

17. Uso de la inmunoproteómica en el CIAD como una herramienta para identificar y caracterizar alérgenos en polen de árboles en el desierto de Sonora



MARTHA BEATRIZ MORALES-AMPARANO*

ANGÉLICA ESPINOSA-PLASCENCIA**

JOSÉ ÁNGEL HUERTA-OCAMPO***

DOI: <https://doi.org/10.52501/cc.360.17>

Resumen

La alergia respiratoria impacta la calidad de vida de millones de personas a nivel mundial y se manifiesta comúnmente como rinitis alérgica, conjuntivitis, estornudos, dificultad para respirar y asma. Estos trastornos son ocasionados por respuestas exacerbadas del sistema inmunológico en pacientes sensibilizados por agentes ambientales generalmente inocuos y, principalmente, de naturaleza proteínica denominados alérgenos. En el Laboratorio de Proteómica del CIAD se realizan investigaciones para identificar las proteínas alergénicas presentes en pólenes del desierto de Sonora con relevancia clínica para, a partir de ese conocimiento, diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas para la alergia al polen en estas especies. Para ello, se han empleado técnicas proteómicas con un enfoque inmunoproteómico, utilizando Western blot para la detección de proteínas alergénicas, usando la IgE del suero de pacientes alérgicos como anticuerpo primario. Las proteínas inmunodetectadas son cortadas de un gel bidimensional de poliacrilamida y digeridas con tripsina para su identificación por cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y aná-

* Doctora en Ciencias por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2735-0986>

** Maestra en Ciencias. Profesora-investigadora Asociada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2971-5774>

*** Doctor en Ciencias en biología Molecular. Profesor-investigador titular por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4505-841X> ; correspondencia: jose.huerta@ciad.mx

lisis bioninformáticos. Hemos identificado alérgenos de relevancia clínica, como la triosa fosfato isomerasa, poligalacturonasa, enolasa y profilina, siendo esta última responsable de la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos vegetales frescos, y la enolasa, antes considerada alérgeno exclusivo en hongos, y que ha emergido recientemente como un alérgeno relevante en el polen y otras fuentes. Aplicando inmunoproteómica en conjunto con herramientas bioinformáticas, se ha confirmado la alergenicidad y se han difundido los primeros reportes y predicciones sobre alérgenos de fuentes con relevancia clínica presentes en el desierto de Sonora. Por ejemplo: *Carya illinoensis* (nogal pecanero), *Prosopis velutina* (mezquite terciopelado) y *Parkinsonia microphylla* (palo verde). Estos pólenes predominantes en el desierto de Sonora no habían sido explorados, pero se ha comprobado que tienen un fuerte impacto en la salud y calidad de vida de las personas alérgicas en la región. La aplicación de la inmunoproteómica permitió explorar nuevas y relevantes fuentes de alérgenos, lo cual es esencial para un diagnóstico y tratamiento más eficiente y seguro. Estas investigaciones están abriendo nuevas perspectivas para la comprensión y el abordaje de esta problemática de salud pública global.

Palabras clave: *alergia, árboles del desierto, polen, proteómica.*

Introducción

Los pólenes son los aeroalérgenos más importantes en el ambiente y representan una pequeña fracción de la cantidad total de partículas biológicas presentes en el aire. No existe información suficiente que correlacione directamente el cambio climático, la producción de polen, la identificación de alérgenos del polen y la sensibilización alérgica que presentan las personas. Las investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) se han enfocado en identificar y caracterizar proteínas alergénicas de importancia clínica, provenientes del polen de tres árboles como el mezquite (*Prosopis velutina*), el palo verde (*Parkinsonia microphylla*) o el nogal pecanero (*Carya*

illinoensis), que crecen en zonas desérticas y tienen importancia nutricional, de sustentabilidad y económica.

La inmunoproteómica nos ha permitido detectar proteínas específicamente reconocidas por anticuerpos de los pacientes alérgicos e identificarlas mediante espectrometría de masas y análisis bioinformáticos. Estos hallazgos se están empleando a través de una estrecha colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) para desarrollar estrategias que contribuyan al diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de estos árboles.

La polinización y su efecto en las enfermedades respiratorias

El desierto de Sonora es el más seco y caluroso del país. Las diferencias climáticas que se están presentando han provocado que la floración en especies nativas sea distinta a las del resto del país, por ende, los tipos de pólenes dispersos en el aire también lo son (Morales-Amparano y Huerta-Ocampo, 2023). La polinización de los árboles florales libera una gran cantidad de aeroalérgenos, haciendo inevitable la exposición de la población al polen. Esto ha generado en los últimos años un aumento en la incidencia de alergias y que éstas se presenten en etapas más tempranas y tengan una duración más prolongada, ocasionando serias repercusiones para la salud humana. En zonas áridas y semiáridas, el cambio climático potencia la emisión y el transporte de partículas finas (PM10) y ultrafinas (PM2.5) que se adhieren a las superficies de los pólenes, causando la liberación de sus componentes alérgenos. La mayoría de las partículas que cubren la superficie del polen provienen de la contaminación vial por emisiones de automóviles y su dispersión se favorece por los tipos de suelo locales (Ortega-Rosas et al., 2020).

¿Cómo se desencadena la alergia por polen?

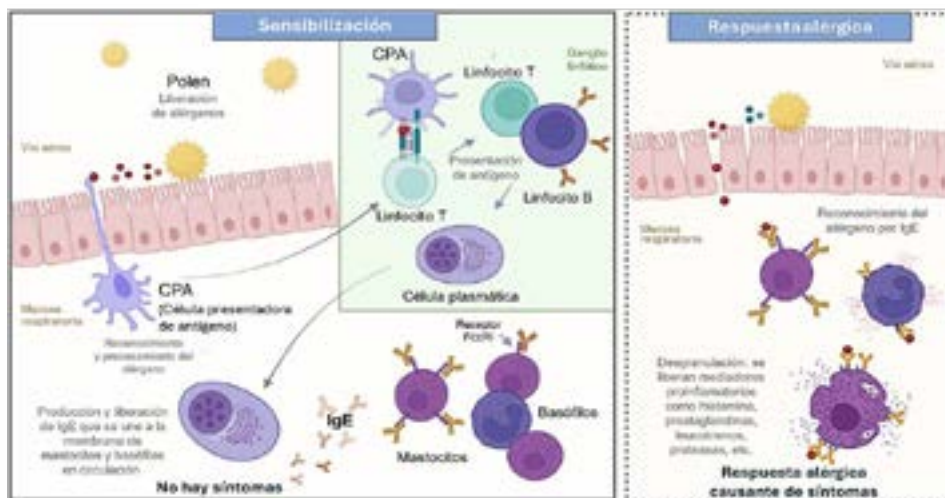
Las alergias por polen son una reacción anormal a sustancias específicas denominadas alérgenos, que generalmente son proteínas presentes en el

polen y tienen un peso molecular de 10 a 60 kDa. Estos alérgenos inflaman el tracto respiratorio y estimulan la producción de anticuerpos específicos de la clase IgE y de células sensibilizadas. Estas últimas unen su superficie a los anticuerpos IgE específicos generados contra los componentes del polen (antígenos) que ocasionaron su formación. La unión del antígeno con la IgE en la superficie de las células sensibilizadas libera moléculas que generan las manifestaciones clínicas de la alergia (Batista-Roche y Huerta-Ocampo, 2021).

Los contaminantes atmosféricos provocan un incremento en la síntesis de IgE, pudiendo inducir o aumentar la expresión de proteínas alergénicas. Las IgE se difunden inicialmente por los vasos linfáticos y después por el torrente sanguíneo. Al ingresar al espacio intersticial, se unen al receptor para IgE de alta afinidad, localizado en la membrana de mastocitos y eosinófilos, sensibilizándolos al alérgeno. Entonces, la IgE adopta una función de receptor específico para proteínas alergénicas (Oh, 2018).

Las reacciones de hipersensibilidad tipo 1 (hipersensibilidad inmediata) están mediadas por la unión de la IgE con su antígeno y ocasionan los síntomas característicos de las alergias respiratorias; estos comienzan tras una segunda exposición al alérgeno en individuos previamente sensibilizados.

Figura 17.1. *Etapas de la reacción alérgica*



Fuente: creación propia basada en imágenes creadas con BioRender.com

Esta unión propicia un reconocimiento cruzado, provocando una cascada de señales intracitoplasmáticas que desencadena la liberación de mediadores inflamatorios.

Al ocurrir la desgranulación de los mastocitos se libera histamina y diversas enzimas proteolíticas. También, al metabolizarse el ácido araquidónico de la membrana se liberan prostaglandinas y leucotrienos, provocando el aumento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción, secreción de moco y la atracción de diferentes células (Bruhns et al., 2005) (Figura 1).

Estos mediadores son responsables de los síntomas (aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso y secreción de mucosas) que, en casos severos, pueden llegar a desencadenar un choque anafiláctico con consecuencias fatales (Figura 17.1).

Árboles de zonas desérticas como potencial alergénico

En México se han realizado pocos estudios aerobiológicos y se ha encontrado que los alérgenos del polen de los árboles son los más implicados en los trastornos alérgicos. Las proteínas alergénicas del polen de diferentes árboles como el mezquite (*Prosopis velutina*), palo verde (*Parkinsonia microphylla*) o nogal pecanero (*Carya illinoensis*), son fuentes de relevancia clínica debido a la reacción alérgica que causan en los habitantes de las zonas donde crecen. El mezquite y el palo verde se distribuyen ampliamente en el desierto de Sonora; el nogal pecanero, en todo el noroeste de México, donde se cultiva por su fruto (Batista-Roche y Huerta-Ocampo, 2021, Morales-Amparano y Huerta-Ocampo, 2023).

El polen del mezquite se encuentra entre los principales grupos polínicos en México, de acuerdo con datos publicados por el INER. Un estudio aerobiológico realizado en Monterrey, Nuevo León, ubicó al polen de *Prosopis* entre los 12 más abundantes. En el área metropolitana de Monterrey el polen de mezquite representa el 2% del polen presente en su atmósfera urbana. Pero en el territorio mexicano, la prevalencia de la alergia respiratoria al polen del mezquite en personas sensibles es de un 21% (Batista-Roche y Huerta-Ocampo, 2021).

En 2016 se analizaron más de 13 mil casos de personas alérgicas en la ciudad de Hermosillo, Sonora, y se encontró que la mayor incidencia de alergias se presentó durante el mes de octubre, lo que se correlacionó con las concentraciones máximas de polen y esporas en el ambiente (Batista-Roche y Huerta-Ocampo, 2021).

En el caso del árbol de palo verde (*Parkinsonia microphilla*), su polen causa alergia debido a la gran cantidad de flores que produce y que son arrastradas por el viento. El interés de estudiar las proteínas alergénicas de esta especie se debe a que no existe información al respecto y es un árbol ampliamente plantado con fines ornamentales en parques, calles, avenidas y en proyectos de urbanización ecológica, particularmente en ciudades desérticas del norte de México y el suroeste de Estados Unidos, (Morales-Amparano et al., 2022).

Por su parte, el nogal pecanero (*C. illinoensis*) se ha considerado un árbol que genera la mayor cantidad de polen en el aire de los estados donde se produce la nuez pecanera. Además, la nuez contiene 3 proteínas (*Car i 1*, *Car i 2*, y *Car i 4*), reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como alérgenos en alimentos (Morales-Amparano et al., 2021). Las condiciones ambientales y atmosféricas influyen en la dispersión del polen y, al unirse éste con partículas contaminantes, se incrementa su capacidad alergénica (Batista-Roche y Huerta-Ocampo, 2021).

Proteómica en la identificación de proteínas alergénicas en el polen

La identificación de una amplia variedad de proteínas alergénicas en el polen se puede lograr mediante herramientas proteómicas que incluyen: técnicas de separación electroforéticas, espectrometría de masas y análisis bioinformáticos, aunados a la inmunodetección, empleando la IgE presente en el suero de los pacientes alérgicos. Sin embargo, son pocos los estudios realizados donde se han identificado proteínas alergénicas en el polen de árboles que crecen en zonas desérticas. Sumado a esto, no existe un método universal para la extracción de proteínas alergénicas y éste se debe adecuar dependiendo de la naturaleza de la muestra. Es importante considerar que

el polen es una muestra recalcitrante que contiene, además de proteínas, otros componentes (pigmentos, carbohidratos, lípidos, etc.) que dificultan la extracción de proteínas con la calidad suficiente para su análisis (Mari et al., 2010).

Se ha logrado inmunodetectar proteínas alergénicas del polen con relevancia clínica de diversas fuentes desérticas, pero son relativamente pocas las proteínas caracterizadas y producidas de forma recombinante para su empleo como herramientas diagnósticas e inmunoterapéuticas.

Métodos

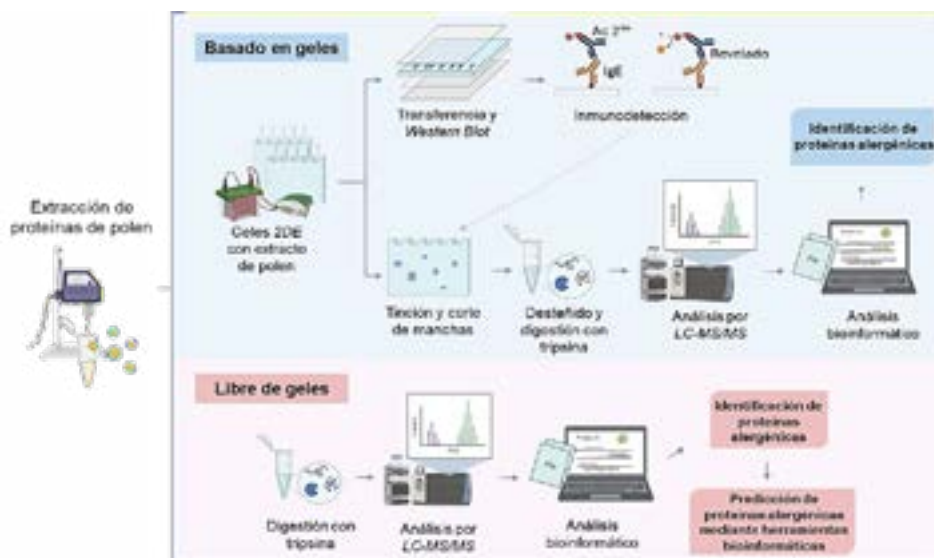
Inmunodetección bidimensional y análisis proteómico para la identificación de proteínas alergénicas

Se empleó un enfoque inmunoproteómico basado en geles, utilizando *Western blot* en dos dimensiones para la detección de proteínas alergénicas en pólenes de nogal y mezquite (Fig. 2).

El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México. D.F. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Para la obtención de las muestras se condujo el estudio de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975 (revisados en 1983), y con base en la Guía de Buenas Prácticas Clínicas. Se obtuvieron muestras de suero de pacientes con rinitis alérgica y/o asma que resultaron positivos (polisensibilizados) a diversos pólenes de árboles, pastos y otras fuentes mediante una prueba cutánea (Prick test). Aquellos pacientes sometidos a tratamientos con anti-histamínicos, corticosteroides o inmunoterapia fueron excluidos del estudio.

Se utilizó la IgE del suero de pacientes alérgicos como anticuerpo primario y anti- IgE humano conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) como anticuerpo secundario. Para revelar las proteínas alergénicas se empleó un sustrato quimioluminiscente y un fotodocumentador (Chemidoc-MP, Bio-Rad). Las manchas de las proteínas inmunodetectadas se cortaron de un gel bidimensional de poliacrilamida y se digirieron con tripsina, la extracción de los péptidos se realizó de acuerdo con lo reportado por Huerta-Ocampo

Figura 17.2. Herramientas proteómicas para la inmunodetección, identificación y predicción de proteínas alergénicas del polen



Fuente: creación propia basada en imágenes creadas con BioRender.com

y colaboradores (2014), de la siguiente manera: los sobrenadantes de la digestión con tripsina se recuperaron en microtubos nuevos de 1.5 mL. El resto de la muestra de la digestión en gel se lavó bajo agitación constante a 1400 rpm (Thermomixer, Eppendorf, Alemania), una vez con agua Milli-Q y dos veces con acetonitrilo al 50% conteniendo 5% de ácido fórmico. Los sobrenadantes de todos los lavados se colectaron junto con los sobrenadantes de la digestión y se concentraron mediante vacío con la ayuda de un evaporador (Vacufugue Plus, Eppendorf, Alemania) hasta sequedad, suspendiéndolos después con 15 μL de ácido fórmico al 1%.

Los péptidos obtenidos de la digestión en gel se analizaron mediante LC-MS/MS en el Laboratorio de Residuos Tóxicos del CIAD, A.C. Las muestras se inyectaron a una columna analítica ZORBAX 300SB-C18 (1.8 μm x 2.1 mm x 100 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equilibrada con la fase móvil inicial: 1% acetonitrilo (ACN) y 0.1% de ácido fórmico (FA) que se mantuvo a 35 °C. Los péptidos se separaron mediante cromatografía de líquidos de ultra desempeño utilizando el equipo 1290 Infinity (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA), empleando un flujo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ y las siguientes condiciones cromatográficas: 1 min con 99% de A (H_2O con 0.1% FA) y 1% de B (ACN con 0.1% FA); seguida de un gradiente lineal hasta alcanzar 70% de B en 15 min y un gradiente final de 1 min hasta alcanzar 1% de B; con un periodo de equilibrio de 3 min (1% de B) entre cada corrida.

Los péptidos eluidos de la columna se ionizaron por electrospray con una fuente de ionización Dual AJS ESI (Agilent Technologies), aplicando 3.5 kV y se analizaron por espectrometría de masas en tándem en modo positivo en el espectrómetro de masas 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mediante un análisis dependiente de datos. Los espectros se adquirieron en el modo auto MS/MS, el rango de masas en el modo MS fue de 400 a 1700 m/z (3 espectros/s) y en el modo MS/MS de 50 a 1700 m/z (1 espectro/s), con un máximo de cinco precursores por ciclo (Huerta-Ocampo et al., 2020).

Posteriormente, se identificaron las proteínas mediante un análisis bioinformático de la siguiente manera: los datos de espectrometría de masas (archivos con extensión .d) se procesaron con el servidor Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Agilent Technologies) para obtener archivos con extensión .mzXML e identificar las proteínas a las que pertenecen los péptidos digeridos mediante Homology Database Search contra una base que contiene 92 600 secuencias de proteínas, obtenida a partir del ensamblado de datos transcriptómicos de *C. illinoensis* (para nogal) y para mezquite contra el proteoma de *Prosopis alba* (57 575 secuencias) disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés).

Se usaron los siguientes parámetros: tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte, la tolerancia de masa para los iones precursores y sus iones fragmento fue de 20 ppm y 0.1 Da, respectivamente, carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija y oxidación de las metioninas como modificación variable. Se consideraron como proteínas identificadas aquellas para las que se obtuvieron al menos dos péptidos.

Identificación libre de geles de proteínas del polen y predicción de su alergenicidad

Las proteínas solubles del polen de palo verde (*P. microphylla*) se extrajeron según el método reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Huerta-Ocampo et al., 2022). Se redujeron 100 µg de proteína soluble de polen con ditiotreitól 10 mM, se alquilaron con iodoacetamida 55 mM y se digirieron en líquido con tripsina grado espectrometría de masas (Pierce Biotechnology), empleando una proporción de tripsina: proteína de 1:30 por 20 h a 37 °C. Después de la digestión, los péptidos se desalaron empleando cartuchos C18 (Sep-Pak C18, Waters) y se secaron al vacío a 37 °C, utilizando el equipo Vacufuge plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) de la siguiente manera: se suspendieron en una solución de acetonitrilo al 10% con 0.1% de ácido fórmico y se separaron empleando un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño (Dionex Ultimate 3000, RSLCnano UHPLC system, Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Q-Exactive Plus high resolution mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se atraparon en una precolumna (C18 PepMap 100, 5 µm, 100 Å, 300 µm diámetro interno × 5 mm) y, posteriormente, se separaron mediante un gradiente de elución de 250 min en una columna capilar a un flujo de 250 nL/min (EASY Spray Column, PepMap RSLC, C18, 3µm, 100 Å, 75µm × 150 mm). Las fases móviles fueron las siguientes: (A) ácido fórmico al 0.1% en agua y (B) acetonitrilo: agua con 0.1% de ácido fórmico, en proporción 90:10 (v/v). El espectrómetro de masas se operó en modo positivo mediante un programa de adquisición dependiente de datos. En el modo MS se filtraron los iones con un rango de 300-2000 m/z. Los 10 iones más intensos de cada escaneo en modo MS con estados de carga de 2 y superiores aislaron con una ventana de aislamiento de 1 m/z en el cuadrupolo y se fragmentaron con una energía normalizada de colisión de 27%. La masa/carga de los iones precursores se midió a una resolución de 70000 (a 200 m/z) mientras que la de los fragmentos se midió a una resolución de 17500 (Palafox-Félix et al., 2022).

La identificación de proteínas se realizó utilizando el software MaxQuant (v 2.1.4.0) y la base de datos de proteínas de *Prosopis alba*, disponible

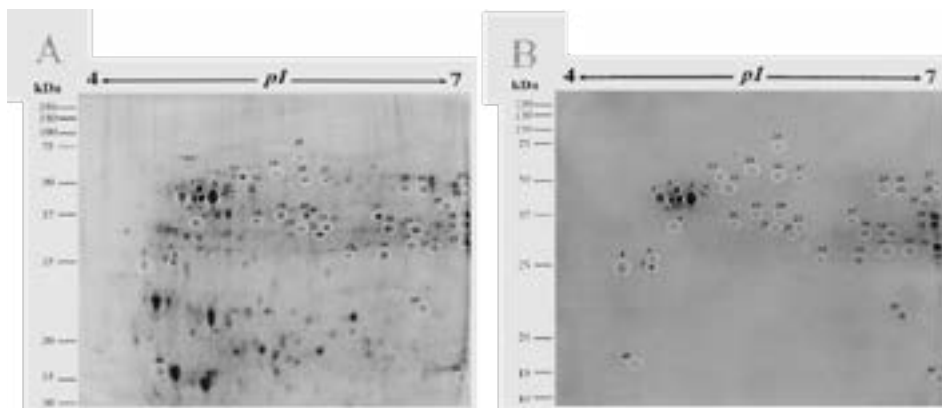
en el NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/207710/> que cuenta con 57,662 secuencias. Para predecir la alergenicidad de las proteínas del polen, las secuencias de los ortólogos filogenéticamente más cercanos de las proteínas identificadas se analizaron en AllerTop v.2.0. (Dimitrov et al., 2014) (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html>) (Figura 2). Las proteínas potencialmente alergénicas se analizaron con la herramienta AllerCatPro 2.0 (Nguyen et al., 2022) (Disponible en: <https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>).

Resultados

Proteínas alergénicas en polen de zonas desérticas identificadas mediante métodos inmunomproteómicos basados en geles

En el Laboratorio de Proteómica del CIAD hemos identificado proteínas alergénicas específicas en pólenes de árboles del desierto con relevancia clínica como el mezquite y el nogal pecanero. La inmunodetección bidimen-

Figura 17.3. A) Perfil bidimensional de proteínas de polen de *P. velutina*, teñidas con azul de Coomassie R-350. B). Inmunodetección bidimensional de proteínas alergénicas del polen de *P. velutina*, con un conjunto de sueros de pacientes alérgicos en dilución 1:15



Fuente: Huerta-Ocampo, J. Á., Batista-Roche, L. G., Morales-Amparano, M. B., Robles-Burgueño, M. d. R., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Ramírez-Jiménez, F., y Terán, L. M. (2022). Identification of Allergenic Proteins in Velvet Mesquite (*Prosopis velutina*) Pollen: An Immunoproteomics Approach. *Life*, 12 (9), 1421. <https://doi.org/10.3390/life12091421>. ISSN: 2075-1729.

sional de proteínas alergénicas del polen de *Prosopis velutina* reveló 41 manchas de proteínas reconocidas por los anticuerpos IgE del suero de los pacientes alérgicos (Figura 17.3) y el análisis por espectrometría de masas en tándem permitió identificar 24 proteínas únicas (Huerta-Ocampo et al., 2022) (Tabla 17.1).

Estas proteínas han sido ampliamente reconocidas como alérgenos del polen, de alimentos y alérgenos de contacto. Entre ellas destaca la presencia

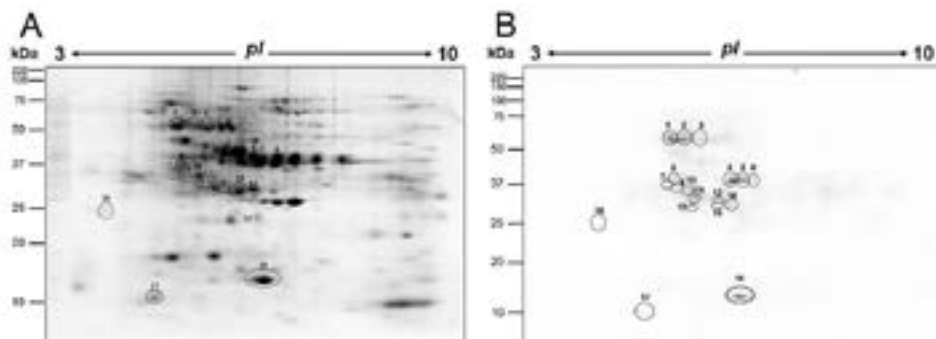
Tabla 17.1. Proteínas alergénicas identificadas en el polen de mesquite terciopelo (*Prosopis velutina*)

Proteína	Número de acceso*	Mr/pl Teórico‡	PM/CSS	Puntaje¶	Mancha
ATP synthase subunit beta	1624089683	60.1/5.9	19/44%	378	12
Carbonic anhydrase	1624114052	37.3/8.8	2/7%	34	13
Enolase	1624040022	48.0/5.8	7/18%	121	17
Fructose-bisphosphate aldolase	1624108864	38.8/6.7	13/38%	242	30
GDSL esterase/lipase	1624029014	37.9/6.1	7/18%	101	29
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	1624040970	38.9/8.8	5/20%	93	32
Glutelin type-D 1	1624065233	38.4/6.3	7/20%	121	36
G3PDH	1624127796	36.5/7.8	12/45%	183	31
Malate dehydrogenase, mitochondrial	1624051156	36.3/8.8	10/31%	188	37
Mitochondrial-processing peptidase	1624112156	55.2/5.9	6/13%	79	14
Nucleoside diphosphate kinase	1624076552	16.4/6.8	6/40%	109	41
Pathogenesis-related protein 1 (PR-10)	1624126639	18.1/9.0	2/17%	30	41
Polygalacturonase-like	1624065841	38.4/6.3	5/15%	83	27
Fructokinase-5	1624052972	35.3/5.9	13/44%	234	22
Profilin	1624112235	14.4/4.8	3/25%	51	40
Proteasome subunit alpha	1624127659	27.5/6.7	6/26%	109	33
Pyruvate dehydrogenase subunit beta	1624021117	40.2/5.8	4/11%	65	18
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1624023092	25.2/4.7	2/16%	28	2
S-adenosylmethionine synthase	1624121540	43.0/6.1	4/12%	76	26
Superoxide dismutase, mitochondrial	1624128322	26.5/7.2	4/19%	63	39
Thaumatococin-like protein 1b	1624039760	25.8/5.0	2/10%	32	1
Triosephosphate isomerase, cytosolic	1624021851	27.2/5.9	9/52%	168	38
UDP-arabinopyranose mutase 1	1624085496	41.1/5.6	11/28%	187	20
UTP-glucose-1-p uridylyltransferase	1624020612	51.9/5.6	15/34%	273	16

* Número de acceso a la base de datos del NCBI, ‡Masa molecular teórica (kDa)/punto isoelectrico; §Número de péptidos/cobertura de secuencia de la proteína. Puntaje obtenido con el programa Spectrum Mill (Puntajes ≥24 y al menos dos péptidos fueron necesarios para una identificación más confiable de las proteínas).

Fuente: Huerta-Ocampo, J.Á.; Batista-Roche, L.G.; Morales-Amparano, M.B.; Robles-Burgueño, M.d.R.; Ramos-Clamont Montfort, G.; Vázquez-Moreno, L.; Ramírez-Jiménez, F.; Terán, L.M. (2022). Identification of Allergenic Proteins in Velvet Mesquite (*Prosopis velutina*) Pollen: An Immunoproteomics Approach. Life, 12 (9), 1421. <https://doi.org/10.3390/life12091421>. ISSN: 2075-1729.

Figura 17.4. Inmunodetección bidimensional de proteínas alergénicas del polen de *Carya illinoensis*. A) Perfil bidimensional de proteínas de polen de *Carya illinoensis* teñidas con azul Coomassie R-350. B) Inmunodetección (Western Blot bidimensional) de proteínas alergénicas del polen



Fuente: Morales-Amparano, M. B., Valenzuela-Corral, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Escobedo-Moratilla, A., Pastor-Palacios, G., Ovando-Vazquez, C. M., Teran, L.M. & Huerta-Ocampo, J. Á. (2021). Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen. *Journal of Proteomics*, 248 (2021) 104348. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104348>. ISSN 1874-3919.

de las proteínas PR-10 y profilina, dos conocidas familias de panalérgenos, lo que podría explicar, en gran medida, el fenómeno de reactividad cruzada entre el polen de mezquite y otras fuentes de alérgenos.

También la aplicación del *Western blot* bidimensional permitió la detección de 18 manchas de proteínas del polen del nogal pecanero (*C. illinoensis*), reconocidas por los anticuerpos IgE presentes en un conjunto de sueros de pacientes alérgicos (Fig. 17.4).

Los datos de la espectrometría de masas y su análisis bioinformático permitieron identificar 17 proteínas alergénicas únicas en el polen de nogal (Tabla 2) (Valenzuela-Corral, 2019; Morales-Amparano et al., 2021).

Como la enolasa, que es reconocida como un alérgeno de hongos y de contacto, además de ser un alérgeno del polen. Fructocinasa, Glicer aldehído 3 fosfato deshidrogenasa y Fructosa bisfosfato aldolasa, las tres reconocidas como alérgenos en polen de coco, plantago (*Plantago lanceolata*) o girasol, entre otras proteínas relevantes (Morales-Amparano et al., 2021).

Tabla 17.2. *Proteínas alergénicas identificadas en el polen de Carya illinoensis mediante LC/MS/MS y un análisis bioinformático*

Mancha ^a	Proteína	Identificador ^b	Mr/pl Exp. ^c	Mr/pl Teórico ^d	PId/CS ^e	Puntaje ^f
1	ATP synthase subunit beta,* [§]	XP_018849756.1	53.6/5.2	59.8/5.6	13/38%	766
2	Enolase	XP_018806299.1	52.2/5.5	52.6/6.3	2/5%	159
3	ATP synthase subunit alpha*	XP_018843285.1	51.4/5.7	55.8/6.2	4/10%	245
4	Malate dehydrogenase-like [§]	XP_018808212.1	41.0/6.4	36.0/6.5	4/17%	151
4	G3PDH, cytosolic* [§]	XP_018846382.1	41.0/6.4	36.7/6.7	3/10%	91
5	Fructose-bisphosphate aldolase [§]	XP_018812677.1	39.0/6.6	38.8/6.9	4/19%	241
6	L-lactate dehydrogenase	PON40627.1	38.5/6.8	37.8/6.8	2/13%	114
7	Malonyl-CoA: ACP transacylase 1-2	XP_018819156.1	34.4/5.1	44.7/8.2	2/8%	120
8	Enoyl-ACP-reductase	XP_018825271.1	36.5/5.3	41.6/7.7	5/19%	171
9	Thiamine thiazole synthase 2	XP_018820652.1	31.0/5.3	38.0/5.4	2/7%	91
10	Pyridoxal 5'-phosphate synthase	XP_018810049.1	33.9/5.6	33.5/5.8	2/8%	144
11	Malate dehydrogenase [§]	XP_018826582.1	32.8/5.7	43.8/7.6	3/13%	91
13	Carbonic anhydrase*	XP_018823093.1	30.7/6.2	36.7/7.0	3/13%	116
14	Triosephosphate isomerase [§]	XP_018823301.1	29.7/6.4	27.5/6.0	4/28%	144
15	Triosephosphate isomerase [§]	XP_018823301.1	28.6/6.2	27.5/6.0	4/27%	110
17	Profilin* [§]	XP_018846365.1	11.3/4.8	14.3/5.0	2/19%	111
18	Nucleoside diphosphate kinase B	XP_018819438.1	15.0/6.6	16.3/6.3	2/16%	52

^a Los números de mancha corresponden a la Figura 4. ^b Los identificadores corresponden a la base de datos del NCBI. ^c Masa molecular/punto isoeléctrico experimentales. ^d Masa molecular/punto isoeléctrico teóricos. ^e Péptidos identificados/cobertura de secuencia. ^f valores de score > 47 indican identidad o extensa homología p < 0.05. [§]Glicoproteínas * Proteínas reportadas como alérgenos en el polen [§] Proteínas alergénicas no reportadas en el polen.

Fuente: Morales-Amparano, M. B., Valenzuela-Corral, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Escobedo-Moratilla, A., Pastor-Palacios, G., Ovando-Vazquez, C. M., Teran, L.M. & Huerta-Ocampo, J. Á. (2021). Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen. *Journal of Proteomics*, 248 (2021) 104348. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104348>. ISSN 1874-3919.

Identificación de proteínas de polen y predicción de su alergenicidad empleando herramientas libres de geles y análisis bioinformáticos

Complementando las investigaciones realizadas utilizando Western blot bidimensional, hemos identificado proteínas alergénicas presentes en el polen de palo verde (*P. microphylla*), empleando una estrategia libre de geles. Este enfoque permitió identificar con éxito 808 proteínas, entre éstas, 79 se predijeron como supuestos alérgenos utilizando la herramienta bioinformática AllerTop v.2.0 y, a su vez, se analizaron en el software AllerCatPro 2.0. (Morales-Amparano et al., 2022). Las proteínas alergénicas putativas

Tabla 17.3. *Proteínas alergénicas putativas en el polen de Parkinsonia microphylla y sus alérgenos homólogos en otras fuentes*

<i>Proteína alergénica putativa en palo verde</i>	<i>Alérgeno reconocido</i>	<i>Especie</i>	<i>% Identidad</i>
Proteína de unión luminal 5	Cor a 10	<i>Corylus avellana</i>	93
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1	Ara h 18	<i>Arachis hypogaea</i>	91
Proteína relacionada al choque térmico 80	Hev b HSP80	<i>Hevea brasiliensis</i>	89
Profilina	Que ac 2	<i>Quercus acutissima</i>	88
Metionina sintasa	Sal k 3	<i>Salsola kali</i>	87
Malato deshidrogenasa, mitocondrial	Citr l MDH	<i>Citrullus lanatus</i>	85
Superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial	Hev b 10	<i>Hevea brasiliensis</i>	83
Lactoilglutación liasa GLX1	Ory s Glioxalasa I	<i>Oryza sativa</i>	77
60S proteína ribosomal ácida P2A	Pru du 5	<i>Prunus dulcis</i>	76
Proteína relacionada a patogénesis (PR10)	Gly m 4	<i>Glycine max</i>	68
Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa	Hev b 2	<i>Hevea brasiliensis</i>	64
60S proteína ribosomal ácida P1	Alt a 12	<i>Alternaria alternata</i>	51
Poligalacturonasa	Pla a 2	<i>Platanus acerifolia</i>	51
Fosfoglicerato quinasa, citosólica	Cand a PGK	<i>Candida albicans</i>	51
Isoforma homóloga de calnexina	Pen ch 31	<i>Arthroderma benhamiae</i>	50
Poligalacturonasa	Pla a 2	<i>Platanus acerifolia</i>	50
Proteína de choque térmico 90-5	Hev b HSP80	<i>Hevea brasiliensis</i>	44
Pectinesterasa	Act d 7	<i>Actinidia deliciosa</i>	43
Exopoligalacturonasa	Ole e 14	<i>Olea europaea</i>	43
Proteasa similar a subtilisina SBT1.4	Cuc m 1	<i>Cucumis melo</i>	41
Cadena beta de tubulina	Lep d 33	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	40
Peroxidasa 31	Tri a Peroxidasa	<i>Triticum aestivum</i>	39
Disulfuro-isomerasa	Alt a 4	<i>Arthroderma benhamiae</i>	35
Piruvato quinasa isomerasa A	Pan h 9	<i>P. hypophthalmus</i>	34
Piruvato quinasa 1, citosólica	Sal s 9	<i>Salmo salar</i>	33
Proteína de choque térmico de 70 kDa 17	Mala s 10	<i>Malassezia sympodialis</i>	31
Exopoligalacturonasa	Ole e 14	<i>Olea europaea</i>	31
MLP- proteína 423	Act d 11	<i>Actinidia deliciosa</i>	27
Factor de elongación 1-gamma	Per a 5	<i>Periplaneta americana</i>	27
Coatómero subunidad alfa-2	Bla g RACK1	<i>Blattella germanica</i>	26
Coatómero subunidad beta-2	Bla g RACK1	<i>Blattella germanica</i>	24
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa 2	Asp f FDH	<i>Aspergillus fumigatus</i>	24
Glutación S-transferasa F9	Per a 5	<i>Periplaneta americana</i>	24
Proteasoma subunidad beta tipo 6	Zea m 20S	<i>Zea mays</i>	23
Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa 2	Asp f 16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	22

Fuente: Martha Beatriz Morales-Amparano, Daniela Álvarez-Campa, Magdalena Hernández-Ortiz, Sergio Encarnación-Guevara, Luis Manuel Terán-Juárez y José Ángel Huerta-Ocampo. (2022). Proteomics and bioinformatics tools reveal allergenic composition of Parkinsonia microphylla pollen. Avances en Ciencias e Ingeniería, 13(3), 23-30 ISSN: 0718-8706. <https://www.executivebs.org/publishing.cl/avances-en-ciencias-e-ingenieria-vol-13-nro-3-ano-2022-articulo-3/>.

identificadas se clasificaron en función de su identidad de secuencia con las proteínas alergénicas de la base de datos del Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos.

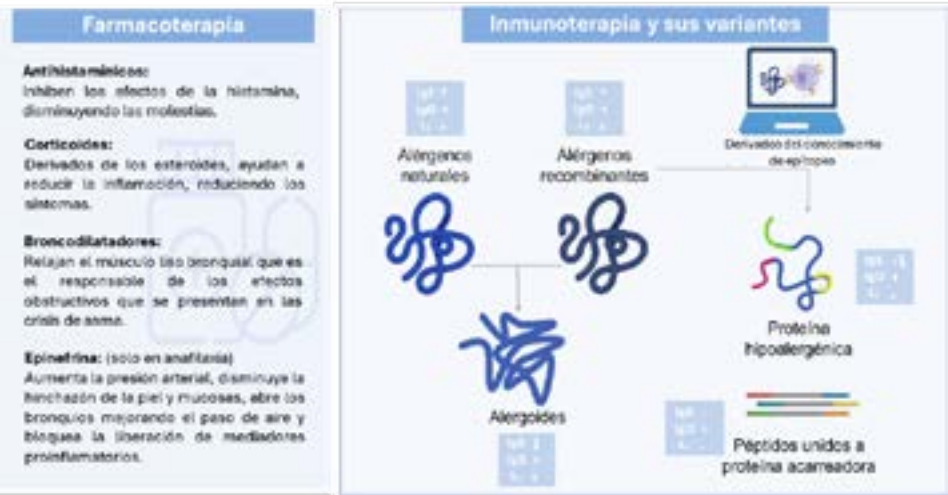
Encontramos que existe evidencia de alergenicidad para 36 proteínas (Tabla 17.3). Cinco de éstas, identificadas y predichas como alergénicas, fueron reportadas también en el polen de mezquite al probarse con suero de los pacientes alérgicos (Huerta-Ocampo et al., 2022). Esto confirma la eficacia de la utilización de los análisis predictivos y revela la importancia del palo verde como una fuente relevante de aeroalérgenos.

Discusión

De la identificación de proteínas alergénicas al desarrollo de diagnósticos y tratamientos para la alergia al polen

El desarrollo de nuevas modalidades de diagnóstico y tratamiento de la alergia respiratoria requieren de estudios específicos que determinen las proteínas responsables de la respuesta alérgica en cada una de las fuentes aler-

Figura 17.5. Opciones para el tratamiento de la alergia respiratoria



Fuente: creación propia basada en imágenes creadas con BioRender.com

génicas. Es ampliamente reconocido que, a diferencia del tratamiento farmacológico dirigido únicamente a tratar los síntomas, la inmunoterapia alérgeno-específica (para la cual existen diversas modalidades, sin embargo, no son el objeto de este capítulo), es el tratamiento más efectivo y perdurable contra la alergia respiratoria (Calderón et al., 2012) y requiere, al igual que el diagnóstico, que los alérgenos estén identificados y bien caracterizados (Figura 17.5).

Conclusiones

En el Laboratorio de Proteómica del CIAD, y gracias a nuestras colaboraciones con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., hemos aplicado la inmunoproteómica en conjunto con herramientas bioinformáticas para generar los primeros reportes y predicciones sobre alérgenos de pólenes con relevancia clínica y que son predominantes entre las especies de árboles del desierto como *Prosopis velutina* (mezquite terciopelado), *Parkinsonia microphylla* (palo verde) y *Carya illinoensis* (nogal pecanero). En algunos casos (por ej. la profilina y enolasa de polen del nogal pecanero), hemos avanzado en la generación y caracterización de versiones recombinantes de estas proteínas alérgicas, que requieren de una validación de su equivalencia antigénica con las proteínas de la fuente natural y que son la clave para el desarrollo de nuevas modalidades diagnósticas y terapéuticas. Nuestro objetivo es desarrollar una estrategia inmunoterapéutica segura para los pacientes.

Referencias

- Batista-Roche, L. G., y Huerta-Ocampo, J. Á. (2021). Mezquite: una planta alérgica de relevancia clínica en México. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-15. DOI:10.22201/fesz.23958723e.2021.390.
- Bruhns, P., Frémont, S., y Daëron, M. (2005). Regulation of allergy by Fc receptors. *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 662-669. DOI: 10.1016/j.coi.2005.09.012.
- Calderón M., Cardona, V., y Demoly, P. (2012). EAACI 100 Years of Immunotherapy Ex-

- perts Panel. One hundred years of allergen immunotherapy European Academy of Allergy and Clinical Immunology celebration: review of unanswered questions. *Allergy*. 67(4): 462-476. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02785.x.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., y Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of molecular modeling*, 20, 2278. DOI: 10.1007/s00894-014-2278-5.
- Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, C. S., Espitia- Rangel, E., Mock, H. P., y Barba de la Rosa, A. P. (2014). Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research*. 13(8): 3607-3627. DOI: 10.1021/pr500153m.
- Huerta-Ocampo, J. Á., Valenzuela-Corral, A., Robles-Burgueño, M. D. R., Guzmán-Partida, A. M., Hernández-Oñate, M. Á., Vázquez-Moreno, L., Pavón-Romero, G. F., y Terán, L. M. (2020). Proteomic identification of allergenic proteins in red oak (*Quercus rubra*) pollen. *World Allergy Organization Journal*, 13(3), 100-111. DOI: 10.1016/j.waojou.2020.100111.
- Huerta-Ocampo, J. Á., Batista-Roche, L. G., Morales-Amparano, M. B., Robles-Burgueño, M. D. R., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Ramírez-Jiménez, F., Terán, L. M. (2022). Identification of allergenic proteins in velvet mesquite (*Prosopis velutina*) pollen: An immunoproteomics approach. *Life*, 12, 1421. DOI:10.3390/life12091421.
- Mari, A., Ciardiello, M. A., Tamburrini, M., Rasi, C., y Palazzo, P. (2010). Proteomic analysis in the identification of allergenic molecules. *Expert Review of Proteomics*, 7(5), 723-34. DOI: 10.1586/epi.10.44.
- Morales-Amparano, M. B., y Huerta-Ocampo, J. A. (2023). Sonora: Un nicho propicio para la alergia respiratoria. *Revista Nuestra Tierra*, 39, 3-5. https://erno.geologia.unam.mx/uploads/nuestra-tierra/archivos/39/Revista_Nuestra_tierra_Ed39-f.pdf
- Morales-Amparano, M. B., Valenzuela-Corral, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Escobedo-Moratilla, A., Pastor-Palacios, G., Ovando- Vázquez, C., Terán, L. M., y Huerta-Ocampo, J. A. (2021). Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen. *Journal of Proteomics*, 248(104348), 1-6. DOI: 10.1016/j.jprot.2021.104348. Morales-Amparano, M.B., Álvarez-Campa, D., Hernández-Ortiz, M., Encarnación-
- Guevara, S., Terán-Juárez, L. M., y Huerta-Ocampo, J. A. (2022). Herramientas proteómicas y bioinformáticas revelan la composición alérgica del polen de *Parkinsonia microphylla*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 13 (3), 23-30. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9174260>
- Morales-Amparano, M. B. (2023). Obtención e identificación de determinantes antígenicos de proteínas alérgicas del polen de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) aplicables al diagnóstico y terapia de la alergia respiratoria. [Tesis de doctorado, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sede Hermosillo].
- Nguyen, M. N., Krutz, N. L., Limviphuvadh, V., Lopata, A. L., Gerberick, G. F., y Maurer-Stroh, S. (2022). AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity

- potential. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W36-W43. DOI: doi.org/10.1093/nar/gkac446.
- Oh, J. W. (2018). Allergy and Pollen. En: *Pollen Allergy Changing World. A guide to scientific understanding and clinical practice*. (pp. 1-8). Hanyang University College of Medicine, Seoul, South Korea. Springer, Singapore. DOI:10.1007/978-981-10-5499.
- Ortega-Rosas, C. I., Meza-Figueroa, D., Vidal-Solano, J. R., González-Grijalva, B., y Schiavo, B. (2020). Association of airborne particulate matter with pollen, fungal spores, and allergic symptoms in an arid urbanized area. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(5), 1761-1782. DOI:10.1007/s10653-020-00752-7.
- Palafox-Félix, M., Huerta-Ocampo, J. Á., Hernández-Ortíz, M., Encarnación-Guevara, S., Vázquez-Moreno, L., Guzmán-Partida, A. M., y Cabrera, R. (2022). Proteomic analysis reveals the metabolic versatility of *Amycolatopsis* sp. BX17: A strain native from milpa agroecosystem soil. *Journal of Proteomics*, 253, 104461. DOI: 10.1016/j.jprot.2021.104461