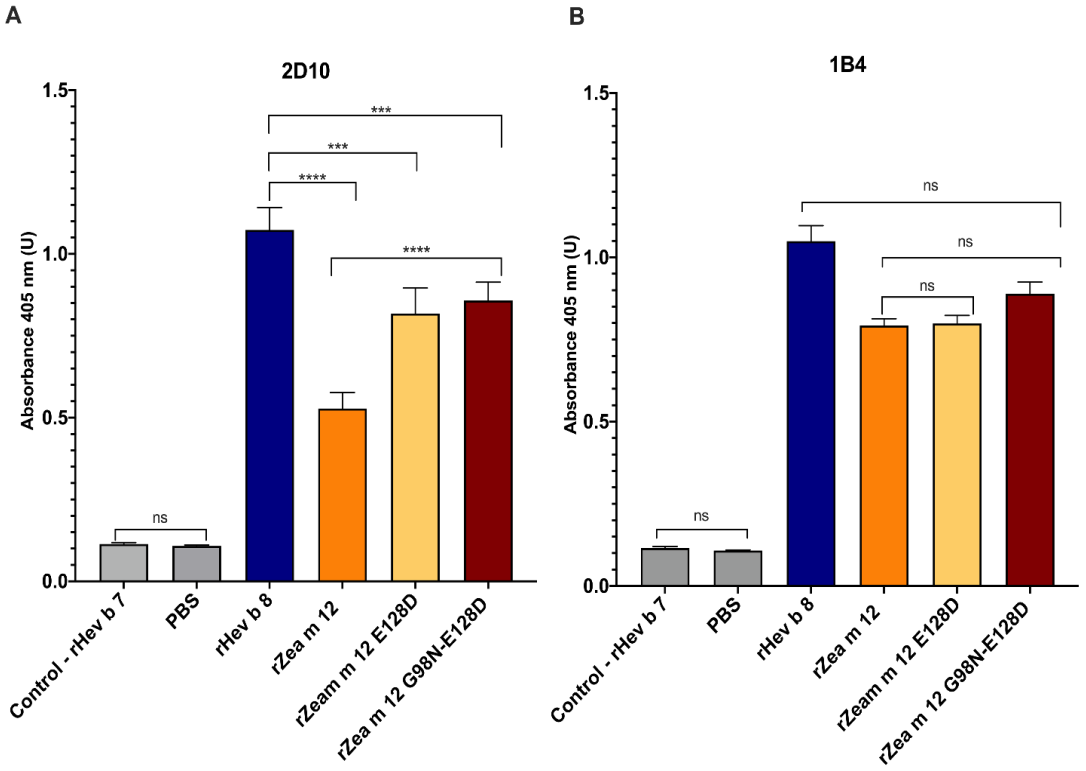

Figura 13. Caracterización de sitios de reconocimiento de los mAbs (1B4 y 2D10) con mutantes rZea m 12. Las barras muestran el reconocimiento de los mAbs por rHev b 8, rZea m 12, las mutantes simple rZea m 12-E128D (Glu128Asp) y la doble mutante rZea m 12 G98N-E128D (Gly98Asn-Glu128Asp) por ELISA indirecto. A) mAb 2D10 reconoce a ambas mutantes. B) mAb 1B4 no muestra diferencias significativas en la unión con rZea m 12 y las mutantes. Los controles negativos son BSA y PBS como control de fondo, y el control positivo es rHev b 8. Se muestra la desviación estándar de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak (ns, no significativo, todos los p <.001 se resumen con tres asteriscos, y p <.0001 con cuatro asteriscos).

3.5 Evaluación del reconocimiento de IgE de sueros de pacientes alérgicos al látex y maíz con las mutantes rZea m 12

Se realizaron experimentos de ELISA-indirecto con las mutantes rZea m 12 (rZea m 12:Glu128Asp y rZea m 12:Gly98Asn-Glu128Asp) para identificar si Asn98 y Asp128 son relevantes en la unión de IgE con un conjunto de sueros de cinco individuos alérgicos a las profilinas de rZea m 12 y rHev b 8. En la Figura 14, la doble mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp mostró una mayor unión de IgE en comparación con rZea m 12 y la mutante simple rZea m 12 Glu128Asp. Debido a que no se tiene la mutante sencilla de rZea m 12 Gly98Asn, se podría inferir en este experimento que la mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp, la cual tiene Asn98, es reconocida por IgE de pacientes alérgicos Hev b 8.

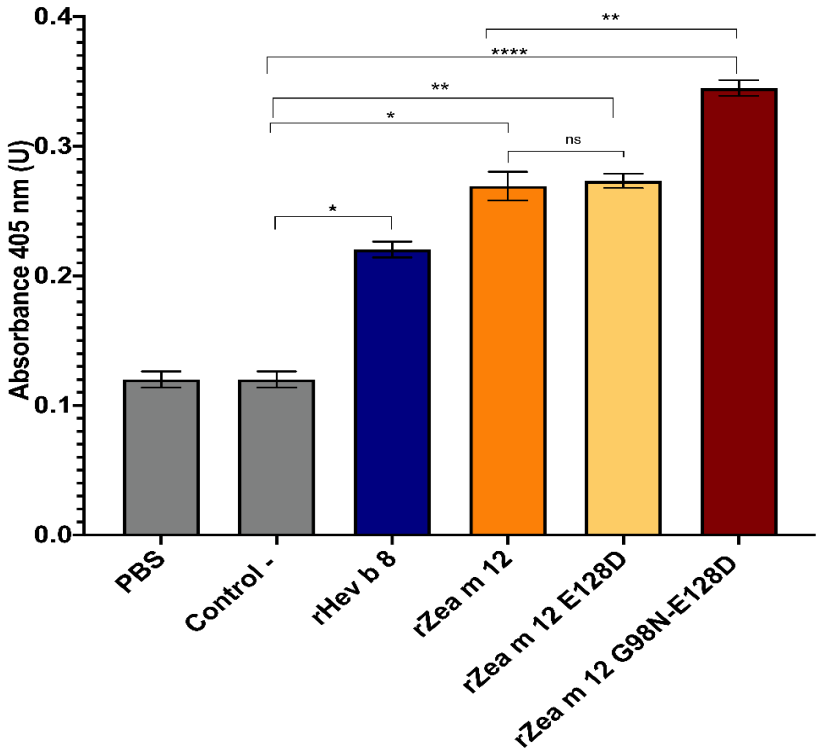

Figura 14. Unión específica de IgE a rHev b 8, rZea m 12 y mutantes rZea m 12. Las barras muestran la unión de IgE con las tres profilinas y también se muestra la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los controles negativos son: dos sueros de individuos no alérgicos y PBS como control de fondo. Un suero que reconoce a rHev b 8 como control positivo y un pool de sueros de individuos alérgicos rHev b 8 y rZea m 12. La IgE de los sueros reconoce al rZea m 12, y a las mutantes de rZea m 12, siendo mayor para la segunda mutante rZea m 12 G98D-E128D. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak (ns, no significativo, p <.05 con un asterisco, p <.01 con dos asteriscos y p <.0001 con cuatro asteriscos).

3.6 Mapeo de sitios de reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (Anti-rHev b 8) en las secuencias de aminoácidos de profilinas de plantas

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de las profilinas de plantas utilizadas con Hev b 8 para identificar los residuos relevantes que pudieran explicar su unión a los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (anti-rHev b 8). Para esto, se compararon con los epítopos teóricos de Hev b 8 reconocidos por los mAbs (1B4 y 2D10), que se obtuvieron mediante el modelado de sus Fvs y un acoplamiento molecular de estos con la estructura rHev b 8 (PDB:5FDS) (Mares-Mejía et al., 2020). En la Figura 15 se muestran los sitios de reconocimiento de los mAbs: 2D10 sombreados en morado y de 1B4 en verde.

```
            .........10 ....1.....20 .........30 .........40 .....11..50 1........60
Art v 4     MSWQTYVDDH  LMCDIEGTGQ  HLTSAAIFGT  DGTVWAKSAS  FPEFKPNEID  AIIKEFNEAG
Amb a 8     MSWQTYVDEH  LMCDIEGTGQ  HLASAAIFGT  DGNVWAKSSS  FPEFKPDEIN  AIIKEFSEPG
Phl p 12    MSWQTYVDEH  LMCEIEGH--  HLASAAILGH  DGTVWAQSAD  FPQFKPEEIT  GIMKDFDEPG
Bet v 2     MSWQTYVDEH  LMCDIDGQAS  NSLASAIVGH  DGSVWAQSSS  FPQFKPQEIT  GIMKDFEEPG
Fra e 2     MSWQAYVDEH  LMCNIEDTGN  HLTSSAIVGV  DGSIWAQSSN  FPQVKPQEIE  AINKEFDGPN
Hev b 8     MSWQAYVDDH  LMCEIEG--N  HLSAAAIIGQ  DGSVWAQSAN  FPQFKSEEIT  GIMSDFHEPG
Zea m 12    MSWQAYVDDH  LLCDIEG--Q  HLSAAAIVGH  DGSVWAQSEN  FPELKPEEVA  GMIKDFDEPG
            ****:***:*  *:*:*:.~~~  :~~::**.*~  **.:**:*~.  **:.*~:*:~  .:~.:*~~~.

            ........1.70 .........80 .........90 1........100.........110..1......120
Art v 4     QLAPTGLFLG  GAKYMVIQGE  AGAVIRGKKG  AGGICIKKTG  QAMVFGIYDE  PVAPGQCNMV
Amb a 8     ALAPTGLFLA  GAKYMVIQGE  PGAVIRGKKG  AGGICIKKTG  QAMVFGIYEE  PVNPGQCNMV
Phl p 12    HLAPTGMFVA  GAKYMVIQGE  PGRVIRGKKG  AGGITIKKTG  QALVVGIYDE  PMTPGQCNMV
Bet v 2     HLAPTGLHLG  GIKYMVIQGE  AGAVIRGKKG  SGGITIKKTG  QALVFGIYEE  PVTPGQCNMV
Fra e 2     TLAPTGLFLG  GEKYMVIQGE  PGAVIRGKKG  PGGVCIKKTT  QALIFGIYDE  PVAPGQCNMV
Hev b 8     TLAPTGLYIG  GTKYMVIQGE  PGAVIRGKKG  PGGVTVKKTN  QALIIGIYDE  PMTPGQCNMI
Zea m 12    TLAPTGLFVG  GTKYMVIQGE  PGVVIRGKKG  TGGITIKKTG  MSLIIGIYDE  PMTPGQCNMV
            ~*****:.:.  *~********  ~*~*******  ~**:~:***~  ~::::.***:*  *:~******:

            .........130...         I%
Art v 4     VERLGDYLLD  QGM 133     69.5
Amb a 8     VERLGDYLVD  QGM 133     67.94
Phl p 12    VERLGDYLVE  QGM 131     78.5
Bet v 2     VERLGDYLID  QGL 133     75.6
Fra e 2     VERLGDYLIE  QGL 133     72.5
Hev b 8     VERLGDYLID  QGY 131     100
Zea m 12    VERLGDYLIE  QGF 131     79.4
            ********::  **~
                  ↑
```

Figura 15. Mapeo de sitios de reconocimiento de los mAbs 2D10 y 1B4 en secuencias de profilinas de plantas. Los epítopos teóricos reconocidos por los mAbs se determinaron previamente mediante el modelado de sus Fvs y un acoplamiento molecular con rHev b 8 (Mares-Mejía et al., 2020). De acuerdo con el modelo, los residuos correspondientes al sitio de reconocimiento de 2D10 están sombreados en morado, mientras los de 1B4 están en verde. Las secuencias de profilinas de plantas incluidas en la tabla corresponden a Amb a 8—*Ambrosia artemisiifolia* (ambrosía), Phl p 12—*Phleum pratense* (hierba de Timothy), Bet v 2—*Betula verrucosa* (abedul), Fra e 2—*Fraxinus excelsior* (fresno), Hev b 8—*Hevea brasilensis* (látex), y Zea m 12—*Zea mays* (maíz). La flecha negra indica que Asp128 es relevante para el reconocimiento de 2D10. Los triángulos azules indican a los residuos diferentes en el sitio de

reconocimiento del mAb 2D10 comparado con Hev b 8. Los triángulos amarillos indican los residuos diferentes en el sitio de reconocimiento teóricos de Hev b 8 con 1B4. Residuos subrayados en negro son los sitios experimentales que reconoce 2F5/IgE en Hev b 8 (García-Ramírez et al., 2022). Un asterisco (*) indica residuos conservados, dos puntos (:) residuos similares, un punto (.) y una tilde (~) indica diferentes propiedades de los aminoácidos.

Es necesario mencionar que Hev b 8 tiene un Asp128, sin embargo, las profilinas de malezas (Art v 4 y Amb a 8) y de árboles (Bet v 2 y Fra e 2) tienen una inserción de dos aminoácidos en la posición 17–20 (alineamiento de secuencias, Figura 16). Por tanto, la posición Asp128 en Hev b 8 corresponde para las profilinas de plantas estudiadas a Asp130. Por este motivo, nos referimos a esta posición como Asp130 para el caso de todas las profilinas estudiadas.

De acuerdo con la Figura 12, mAb 2D10 tuvo mayor reconocimiento por rArt v 4 que por rHev b 8. Al analizar los aminoácidos en el sitio de reconocimiento teórico que corresponde al mAb 2D10, mostrado en la Tabla 2, se observa que Hev b 8 tiene tres residuos conservados con Art v 4 (Asp9, Gln101 y Asp130), mientras que Amb a 8 tiene cuatro residuos idénticos en las posiciones 100, 102, 130 y 133 (Tabla 2). Esto podría explicar el reconocimiento que presentó Amb a 8 con 2D10 (88%), mientras que para Hev b 8 el reconocimiento con este mAb fue 87%. Phl p 12 se podría considerar como un control negativo, ya que tuvo un reconocimiento similar a los controles negativos (como la BSA) (Figura 12). Esto sugiere, que los residuos Glu9, Glu14, Gly100, Gln101 y Glu133 y Met133 de Phl l p 12 no participan en la interacción con mAb 2D10, mientras que Asp9, Asp14, y Asp130 de Art v 4 son los podrían estar estabilizando la interacción con el anticuerpo 2D10 (Tabla 2). Además, esto mismo podría explicar el reconocimiento de Zea m 12 del 15.2% con mAb 2D10, ya que tiene los residuos conservados Asp9, Asp14 con respecto a Art v 4, siendo diferentes Met101, Glu130 y Phe133. También se observa que las profilinas Art v 4, Hev b 8, Amb a 8 y Bet v 2 que contienen una Asp130 son las que tienen reconocimiento del 100%, 87%, 88%, 56% por mAb 2D10, respectivamente (Tabla 2). Mientras que las profilinas que presentaron una baja unión con este mAb, como Fra e 2 (44%), Zea m 12 (15.2%) y Phl p 12 (4%) tienen un Glu130, lo que demuestra que el Asp130 es relevante para el reconocimiento de 2D10.

Este análisis sugiere que los aminoácidos Asp9, Asp14, y Asp130 son relevantes para el reconocimiento de 2D10. Sin embargo, al analizar que rFra e 2 fue reconocido en un 44% por el mAb 2D10, y posee residuos completamente diferentes a las profilinas Art v 4, Hev b 8 y Phl p 12 (Tabla 2), sugiere que mAb 2D10 podría estar reconociendo a Fra e 2 en otro sitio.

Tabla 2. Comparación de los diferentes residuos en el sitio teórico del mAb 2D10 con el reconocimiento obtenido por las profilinas de plantas							
	9	14	100	101	130	133	Reconocimiento por mAb 2D10
Art v 4	Asp	Asp	Gly	Gln	Asp	Met	100%
Hev b 8	Asp	Glu	Asn	Gln	Asp	Tyr	87%
Amb a 8	Glu	Glu	Gly	Gln	Asp	Met	88%
Bet v 2	Glu	Asp	Gly	Gln	Asp	Leu	56%
Fra e 2	Glu	Asn	Thr	Gln	Glu	Leu	44%
Zea m 12	Asp	Asp	Gly	Met	Glu	Phe	15.2%
Phl p 12	Glu	Glu	Gly	Gln	Glu	Met	4%

Nota: Los aminoácidos en verde indican que son esenciales para el reconocimiento del mAb 2D10, y estos fueron demostrados de manera experimental. Los residuos en rojo no son relevantes para la interacción con 2D10, ya que son residuos idénticos con Phl p 12, el cual no presento reconocimiento. Mientras que los residuos en azul son los residuos que son idénticos a Art v 4 y podrían participar en la interacción con 2D10. Finalmente, en negro los residuos que son diferentes con respecto a Art v 4 y Phl p 12.

Para el sitio de reconocimiento teórico del mAb 1B4 se observa que rZea m 12 tiene cuatro residuos conservados (Glu47, Gly51, Thr72 y Thr113), Phl p 12 tiene tres residuos idénticos (Glu47, Gly51 y Thr113). Sin embargo, para Amb a 8 no hay residuos idénticos con Hev b 8 a lo largo del epítopo teórico y presenta un reconocimiento del 56%, Tabla 3. Por el contrario, Art v 4 no fue reconocida por 1B4 y tiene los mismos aminoácidos que Amb a 8 en las posiciones Pro46, Ala51, Phe67, Ala72, y Ala91. Con esto se podría decir que mAb 1B4 puede estar reconociendo otro sitio en las profilinas de plantas, que no se encuentra en el sitio opuesto del mAb 2D10 en la profilina de Hev b 8.

Tabla 3. Comparación de los diferentes residuos en el sitio teórico del mAb 1B4 con el reconocimiento obtenido por las profilinas de plantas								
	46	47	51	67	72	91	113	Reconocimiento por mAb 1B4
Hev b 8	Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Pro	Thr	100%
Zea m 12	Pro	Glu	Gly	Phe	Thr	Thr	Thr	84.2%
Phl p 12	Pro	Glu	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	72.6%
Amb a 8	Pro	Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Asn	52.6%
Fra e 2	Pro	Gln	Ala	Phe	Glu	Pro	Ala	5.2%
Bet v 2	Pro	Gln	Gly	Hys	Ile	Ser	Thr	5.2%
Art v 4	Pro	Asn	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	2.6%

Nota: Los residuos en rojo no son relevantes para la interacción con 1B4, ya que son residuos idénticos con Art v 4, el cual no presentó reconocimiento (estos epítopos son teóricos). Los

residuos en azul son los residuos idénticos con Hev b 8. Finalmente, en negro los residuos que son diferentes con respecto a Hev b 8 y Art v 4.

3.7 Elementos estructurales relevantes en profilinas de plantas para el reconocimiento por el mAb 2D10 (Anti-rHev b 8)

Para explicar el reconocimiento del mAb 2D10 por las profilinas de plantas con base en los resultados experimentales (parte de los resultados 3.3, 3.4 y 3.6), se realizó un alineamiento estructural de Hev b 8 aquellas que están reportadas en el PDB, clasificándolas en dos grupos: las que mostraron mayor reconocimiento (100-56%), Figura 16-A. El segundo grupo en las de bajo reconocimiento (44%-4%), mostrado en la Figura 16-B. En la Figura 16-A se muestra el alineamiento de Art v 4, Amb a 8, Bet v 2 con Hev b 8, donde se observa que la hélice α-3 conserva el D130, mientras que las profilinas no reconocidas por este mAb, Fra e 2, Zea m 12 y Phl p 12 tienen un E130, (Figura 16-B), que podría explicar los resultados mostrados en la Figura 12-A. Una de las diferencias estructurales de Bet v 2 es una hélice-α1 desviada, por lo tanto, el asa que conecta a la hebra-β1 también se mueve hacia la derecha (Figura 16-A). Las profilinas Amb a 8, Art v 4, Zea m 12, Fra e 2 y Bet v 2 tienen una hélice α -3 con una longitud y orientación similar a Hev b 8 (violeta), y un asa corta que conecta con la hebra β-7. Por el contrario, en Phl p 12 (gris) la hélice α -3 es más corta, por lo tanto, el asa es más larga; esta región comprende los residuos 106–116 (Figura 16-B).

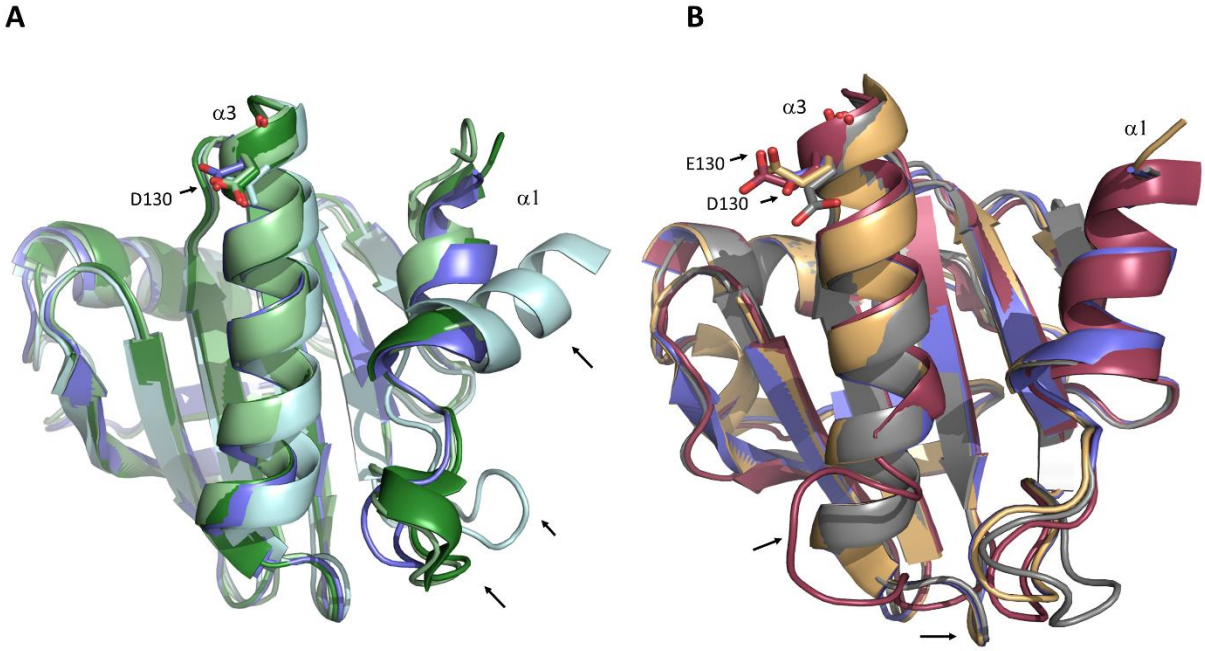

Figura 16. Comparación de la estructura tridimensional de profilinas de plantas entre las reconocidas y menos reconocidas por mAb 2D10. A) Alineamiento de la estructura tridimensional de rHev b 8 (PDB 5FDS) (violeta) con Art v 4 (PDB 5EM0, verde), Amb a 8 (PDB 5EM1, verde pálido) y Bet v 2 (PDB 5NZB, azul turquesa) el RMSD es de 0.7 Å para Art v 4 y

Amb a 8, y 0.9 Å para Bet v 2 y conservan la Asp130. **B)** Alineamiento de la estructura tridimensional de rHev b 8 (violeta) con el modelo obtenido con AlphaFold de Fra e 2 (gris), Zea m 12 (PDB 5FEF, trigo), Phl p 12 (PDB 7KYW, rosa). Hev b 8 tiene un Asp130 en comparación con las profilinas menos reconocidas que tienen Glu130. El RMSD de Zea m 12 y Hev b 8 es 0.3 Å, para Phl p 12 es 0.5 Å y 0.4 Å para Fra e 2. Las flechas negras resaltan las diferencias estructurales entre las profilinas.

3.8 Análisis de la superficie electrostática entre las profilinas de plantas

Se evaluó el potencial electrostático de profilinas estudiadas para evaluar si sus cargas superficiales podrían explicar el reconocimiento por el mAb 2D10 analizando la región que comprende hélice $\alpha - 1$ y 3. En la Figura 17, se ordenan las profilinas de mayor a menor unión con este mAb y se observa que, en la mayoría de las profilinas que presentan una carga negativa en la superficie de las hélice $\alpha - 1$ y 3, hay un mayor reconocimiento, con excepción de Phl p 12, donde la carga negativa disminuye en el asa que conecta la hélice α–1 con la hebra β-7, Figura 16-B (residuos 106-116 en la Figura 15); esto explica por qué no fue reconocida por 2D10.

Es necesario señalar que la estructura de Phl p 12 utilizada corresponde al dímero, donde la hélice α–3 está desplegada (indicada con una flecha) y forma dos enlaces disulfuro entre los monómero (O Malley et al. 2021). Por lo que la forma monomérica podría tener propiedades similares a las otras profilinas. También se puede destacar que la carga negativa en la superficie de Art v 4 aumenta en la hélice α–1 (Figura 17) (residuos 14-18 en la Figura 15) en comparación con Hev b 8, esto explica la mayor unión de Art v 4 con el mAb 2D10.

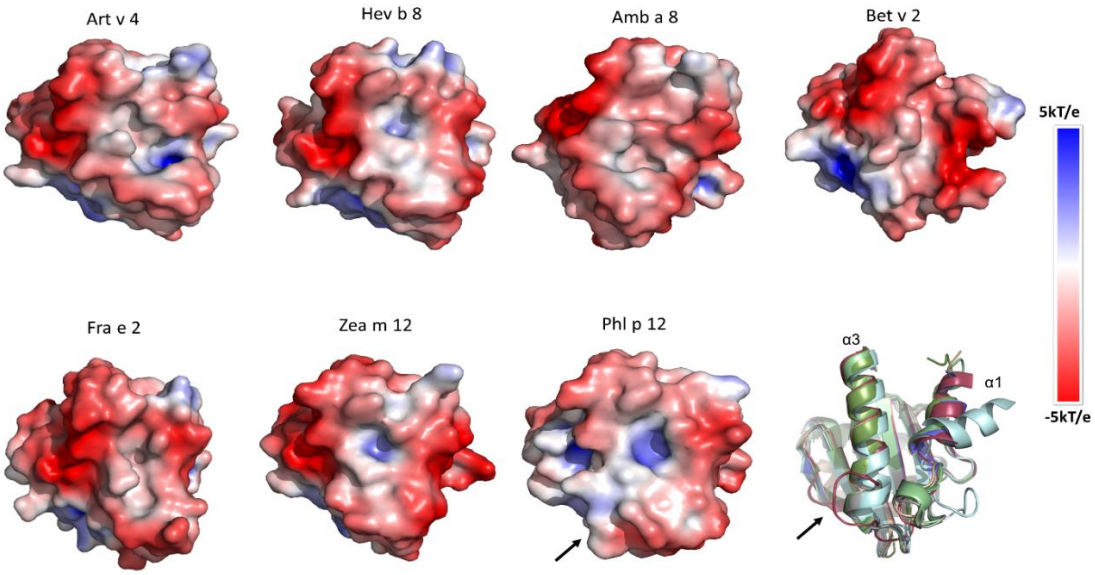

Figura 17. Comparación del potencial electrostático de profilinas plantas. El potencial electrostático más negativo está en las hélices α - 1 y 3, y las profilinas están ordenadas de mayor a menor reconocimiento por 2D10. Las superficies cargadas negativamente están en rojo y las

positivas están en azul. Las flechas negras resaltan las diferencias estructurales en Phl p 12, desde la hélice $\alpha-$ 3 hasta el giro que conecta la hebra β - 7.

RESULTADOS. Segunda parte.

3.9 Sobreexpresión de rFra e 2.2

En la Figura 18 se muestra una cinética de expresión de rFra e 2.2 en un gel de acrilamida al 12%, donde se obtuvo a la profilina de fresno a las 6 h.

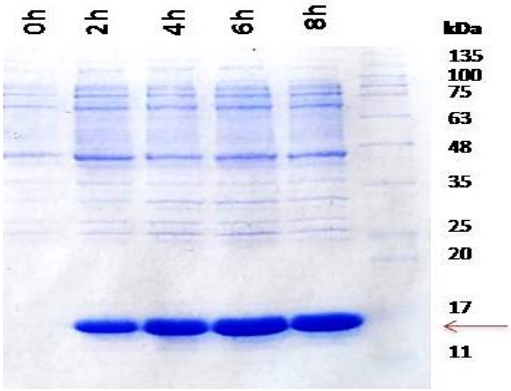

Figura 18. **Cinética de expresión de rFra e 2.2.** SDS-PAGE 12%. Carril 1: Fracción proteica soluble sin inducción tiempo 0 h. Carril 2-5: Fracción proteica soluble después de la inducción que corresponde a 2 h - 8 h. Carril 6: Marcador de peso molecular (kDa). La flecha indica la proteína recombinante rFra e 2 expresada en la fracción soluble.

3.10 Purificación rFra e2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas y espectrometría masas

rFra e2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas se purificó por una columna de afinidad a Ni^{2+}. En la Figura 19-A, se muestran las fracciones eluidas en un gel de acrilamida al 15%, carril 1 corresponde a la elución con 50 mM imidazol, el carril 2 a 100 mM de imidazol, y en el carril 3 a 500 mM imidazol eluye pura rFra e 2.2 fusionada a la etiqueta de histidinas, cuya masa molecular es de 18597 Da (Figura 19-B).

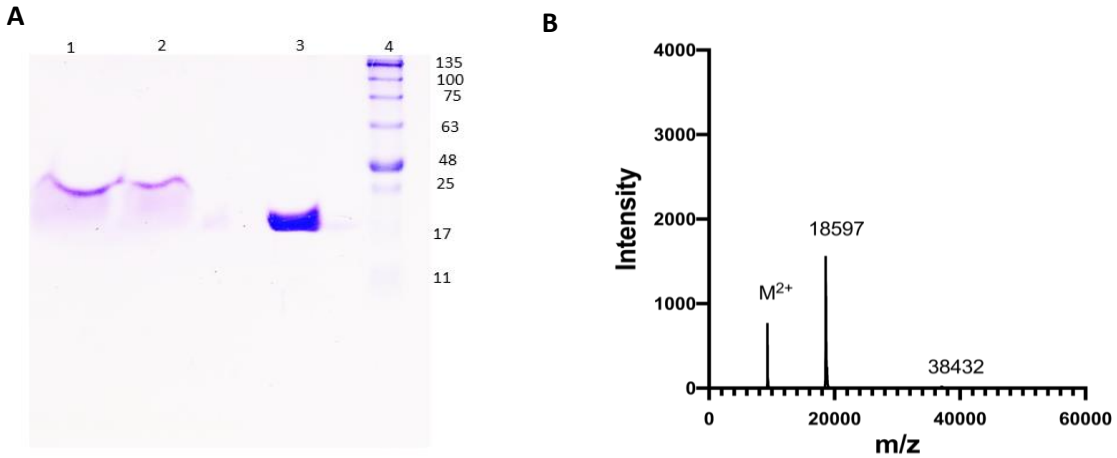

Figura 19. **Purificación de rFra e 2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas. A)** SDS-PAGE 15% de la purificación de rFra e 2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas por afinidad a Ni^{2+}, en

el carril 1: Elución con 50 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8.5. Carril 2: Elución con 250 mM Imidazol. Carril 3: Elución con 500 mM Imidazol con rFra e 2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas purificada. Carril 4: MPM. B) Espectro de masas de rFra e 2.2 fusionado a la etiqueta de histidinas, el pico mayoritario corresponde al monómero 18597 Da, y el segundo corresponde a 38432 Da dímero.

3.11 rFra e 2.2 y espectrometría de masas

Para remover la etiqueta de histidinas fusionada a rFra e 2, se cortó la proteína con la proteasa TEV por 3 días a 4°C. En la Figura 20 se muestra el espectro de masas de rFra e 2.2 purificada, cuya masa molecular corresponde a 14396 Da.

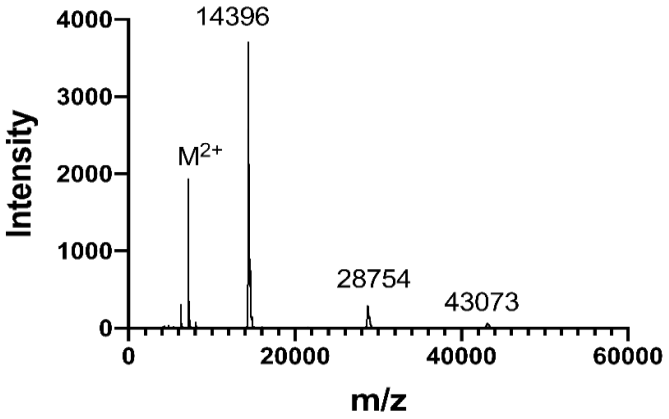

Figura 20. Espectro de masas de rFra e 2.2 purificada, sin la etiqueta de histidinas. Espectro de masas de rFra e 2.2 purificada, el pico principal corresponde al monómero de 14396 Da, el segundo pico en 28754 Da, que es el dímero y se observan, además otras fracciones oligoméricas.

3.12 Caracterización bioquímica de rFra e 2.2

El espectro de dicroísmo circular de rFra e 2 se obtuvo en la región del UV lejano mostrado en la Figura 21, indica que está plegada y que su contenido de estructura secundaria es similar al de otras profilinas.

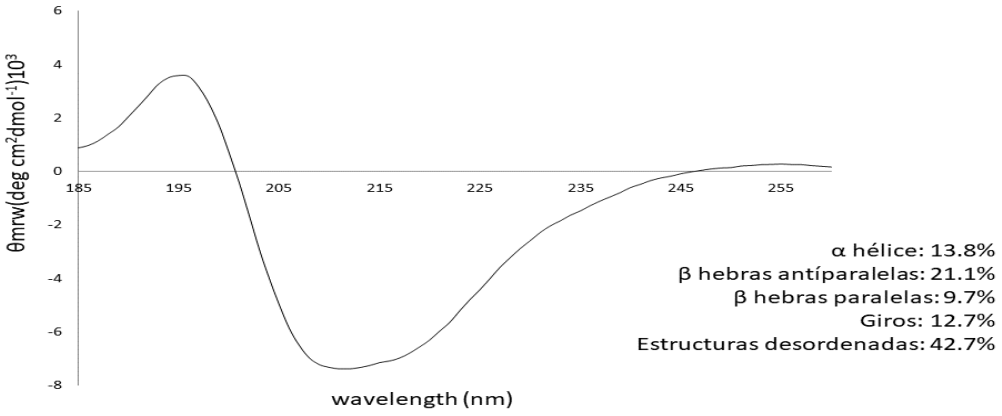

Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de rFra e 2.2 en la región del UV-lejano. El contenido de estructura secundaria obtenido por deconvolución.

3.13 Estabilidad térmica de rFra e 2.2

Para encontrar el amortiguador en el que la proteína es más estable, así como el adecuado para montar las pruebas de cristalización, se realizaron experimentos de termofluorescencia diferencial de barrido. En la Figura 22 se muestran las condiciones de mayor estabilidad, que fueron en los siguientes amortiguadores: 1M citrato de sodio tribásico pH 5.4 y 5.8, con una temperatura de fusión (Tm) 65°C, 1M citrato de sodio tribásico pH 5.6, con una Tm de 64°C, 1M cacodilato de sodio pH 6, 6.2 y 6.6, con una Tm de 65°C, 1M cacodilato de sodio pH 6.6, con una Tm de 64°C y Tris HCl pH 8.6, con una Tm de 65°C.

A

	pH		
	5.4	**5.6**	**5.8**
1M Citrato de sodio tribásico	65°C	64°C	65°C

C

	pH	
	8.6	**8.8**
1M Tris HCl	65°C	60°C

B

	pH			
	6	**6.2**	**6.4**	**6.6**
1M Cacodilato de sodio	65°C	65°C	64°C	65°C

Figura 22. Condiciones de mayor estabilidad térmica de rFra e 2.2 donde se indica la temperatura de fusión (Tm) en °C en cada condición de pH.

3.14 Pruebas de cristalización

Las pruebas de cristalización de rFra e 2.2, no fueron exitosas, ya que no se obtuvieron cristales adecuados para difractar, únicamente se obtuvieron esférulos, como los que se muestran en la Figura 23.

Figura 23. Esférulos de rFra e 2.2 en 100 mM acetato de sodio pH 4, 2M $(NH_4)_2SO_4$.

3.15 Análisis estructural del modelo de Fra e 2 con Hev b 8 (PDB:5FDS)

En la Figura 24 se muestra el modelo de Fra e 2 obtenido por AlphaFold, cuyo plegamiento está conservado al compararlo con profilinas de plantas reportadas en el PDB. Fra e 2 tiene tres hélices α, una hoja β formada por siete hebras β-plegadas antiparalelas, con sus respectivos giros y asas conectoras.

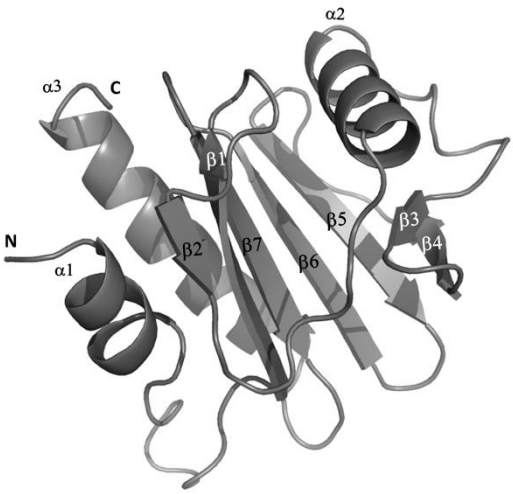

Figura 24. Modelo de rFra e 2 obtenido con Alphafold.

La superposición del modelo de Fra e 2 con la estructura cristalográfica de la profilina de Hev b 8 (PDB:5FDS) permitió identificar las diferencias de los residuos en el sitio de reconocimiento teórico del mAb 2D10, Figura 25. Estas diferencias encontradas en Hev b 8 son Asp9, Glu14, Asn100, Asp130 y Tyr133, mientras que Fra e 2 tiene Glu en 9, Asn14, Thr100, Glu130 y Leu133 mostrado en la Figura 25. Estas diferencias en ambas profilinas son relevantes para la afinidad del mAb 2D10, como se demostró anteriormente en la Tabla 2 de este trabajo. No se hicieron estos análisis para el sitio de reconocimiento teórico del mAb 1B4, ya que no se puede determinar el epítopo de manera precisa como se describió en el apartado 3.6, Tabla 3.

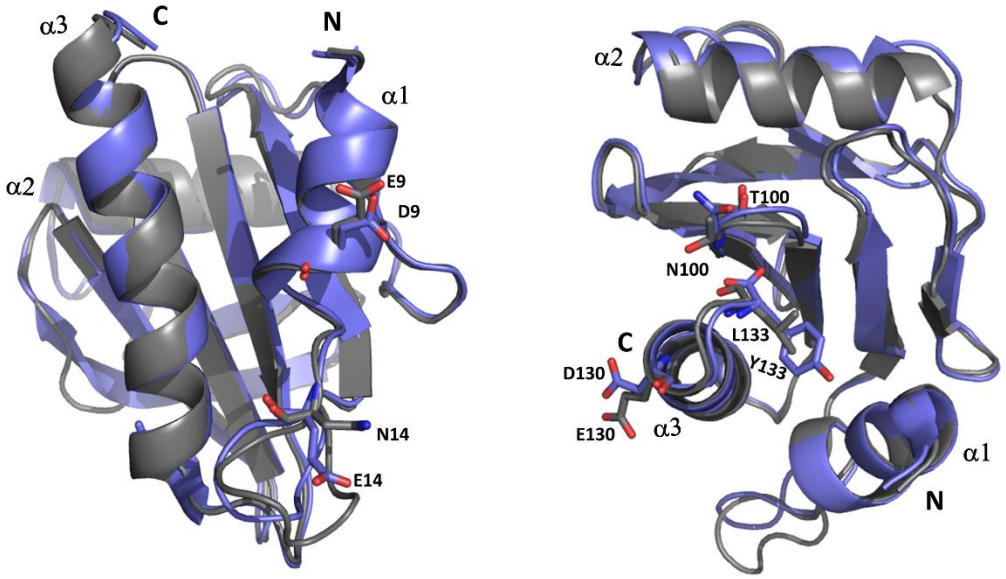

Figura 25. Residuos diferentes en el sitio de reconocimiento teórico de mAb 2D10 en las profilinas Fra e 2 y Hev b 8. Alineamiento de la estructura de rHev b 8 (PDB 5FDS) (violeta) con el modelo obtenido con AlphaFold de Fra e 2 (gris) con un RMSD de 0.4 Å.

DISCUSIÓN. Primera parte.

En este trabajo se evaluó el reconocimiento de los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 hacia varias profilinas de plantas, y se seleccionaron las profilinas de árboles (rBet v 2.0101 y rFra e 2.2), de malezas (rAmb a 8.0101 y rArt v 4.0101), de pasto (rPhl p 12.0101) y de maíz (rZea m 12.0105). Asimismo, se identificó los residuos involucrados de en la interacción con los mAbs IgGs 1B4 y 2D10, para esto se evaluó el reconocimiento de los mAbs por las profilinas de rZea m 12 y las dos mutantes de rZea m 12 (mutante sencilla rZea m 12 Gly98Asn y doble mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp), y se compararon los epítopos conformacionales de rHev b 8 en su interacción con el mAb IgE/2F5. Asimismo, con el fin de identificar si los residuos Asn98 y Asp128 estaban involucrados en el reconocimiento de IgEs, se usaron las profilinas rHev b 8, rZea m 12 y las dos mutantes de rZea m 12 contra el suero de pacientes alérgicos a profilina de látex y maíz.

Los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 mostraron un diferente patrón de reconocimiento por las profilinas de plantas, que poseen una identidad en su secuencia de aminoácidos del 67 al 79%. El mAb 2D10 reconoció a las profilinas de malezas: rArt v 4, en un 100%, y rAmb a 8, en un 88%, y en menor medida a las profilinas de los árboles rBet v 2 en un 56% y rFra e 2 en 44%. Por otra parte, 1B4 reconoció a las profilinas, rHev b 8 en un 100%, maíz (rZea m 12) en un 84.2%, pasto (rPhl p 12) en un 72% y maleza (rAmb a 8) 52% (Figura 12); además, también se ha reportado que reconoce a la profilina de tomate (Mares-Mejía et al., 2020).

En el alineamiento de secuencias de las profilinas de plantas que se usaron en este trabajó se mapearon los sitios de reconocimiento teóricos de los mAbs (Figura 15). La presencia del Asp130, que está conservado en rArt v 4, rAmb a 8 y rBet v 2 (D128 en Hev b 8), es esencial para el reconocimiento por 2D10. Por el contrario, las profilinas que tienen un Glu130 (rPhl p 12, rFra e 2, rZea m 12) prácticamente no son reconocidas (Figura 12). Esto se explica por la cadena lateral más larga del residuo Glu130, que genera un impedimento estérico en su interacción con los residuos del parátopo de 2D10 (Figura 16-B). Por lo tanto, la presencia de Asp130 en vez de Glu130 en las profilinas de plantas influye en su reconocimiento por el mAb 2D10. En estudios estructurales del complejo Fab IgE/2F5-rHev b 8 por nuestro grupo de trabajo, se identificaron dos interacciones relevantes que estabilizan el complejo. El Asp128 en rHev b 8 establece dos puentes salinos con los residuos Arg50 y Arg52 (CDR2-H) del parátopo y el Asn98 que interacciona a través de enlaces de puentes de hidrógeno con Thr55 en el CDR2-H (García-Ramírez et al., 2022).

El sitio de reconocimiento teórico para 2D10 se encuentra en la región de la secuencia más conservada de las profilinas de plantas (residuos 1-16, 118-133 en la Figura 15). Sin embargo,

hay ciertos aminoácidos diferentes en este sitio. En la Tabla 2 se observa que Phl l p 12 no fue reconocida por mAb 2D10, ya que presenta los residuos Gly100, Gln101 y Met133, lo que sugiere que estos residuos no participan en la interacción con mAb 2D10. En contraste con Art v 4, que tuvo un reconocimiento del 100% con este mAb (Figura 12), tiene Asp9, Asp14, y Asp130 (Tabla 2), esto sugiere, que estos residuos podrían estar estabilizando la interacción con el anticuerpo 2D10. En cambio, Fra e 2 tiene residuos diferentes con respecto a las profilinas más reconocidas (Art v 4 y Hev b 8), así también con Phl p 12 (Tabla 2). Lo que se esperaba era un bajo reconocimiento; sin embargo, lo que puede explicar su reconocimiento del 44%.

El sitio de reconocimiento teórico para 1B4 se encuentra en la región de la secuencia más variable de las profilinas de plantas (residuos 40–70 en la Figura 15). Por lo tanto, al comparar residuos que son diferentes en profilinas de plantas contra el porcentaje de reconocimiento que mostró 1B4 por las profilinas, como se muestra en la Tabla 3, se observa que Amb a 8 presenta residuos diferentes comparados con Hev b 8; sin embargo, muestra un reconocimiento del 56%. Esto último nos puede indicar que el mAb 1B4 no estaría reconociendo el sitio opuesto de la profilina reconocido por el mAb 2D10, o posiblemente que 1B4 no reconoce a Amb a 8 en el mismo sitio. Para mapear los epítopos conformacionales reconocidos por ambos anticuerpos en profilinas, es necesario realizar estudios estructurales de complejos Fabs/2D10 y 1B4 con rHev b 8, o bien obteniendo mutantes de Hev b 8 en los aminoácidos relevantes encontrados en este trabajo.

El alineamiento estructural de profilinas de plantas, que incluye a Amb a 8, Art v 4, Zea m 12, Bet v 2 y Fra e 2 indica que las hélices α-1 y 3 tienen una longitud similar a las de Hev b 8, que explica por qué fueron reconocidas por 2D10 (Figura 16). Debido a que la estructura de Phl p 12 (PDB 7KYW), es un dímero, la diferencia más relevante se observa en la hélice α-3 que es más corta y en consecuencia se forma un asa más larga que conecta con la hebra β-7, mientras que en las otras profilinas es un giro β, que es más corto (O'Malley et al., 2021). Por lo tanto, la exposición de los epítopos conformacionales a lo largo de la hélice α-3 de Phl p 12 difiere con el resto de las profilinas de plantas estudiadas. Esta diferencia estructural de Phl p 12 puede explicar por qué no es reconocido por el mAb 2D10. También Bet v 2 tiene una clara diferencia estructural en la hélice α -1 causada por un enlace disulfuro interno Cys13-Cys115 (Soh et al., 2017), que podría presentar una disposición diferente de los determinantes antigénicos que explicaría el reconocimiento del 54 % por 2D10, en contraste con el reconocimiento del control rHev b 8 (Figura 12-A). Westritschnig, *et al.* diseñaron una variante hipoalergénica reestructurada de profilina de pasto *Timothy* (rPhl p 12-rs) en orden "cola - cabeza", lo que significa que los

extremos N y C-terminales estaban invertidos. Esto implicaba que los epítopos conformacionales de las hélices α-1 y 3 en este alérgeno estaban en diferente conformación, y por consecuencia esta variante mostró tener una reactividad a IgE y una alergenicidad reducida (Westritschnig et al., 2007). Esto confirma que las diferencias conformacionales en las hélices α - 1 y 3 de profilinas de plantas impactan en el reconocimiento de anticuerpos.

El análisis del potencial electrostático en la superficie de las hélices α - 1 y 3 de profilinas de plantas (Figura 17) indica que la distribución de la carga negativa es relevante para el reconocimiento de 2D10. La conservación de la carga negativa en las profilinas también es importante para su interacción con el parátopo (O'Malley et al., 2021). Además, mediante los análisis estructurales de complejos de Fabs/IgGs con alérgeno se ha demostrado que los residuos Aspártico y Glutámico conforman con frecuencia una gran parte de los determinantes antigénicos (Pomés et al., 2020). Ejemplo de ello, en la estructura del complejo Fab/21E11-rApi m 2, el residuo Asp146 del epítopo interacciona con la Tyr32 de la L-CDR 1 (parátopo) y el Asp145 interacciona con la Gly93 del parátopo L-CDR 3, a través de puentes de hidrógeno (Padavattan et al., 2007). Además, en estudios del complejo Fab/BV16-rBet v 1, se determinó que el residuo Glu45 del epítopo interactúa con el Trp104 del H-CDR 1 y el Trp33 del H-CDR 3 a través de dos puentes de hidrógeno (Mirza et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 exhibieron diferentes patrones de reconocimiento por las profilinas de plantas, tales como artemisa (*Artemisia vulgaris*), ambrosía (*Ambrosia elatior*), pasto Timothy (*Phleum pratense*), que son similares a los reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos al látex (Fuchs et al., 1997). Estos autores demostraron que rBet v 2 no comparte epítopos con rHev b 8 (Fuchs et al., 1997). Cabe destacar, que el uso de ambos mAbs (1B4 y 2D10) bloquean el reconocimiento de anticuerpos IgE e IgG_4 de sueros de pacientes alérgicos a profilinas de látex y de maíz en un 90% y un 40%, respectivamente. Lo que demuestra que éstos dos mAbs comparten la superficie de unión de los anticuerpos policlonales de sueros de pacientes alérgicos a profilina de látex (Mares-Mejía et al., 2020). Por lo tanto, esto nos permite hipotetizar que los mAbs podrían tener un efecto inhibidor de unión de IgEs con rAmb a 8, rArt v 4 y rPhl p 12 que fueron reconocidas por los mAbs (1B4 y 2D10), por lo que es necesario realizar ensayos de inhibición con IgE de sueros de pacientes alérgicos a estás profilinas.

Cabe resaltar, que la doble mutante rZea m 12:Gly98Asn-Glu128Asp presentó mayor reconocimiento con las IgE de un conjunto de sueros de pacientes alérgicos a látex y a maíz, en

comparación con la mutante sencilla de rZea m 12:Glu128Asp (Figura 14). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por (García-Ramírez et al., 2022), donde mAb IgE/2F5 mostró un reconocimiento del 56% con la doble mutante rZea m 12 Gly98Asn-Glu128Asp. Por lo tanto, N98 es un residuo relevante reconocido por las IgEs de sueros de individuos alérgicos al látex. De acuerdo con el alineamiento mostrado en la Figura 3, las profilinas de cacahuate (Ara h 5), que presenta los residuos Asn98 y Asp130, así como la de tomate (Sola l 1) tienen conservada a la Asn98, podrían tener reactividad cruzada en IgE de individuos alérgicos a látex.

Las razones por las que se utiliza rHev b 8 como referencia para la determinación de epítopos conformacionales de profilinas de plantas son: a) Que participa en el síndrome de polen-látex-frutos. b) En nuestro grupo se obtuvo un conjunto de mAbs IgE/2F5 e IgGs/1B4 y 2D10 anti-rHev b 8 que nos permitieron explicar el reconocimiento de los anticuerpos hacia las profilinas, así como los posibles mecanismos de la reactividad cruzada con IgE. c) Se identificaron los epítopos conformacionales reconocidos por el mAb IgE/2F5 mediante estudios estructurales del complejo Fab IgE/2F5-rHev b 8.

Estos mAbs que reconocen diferentes profilinas de plantas son una herramienta prometedora en la alergia, tanto para el diagnóstico (Abedini et al., 2011; Sankian et al., 2005), como para el mapeo de epítopos (Mirza et al., 2000; Chruszcz et al., 2012). Además, la humanización de éstos mAbs podría tener implicaciones terapéuticas en pacientes alérgicos a profilinas (Sae-Wong et al., 2016; Orengo et al., 2018; Yoshino & Mizutani, 2016; Atanasio et al., 2022).

DISCUSIÓN. Segunda parte.

El árbol de fresno tiene una amplia distribución a nivel mundial, ya que se encuentra en parques y bosques de áreas urbanas. La amplia distribución de este árbol conlleva a que el polen alcance altas concentraciones en la atmósfera (1,000 granos/m^3) causando enfermedades respiratorias alérgicas (Barderas et al. 2005; Hrabina et al. 2006; Asam et al., 2015). Por lo tanto, las profilinas que son abundantes en el polen son panalérgenos; éstas tienen elementos estructurales conservados que dan lugar a reactividad-cruzada. La sensibilización de individuos susceptibles a profilinas de pólenes no sólo causa enfermedades respiratorias alérgicas, sino que, la exposición a profilinas de alimentos genera el síndrome oral alérgico, lo cual, en la clínica, genera dificultades en el diagnóstico específico de las alergias y puede llegar a manifestaciones graves como asma en el paciente como un choque anafiláctico (S. Mas et al., 2014; Ganglberger et al., 2001; Ciprandi et al. 2016). Actualmente, la determinación de nuevas isoformas de alérgenos se realiza mediante librerías de cDNA, y por estudios proteómicos. En este trabajo se purificó profilina del polen de fresno en la CDMX, se identificaron dos péptidos que pertenecían a rFra e

2.2. Por lo que, se realizó la caracterización biofísico-estructural de dicha isoforma recombinante, la cual, no había sido caracterizada, y que comparte un 72% de identidad con rFra e 2.1, (Mas et al en 2014).

En el espectro de masas MALDI-TOF de rFra e 2.2, se observa que la proteína está pura con una masa de 14.3 kDa y que además oligomeriza (Figura-20). El espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de este alérgeno indica que está plegada, y su contenido de estructura secundaria es similar a rFra e 2.1. Además, se demostró por termofluorescencia que rFra e 2.2 tiene un amplio rango de estabilidad (Tm: 60-65°C, pH 5.4–8.6), en comparación con otras profilinas de plantas: rAmb 8 (Tm: 56°C, pH 6.5 – 9.5), rArt v 4 (Tm: 54°C, pH 6.5 – 9.5 pH), rBet v 2 (Tm: 55°C, pH 7 – 9.5) y rPhl p 12 (Tm: 51-60°C, pH 4 – 9.5) en concentraciones de 50 mM de amortiguadores (acetatos (pH 4.0−5.0), bis-Tris (pH 5.5−6.5), Tris (pH 7.0−8.0), y ácido ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (pH 8.5−9.5) (Cudowska et al., 2020; Booth et al. 2018). Este amplio rango de estabilidad en el amortiguador facilita el almacenamiento y uso de los extractos en pruebas cutáneas. Por lo tanto, la obtención de profilina de la recombinante (rFra e 2.2) se puede utilizar en la clínica para el diagnóstico de alergias resuelto por componentes, es decir, en pruebas moleculares. Asimismo, la obtención de esta profilina permite homologar las concentraciones de alérgeno en los extractos, así como, permitir que el diagnóstico sea específico y preciso (Asero et al., 2015; Asero et al., 2016; Pitsios et al., 2019).

A pesar de que la profilina de fresno es un alérgeno relevante, no hay una estructura tridimensional que permita analizar sus epítopos conformacionales. Dado que no se obtuvieron cristales adecuados para los experimentos de difracción de rayos X, se obtuvo un modelo teórico con el programa de inteligencia artificial AlphaFold. La estructura tridimensional obtenida es similar a la de las profilinas de plantas depositadas en el PDB (Figura 16 y 25).

La Figura 12 muestra que el mAb 2D10 reconoce a Hev b 8 y a Fra e 2 en un 87% y 44%, respectivamente. Basados en el modelo teórico de interacción de este anticuerpo con Hev b 8, se analizaron las diferencias de los aminoácidos en la hélice α – 1 y 3 (Figura 25). La primera diferencia es que Hev b 8 presenta Asp9 y Asp130, en comparación Fra e 2 presenta Glu9 y Glu130, por tanto, la cadena lateral del ácido glutámico podría generar un impedimento estérico. La segunda diferencia es que Hev b 8 tiene Glu14 y Asn100, mientras que Fra e 2 presenta una Asn14, y una Thr100. Es decir, el Glu14 tiene una carga negativa que permite la formación de puentes salinos con el parátopo, mientras que Asn100 es polar sin carga. Por el contrario, la

Thr100 de Fra e 2 podría formar puentes de hidrógeno con el mAb 2D10. Finalmente, Hev b 8 tiene una Tyr133, que es un aminoácido aromático, con grupo hidroxilo, mientras que Fra e 2 tiene una Leu133, cuya cadena lateral no polar. Debido a las distintas propiedades de cada uno de los aminoácidos en la superficie de las profilinas, estos aminoácidos son relevantes para la interacción con anticuerpos. Previamente, se ha demostrado con el alérgeno Ani s 4-P *(A. Simplex*), que tiene un aminoácido diferente, que es una prolina por una leucina. La prolina induce cambios en la estructura secundaria y altera el reconocimiento de IgE, teniendo un menor potencial alergénico (Rodríguez-Mahillo AI et al., 2008). Por lo tanto, el hecho de que las IgEs tengan menos reactividad hacia cierto alérgeno, permite a los alergólogos mejorar el diagnóstico, diseñar mejores inmunoterapias personalizadas en el proceso de desensibilización del paciente, con el fin de evitar las enfermedades alérgicas durante el proceso terapéutico (S. Mas et al., 2014; Cudowska et al., 2020; Rodríguez-Mahillo AI et al. 2008).

CONCLUSIONES

- Los mAbs IgGs 1B4 y 2D10 (anti-rHev b 8) reconocen a profilinas de plantas de distintas fuentes, y éstos se pueden utilizar como una herramienta diagnóstica.

- La presencia de Asp130 en la hélice α – 3 de las profilinas de plantas es relevante para la interacción con mAb 2D10, siendo parte del epítopo conformacional. Por lo tanto, el cambio por el residuo Glu130 hace que éstas presenten un bajo reconocimiento. Además, la conservación en la longitud de la hélice α – 3 y el asa que conecta con la hebra β – 7, así como la distribución de la carga negativa en la superficies de las hélices α -1 y 3 son relevantes para la interacción con el mAb 2D10.

- Se identificó que el Asn98 en rHev b 8 forma parte de un epítopo conformacional relevante para la interacción de este alérgeno con las IgE de sueros de pacientes alérgicos a las profilinas de látex y de maíz.

- El análisis de los sitios de reconocimiento teórico de los mAbs 1B4 y 2D10, contra el reconocimiento obtenido por las profilinas de plantas, sugieren que 1B4 reconoce una región que no es precisamente el sitio opuesto al reconocido por el mAb 2D10. Mientras que para el mAb 2D10 se determinó que los aminoácidos Asp9, Asp14, y Asp130 de las profilinas de plantas son relevantes para su reconocimiento.

- El estudio de interacciones entre los mAbs IgGs anti-rHev b 8 (1B4 y 2D10) con las profilinas de plantas es importante para explicar los mecanismos de la reactividad cruzada con IgE de pacientes alérgicos. stos mAbs con capacidad de inhibir la unión de IgE a profilinas de plantas pueden utilizarse para el mapeo de epítopos conformacionales potenciales, que permitirá el desarrollo de estrategias terapéuticas para pacientes alérgicos a profilinas.

- La profilina recombinante rFra e 2.2 está plegada y la predicción de su estructura indica que está conservada con las demás profilinas de plantas estudiadas en este trabajo. Además, presenta un amplio rango de estabilidad, lo que favorece mayor estabilidad en condiciones de almacenamiento. Los resultados de este estudio permiten contribuir a resolver problemas en la clínica como son la estandarización de alérgenos en los kits para las pruebas cutáneas, es decir, en el diagnóstico de alergias resuelto por componentes, así como, su potencial uso en inmunoterapias para desensibilizar al paciente.

PERSPECTIVAS

- Se confirmó que mAb 2D10 reconoce el Asp130 en profilinas de plantas, pero no se identificaron los residuos que reconoce el mAb 1B4. Por lo que se recomienda realizar la purificación de los Fabs 1B4 y 2D10, formar el complejo con las profilinas: Fabs 2D10 y 1B4-rHev b 8, Fabs 2D10-rArt v 4 y determinar la estructura del complejos por cristalografía de rayos X.

- Debido a que los mAbs IgGs 2D10 y 1B4 reconocieron a las profilinas de rArt v 4, rAmb b 8 y rPhl p 12, se recomienda evaluar su capacidad neutralizante contra anticuerpos IgE de pacientes alérgicos a estas profilinas.

REFERENCIAS

Aalberse, R. C., & Schuurman, J. (2002). IgG4 breaking the rules. *Immunology, 105*(1), 9-19. doi:10.1046/j.0019-2805.2001.01341.x

Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., & Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy, 39*(4), 469-477. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x

Abedini, S., Sankian, M., Falak, R., Tehrani, M., Talebi, F., Shirazi, F. G., & Varasteh, A.-R. (2011). An approach for detection and quantification of fruits' natural profilin: natural melon profilin as a model. *Food and Agricultural Immunology, 22*(1), 47-55. doi:10.1080/09540105.2010.524918

Abdi, H. 2007. Encyclopedia of Measurement and Statistics. ed. Salkind, N. J. Sage, Thousand Oaks,CA,pp. 103–107.

Al-Ghouleh, A., Johal, R., Sharquie, I. K., Emara, M., Harrington, H., Shakib, F., & Ghaemmaghami, A. M. (2012). The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. *PLoS One, 7*(3), e33929. doi:10.1371/journal.pone.0033929

Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L. and Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens - An update from a molecular perspective. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 70(10), pp. 1201–1211. doi: 10.1111/all.12696.

Asero, R., Mistrello, G., & Amato, S. (2016). Detection of pan-allergens in commercial pollen extracts for allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol, 117*(2), 180-185. doi:10.1016/j.anai.2016.05.010

Asero, R., Monsalve, R., & Barber, D. (2008). Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy, 38*(6), 1033-1037. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02980.x

Asero, R., Tripodi, S., Dondi, A., Di Rienzo Businco, A., Sfika, I., Bianchi, A., . . . Matricardi, P. M .(2015). Prevalence and Clinical Relevance of IgE Sensitization to Profilin in Childhood: A Multicenter Study. *Int Arch Allergy Immunol, 168*(1), 25-31. doi:10.1159/000441222

Asturias, J. A., Gómez-Bayón, N., Arilla, M. C., Sánchez-Pulido, L., Valencia, A., & Martínez, A. (2002). Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies. *Int Immunol, 14*(9), 993-1001. doi:10.1093/intimm/dxf070

Atanasio, A., Franklin, M. C., Kamat, V., Hernandez, A. R., Badithe, A., Ben, L. H., . . . Orengo, J. M. (2022). Targeting immunodominant Bet v 1 epitopes with monoclonal antibodies prevents the birch allergic response. *J Allergy Clin Immunol, 149*(1), 200-211. doi:10.1016/j.jaci.2021.05.038

Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G. and 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), pp. 351–357. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.001.

Beavil, A. J., Young, R. J., Sutton, B. J., & Perkins, S. J. (1995). Bent domain structure of recombinant human IgE-Fc in solution by X-ray and neutron scattering in conjunction with an automated curve fitting procedure. *Biochemistry, 34*(44), 14449-14461. doi:10.1021/bi00044a023

Bergougnan, C., Dittlein, D. C., Hümmer, E., Riepl, R., Eisenbart, S., Böck, D., . . . Gilles, S. (2020). Physical and immunological barrier of human primary nasal epithelial cells from non-allergic and allergic donors. *World Allergy Organ J, 13*(3), 100109. doi:10.1016/j.waojou.2020.100109

Bischoff, S. C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol, 7*(2), 93-104. doi:10.1038/nri2018

Brożek, J. L., Bousquet, J., Agache, I., Agarwal, A., Bachert, C., Bosnic-Anticevich, S., . . . Schünemann, H. J. (2017). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol, 140*(4), 950-958. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.050

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood, 113*(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754

Booth, W.T. et al. (2018). Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability. *ACS Omega* 3(1), pp. 760–768. doi: 10.1021/acsomega.7b01598.

Burbach, G. J., Heinzerling, L. M., Edenharter, G., Bachert, C., Bindslev-Jensen, C., Bonini, S., . . . Zuberbier, T. (2009). GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. *Allergy, 64*(10), 1507-1515. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02089.x

Cecchi, L. From pollen count to pollen potency: the molecular era of aerobiology. (2013). *Eur Respir J, 42*(4), 898-900. doi:10.1183/09031936.00096413

Chapman, M. D., Pomés, A., Breiteneder, H., & Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol, 119*(2), 414-420. doi:10.1016/j.jaci.2006.11.001

Chruszcz, M., Pomés, A., Glesner, J., Vailes, L. D., Osinski, T., Porebski, P. J., . . . Chapman, M. D. (2012). Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem, 287*(10), 7388-7398. doi:10.1074/jbc.M111.311159

Ciprandi, G. et al. 2016. Profiles of birch sensitization (Bet v 1, Bet v 2, and Bet v 4) and oral allergy syndrome across Italy. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 26(4), pp. 244–248. doi: 10.18176/jiaci.0041.

Conejero, L., Higaki, Y., Baeza, M. L., Fernández, M., Varela-Nieto, I., & Zubeldia, J. M. (2007). Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. *Clin Exp Allergy, 37*(3), 331-338. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02660.x

Cudowska, B., Kapingidza, A. B., Pawłowicz, M., Pampuch, A., Hyduke, N., Pote, S., . . . Kowal, K. (2020). Production and Use of Recombinant Profilins Amb a 8, Art v 4, Bet v 2, and Phl p 12 for Allergenic Sensitization Studies. *Molecules, 25*(2). doi:10.3390/molecules25020369

Dall'antonia F, Pavkov-Keller T, Zangger K, Keller W. (2014). Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods.* 1;66(1):3-21. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.07.024.

Davies, A. M., Rispens, T., Ooijevaar-de Heer, P., Gould, H. J., Jefferis, R., Aalberse, R. C., & Sutton, B. J. (2014). Structural determinants of unique properties of human IgG4-Fc. *J Mol Biol, 426*(3), 630-644. doi:10.1016/j.jmb.2013.10.039

De Roos, A. J., Kenyon, C. C., Zhao, Y., Moore, K., Melly, S., Hubbard, R. A., . . . Schinasi, L. H. (2020). Ambient daily pollen levels in association with asthma exacerbation among children in Philadelphia, Pennsylvania. *Environ Int, 145*, 106138. doi:10.1016/j.envint.2020.106138

Eaaci. (2014). Global Atlas of Allergy. *Zurich: Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology EAACI*, 407.

Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs, 7*(1), 9-14. doi:10.4161/19420862.2015.989042

Eder, K., Gellrich, D., Meßmer, C., Canis, M., & Gröger, M. (2018). Component resolved analysis of ash pollen allergy in Bavaria. *Allergy Asthma Clin Immunol, 14*, 76. doi:10.1186/s13223-018-0291-4

Erbas B, Chang JH, Dharmage S, Ong EK, Hyndman R, Newbigin E, Abramson M. (2007). Do levels of airborne grass pollen influence asthma hospital admissions? *Clin Exp Allergy.* 37(11):1641-7. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02818.x.

Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., & Mari, A. (2004). Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy, 59*(3), 243-267. doi:10.1046/j.1398-9995.2003.00407.x

Fuchs, T., Spitzauer, S., Vente, C., Hevler, J., Kapiotis, S., Rumpold, H., . . . Valenta, R. (1997). Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol, 100*(3), 356-364. doi:10.1016/s0091-6749(97)70249-5

Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature, 454*(7203), 445-454. doi:10.1038/nature07204

Ganglberger, E., Radauer, C., Wagner, S., Ríordáin, G., Beezhold, D. H., Brehler, R., . . . Breiteneder, H. (2001). Hev b 8, the Hevea brasiliensis latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch Allergy Immunol, 125*(3), 216-227. doi:10.1159/000053819

García-Ramírez, B., Mares-Mejía, I., Rodríguez-Hernández, A., Cano-Sánchez, P., Torres-Larios, A., Ortega, E., & Rodríguez-Romero, A. (2022). A native IgE in complex with profilin provides insights into allergen recognition and cross-reactivity. *Commun Biol, 5*(1), 748. doi:10.1038/s42003-022-03718-w

González Roldán, N., Engel, R., Düpow, S., Jakob, K., Koops, F., Orinska, Z., . . . Duda, K. A. (2019). Lipid Mediators From Timothy Grass Pollen Contribute to the Effector Phase of Allergy and Prime Dendritic Cells for Glycolipid Presentation. *Front Immunol, 10*, 974. doi:10.3389/fimmu.2019.00974

Guillén, G., López-Sánchez, L. M., Román-Roque, C. S., Sánchez, F., & Villanueva, M. A. (2001). Biochemical characterization of profilin from seeds of Phaseolus vulgaris L. *Plant Cell Physiol, 42*(1), 54-62. doi:10.1093/pcp/pce006

Guryanova, S. V., Finkina, E. I., Melnikova, D. N., Bogdanov, I. V., Bohle, B., & Ovchinnikova, T. V. (2022). How Do Pollen Allergens Sensitize? *Front Mol Biosci, 9*, 900533. doi:10.3389/fmolb.2022.900533

Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., & Egger, M. (2010). Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol, 6*(1), 1. doi:10.1186/1710-1492-6-1

Holdom, M. D., Davies, A. M., Nettleship, J. E., Bagby, S. C., Dhaliwal, B., Girardi, E., . . . Sutton, B. J. (2011). Conformational changes in IgE contribute to its uniquely slow dissociation rate from receptor FcεRI. *Nat Struct Mol Biol, 18*(5), 571-576. doi:10.1038/nsmb.2044

Hrabina, M., Purohit, A., Oster, J. P., Papanikolaou, I., Jain, K., Pascal, P., . . . André, C. (2007). Standardization of an ash (Fraxinus excelsior) pollen allergen extract. *Int Arch Allergy Immunol, 142*(1), 11-18. doi:10.1159/000095994

Huertas, A.J., Carreño, A., Mérida, C., Pajarón-Fernández, M.J., Ramírez-Hernández, M. and Carnés, J. (2014). Profilin sensitisation in a Mediterranean population. Allergologia et Immunopathologia 42(5), pp. 387–394. doi: 10.1016/j.aller.2013.09.005.

Jockusch, B. M., Murk, K., & Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159*, 131-149. doi:10.1007/112_2007_704

Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596: 583–589.

Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., . . . Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci, 27*(1), 112-128. doi:10.1002/pro.3280

Kapingidza, A.B., Pye, S.E., Hyduke, N., Dolamore, C., Schlachter, C.R., Commins, S.P. and Kowal, K. 2019. Comparative structural and thermal stability studies of Cuc m 2.0101, Art v 4.0101 and other allergenic profilins Allergic profilins. Mol. Immunol. 114, pp. 19–29. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.004.

Kim, K. I., Lee, B., Min, T. K., Lee, J., Pyun, B. Y., & Jeon, Y. H. (2019). Clinical Characteristics of Oral Allergy Syndrome in Children with Atopic Dermatitis and Birch Sensitization: a Single Center Study. *J Korean Med Sci, 34*(2), e11. doi:10.3346/jkms.2019.34.e11

Knight, D.A. and Holgate, S.T. 2003. Invited review series: Cells of the lung The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. pp. 432–446. DOI: 10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x

Kondo, Y., & Urisu, A. (2009). Oral allergy syndrome. *Allergol Int, 58*(4), 485-491. doi:10.2332/allergolint.09-RAI-0136

Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol, 7*(5), 365-378. doi:10.1038/nri2072

Lacey, J. (1996). Spore dispersal — its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycological Research, 100*(6), 641-660

Lai, C. K., Beasley, R., Crane, J., Foliaki, S., Shah, J., & Weiland, S. (2009). Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax, 64*(6), 476-483. doi:10.1136/thx.2008.106609

Landolina, N., & Levi-Schaffer, F. (2016). Monoclonal antibodies: the new magic bullets for allergy: IUPHAR Review 17. *Br J Pharmacol, 173*(5), 793-803. doi:10.1111/bph.13396

Ledesma, A., Rodríguez, R., & Villalba, M. (1998). Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy, 53*(5), 520-526. doi:10.1111/j.1398-9995.1998.tb04090.x

Lee, S. I., Pham le, D., Shin, Y. S., Suh, D. H., & Park, H. S. (2014). Environmental changes could enhance the biological effect of Hop J pollens on human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol, 134*(2), 470-472. doi:10.1016/j.jaci.2014.01.034

Liu, Y. J. (2009). TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol, 101*, 1-25. doi:10.1016/s0065-2776(08)01001-8

Mares-Mejía, I., García-Ramírez, B., Torres-Larios, A., Rodríguez-Hernández, A., Osornio-Hernández, A. I., Terán-Olvera, G., . . . Rodríguez-Romero, A. (2020). Novel murine mAbs define specific and cross-reactive epitopes on the latex profilin panallergen Hev b 8. *Mol Immunol, 128*, 10-21. doi:10.1016/j.molimm.2020.09.017

Mas, S., Garrido-Arandia, M., Batanero, E., Purohit, A., Pauli, G., Rodríguez, R., . . . Villalba, M. (2014). Characterization of profilin and polcalcin panallergens from ash pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol, 24*(4), 257-266.

Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J. N., Wissenbach, M., Spangfort, M. D., & Gajhede, M. (2000). Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol, 165*(1), 331-338. doi:10.4049/jimmunol.165.1.331

Morales, S., Jiménez-López, J. C., Castro, A. J., Rodríguez-García, M. I., & Alché, J. D. (2008). Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. *J Microsc, 231*(2), 332-341. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02044.x

Newson R, Strachan D, Archibald E, Emberlin J, Hardaker P, Collier C. (1997). Effect of thunderstorms and airborne grass pollen on the incidence of acute asthma in England, 1990-94. Thorax. 52(8):680-5. doi: 10.1136/thx.52.8.680.

Nitschke M, Dear KBG, Venugopal K, Lyne KMR, Jersmann HPA, Simon DL, Spurrier N. (2022). Association between grass, tree and weed pollen and asthma health outcomes in Adelaide, South Australia: a time series regression analysis. BMJ Open. 22;12(11):e066851. doi: 10.1136/bmjopen-2022-066851.Nucera, E., Aruanno, A., Rizzi, A., & Centrone, M. (2020). Latex Allergy: Current Status and Future Perspectives. *J Asthma Allergy, 13*, 385-398. doi:10.2147/jaa.S242058

Nucera, E., Aruanno, A., Rizzi, A., Pecora, V., Patriarca, G., Buonomo, A., . . . Schiavino, D. (2016). Profilin desensitization: A case series. *Int J Immunopathol Pharmacol, 29*(3), 529-536. doi:10.1177/0394632015621926

O'Malley, A., Kapingidza, A. B., Hyduke, N., Dolamore, C., Kowal, K., & Chruszcz, M. (2021). Crystal structure of timothy grass allergen Phl p 12.0101 reveals an unusual profilin dimer. *Acta Biochim Pol, 68*(1), 15-22. doi:10.18388/abp.2020_5587

Obersteiner, A., Gilles, S., Frank, U., Beck, I., Häring, F., Ernst, D., . . . Schmid, M. (2016). Pollen-Associated Microbiome Correlates with Pollution Parameters and the Allergenicity of Pollen. *PLoS One, 11*(2), e0149545. doi:10.1371/journal.pone.0149545

Offermann, L. R., Schlachter, C. R., Perdue, M. L., Majorek, K. A., He, J. Z., Booth, W. T., . . . Chruszcz, M. (2016). Structural, Functional, and Immunological Characterization of Profilin Panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J Biol Chem, 291*(30), 15447-15459. doi:10.1074/jbc.M116.733659

O'Farrill-Romanillos, P.M. *et al.* (2022). 'Síndrome Polen-Alimento. Revisión con un toque', *Revista Alergia México*, 69. doi:10.29262/ram.v69isupl1.1018.

Orengo, J. M., Radin, A. R., Kamat, V., Badithe, A., Ben, L. H., Bennett, B. L., . . . Yancopoulos, G. D. (2018). Treating cat allergy with monoclonal IgG antibodies that bind allergen and prevent IgE engagement. *Nat Commun, 9*(1), 1421. doi:10.1038/s41467-018-03636-8

Osterballe, M., Hansen, T. K., Mortz, C. G., & Bindslev-Jensen, C. (2005). The clinical relevance of sensitization to pollen-related fruits and vegetables in unselected pollen-sensitized adults. *Allergy, 60*(2), 218-225. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00674.x

Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., . . . Markovic-Housley, Z. (2007). Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J Mol Biol, 368*(3), 742-752. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.036

Padlan, E. A., & Davies, D. R. (1986). A model of the Fc of immunoglobulin E. *Mol Immunol, 23*(10), 1063-1075. doi:10.1016/0161-5890(86)90005-2

Pawankar, R., Canonica, G. W., Holgate, S. T., & Lockey, R. F. (2012). Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Curr Opin Allergy Clin Immunol, 12*(1), 39-41. doi:10.1097/ACI.0b013e32834ec13b

Pitsios, C., Iliopoulou, A., Kontogianni, M., & Papagregoriou, G. (2019). Detection of profilin in SPT extracts that are supposed to contain it. *Allergol Immunopathol (Madr), 47*(1), 12-15. doi:10.1016/j.aller.2018.05.003

Pomés, A., Mueller, G. A., & Chruszcz, M. (2020). Structural Aspects of the Allergen-Antibody Interaction. *Front Immunol, 11*, 2067. doi:10.3389/fimmu.2020.02067

Radauer, C., Willerroider, M., Fuchs, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Ferreira, F., . . . Breiteneder, H. (2006). Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy, 36*(7), 920-929. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02521.x

Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M, Moneo I. (2008). Identification and allergenic characterisation of a new isoform of the A. simplex allergen Ani s 4. Mol Biochem Parasitol. 160(2):152-6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.04.007. Epub 2008 May 6. PMID: 18501441.

Ruiz-Hornillos, J., López-Matas, M. A., Berges Jimeno, P., Henríquez, A., Blanco, S., Seoane-Rodríguez, M., . . . Carnés, J. (2020). Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases. *Allergy, 75*(4), 853-861. doi:10.1111/all.14140

Sánchez-Landero (2013) *Análisis estadístico de la contaminación en hojas de Fraxinus udehi de la zona metropolitana del valle de México*. Universidad Veracruzana.

Sankian, M., Glosaz-Shirazi, F., Arafi, M., Moghadam, M., & Varasteh, A. (2008). Production and characterization of monoclonal antibody against Saffron pollen profilin, Cro s 2. *Iran J Immunol, 5*(3), 156-162.

Sankian, M., Varasteh, A., Pazouki, N., & Mahmoudi, M. (2005). Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity. *Clin Mol Allergy, 3*, 13. doi:10.1186/1476-7961-3-13

Sekerkova, A., Polackova, M., & Striz, I. (2012). Detection of Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 and Phl p 12 specific IgE antibodies in the sera of children and adult patients allergic to Phleum pollen. *Allergol Int, 61*(2), 339-346. doi:10.2332/allergolint.11-OA-0372

Shade, K.-T.C.; Anthony, R.M. (2013). Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies. 2*, 392-414. https://doi.org/10.3390/antib2030392

Shrestha, S. K., Katelaris, C., Dharmage, S. C., Burton, P., Vicendese, D., Tham, R., . . . Erbas, B. (2018). High ambient levels of grass, weed and other pollen are associated with asthma admissions in children and adolescents: A large 5-year case-crossover study. *Clin Exp Allergy, 48*(11), 1421-1428. doi:10.1111/cea.13225

Soh, W. T., Briza, P., Dall, E., Asam, C., Schubert, M., Huber, S., . . . Brandstetter, H. (2017). Two Distinct Conformations in Bet v 2 Determine Its Proteolytic Resistance to Cathepsin S. *Int J Mol Sci, 18*(10). doi:10.3390/ijms18102156

Sutton, B. J., Davies, A. M., Bax, H. J., & Karagiannis, S. N. (2019). IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies (Basel), 8*(1). doi:10.3390/antib8010019

Taketomi, E. A., Sopelete, M. C., de Sousa Moreira, P. F., & de Assis Machado Vieira, F. (2006). Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Braz J Otorhinolaryngol, 72*(4), 562-567. doi:10.1016/s1808-8694(15)31005-3

Thorn, K. S., Christensen, H. E., Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., . . . Schutt, C. E. (1997). The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure, 5*(1), 19-32. doi:10.1016/s0969-2126(97)00163-9

Tordesillas, L., Pacios, L. F., Palacín, A., Cuesta-Herranz, J., Madero, M., & Díaz-Perales, A. (2010). Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clin Exp Allergy, 40*(1), 174-181. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03401.x

Wan, T., Beavil, R. L., Fabiane, S. M., Beavil, A. J., Sohi, M. K., Keown, M., . . . Sutton, B. J. (2002). The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nat Immunol, 3*(7), 681-686. doi:10.1038/ni811

Wassmann-Otto, A., Heratizadeh, A., Wichmann, K., & Werfel, T. (2018). Birch pollen-related foods can cause late eczematous reactions in patients with atopic dermatitis. *Allergy, 73*(10), 2046-2054. doi:10.1111/all.13454

Westritschnig, K., Linhart, B., Focke-Tejkl, M., Pavkov, T., Keller, W., Ball, T., . . . Valenta, R. (2007). A hypoallergenic vaccine obtained by tail-to-head restructuring of timothy grass pollen profilin, Phl p 12, for the treatment of cross-sensitization to profilin. *J Immunol, 179*(11), 7624-7634. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7624

Wu, M., McIntosh, J., & Liu, J. (2016). Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? *J Occup Health, 58*(2), 138-144. doi:10.1539/joh.15-0275-RA

Yoshino, S., & Mizutani, N. (2016). Intranasal exposure to monoclonal antibody Fab fragments to Japanese cedar pollen Cry j1 suppresses Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis. *Br J Pharmacol, 173*(10), 1629-1638. doi:10.1111/bph.13463

Zheng, Y., Shopes, B., Holowka, D., & Baird, B. (1991). Conformations of IgE bound to its receptor Fc epsilon RI and in solution. *Biochemistry, 30*(38), 9125-9132. doi:10.1021/bi00102a002