



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA



**Caracterización molecular de la profilina del polen  
de *Amaranthus palmeri*: Clonación y generación de  
mutantes hipoalergénicas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**Doctor en Ciencias en Biotecnología**

**P R E S E N T A**

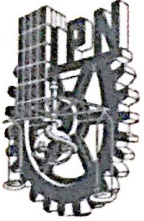
**M. en C. César Manuel Landa Pineda**

**DIRECTORES DE TESIS**

**Dr. en C. César Augusto Sandino Reyes López.**

**Dra. en C. Analilia Arroyo Becerra**

**México D.F. Octubre 2015**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México DF siendo las 11:00 horas del día 7 del mes de mayo del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ENMyH para examinar la tesis titulada:

Caracterización molecular de la profilina del polen de *Amaranthus palmeri*: Clonación y generación de mutantes hipoadérgicas

Presentada por el alumno:

LANDA

Apellido paterno

PINEDA

Apellido materno

CÉSAR MANUEL

Nombre(s)


B	1	0	2	5	1	0
---	---	---	---	---	---	---

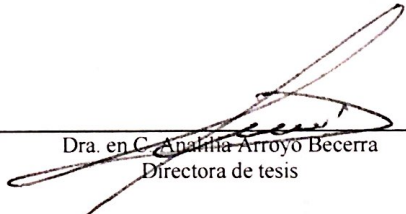
Con registro:  
aspirante de:

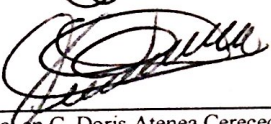
Doctorado en Ciencias en biotecnología

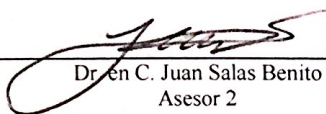
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

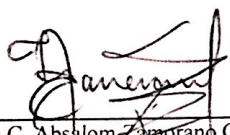
### LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. en C. César Augusto Sandino Reyes López  
Directora de tesis

  
Dra. en C. Ana María Arroyo Becerra  
Directora de tesis

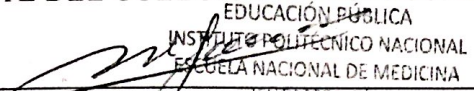
  
Dra. en C. Doris Atenea Cerecedo Mercado  
Asesor 1

  
Dr. en C. Juan Salas Benito  
Asesor 2

  
Dr. en C. Absalom Zamorano Carrillo  
Asesor 3



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y ODONTOLÓGICA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN  
  
M. en C. Manuel Landeros Ledesma



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 1 del mes de octubre del año 2015, el que suscribe M. en C. César Manuel Landa Pineda alumno del Programa de Doctorado en ciencias en biotecnología, con número de registro B102510, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifestó que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Doctores en ciencias César Augusto Sandino Reyes López y Analilia Arroyo Becerra y cede los derechos del trabajo titulado Caracterización molecular de la profilina del polen de *Amaranthus palmeri*: Clonación y generación de mutantes hipoalergénicas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [clandap1000@alumno.ipn.mx](mailto:clandap1000@alumno.ipn.mx), [cesarlanda25@hotmail.com](mailto:cesarlanda25@hotmail.com), [careyes@ipn.mx](mailto:careyes@ipn.mx), [alarroyo@ipn.mx](mailto:alarroyo@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

M. en C. César Manuel Landa Pineda

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Bioquímica de la Sección de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía y en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala (CIBA-Tlaxcala) pertenecientes al Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. en C. César Augusto Sandino Reyes López y la Dra. en C. Analilia Arroyo Becerra, ambos profesor titular del programa de Doctorado en Biotecnología en red.



Este proyecto fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos 54626 y 106839, por COFAA-IPN y SIP-IPN a través del proyecto SIP-20080691 y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF).

De la misma manera se le agradece a CONACyT por la beca de manutención otorgada con número de registro 232491 y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

# AGRADECIMIENTOS

Principalmente a DIOS por todas las bendiciones, por darme fuerza, paciencia, fe y esperanza en el tiempo y medida indicada.

*“Aleja de mí la mentira y las palabras engañosas,*

*No me des pobreza ni riqueza;*

*Dame a comer mi porción de pana,*

*No sea que me sacie y te niegue, y diga:*

*“¿Quién es el Señor?”*

*O que sea menesteroso y robe,*

*Y profane el nombre de mi Dios”*

## **Proverbios 30:8-9**

Para mis madres Paulina Hernández Zavaleta e Isabel Landa Hernández gracias por todo su amor, apoyo, comprensión y paciencia que han tenido para mí, no existe tesoro ni riqueza con la cual pueda pagarles todos esos cuidados y atenciones, aunque sé que lo hacen a cambio de nada, les dedico no solo este trabajo, sino todos mis logros porque ustedes son pilar importante para obtenerlos. Mil gracias.

A mi “viejo”, **Genaro Landa del Moral<sup>†</sup>** porque después de haber partido, sigues tan presente con todos tus consejos, frases, pláticas interminables y regaños; gracias por tu enseñanza de vida. Por fin ya tienes tu “Doctor-Químico” como me decías.

Para mi padre **Cutberto Landa Hernández** que no habrá cómo pagar todo lo que haces por mí, por ser mi incondicional y no soltarme ni un solo momento, simplemente eres un ejemplo de perseverancia, tenacidad, resistencia, audacia e inteligencia. Te amo “viejito”.

Gracias a mis familiares y amigos que siempre están cerca de mí y se preocupan por mi bienestar, que están a “pie de canon” en los momentos difíciles, no tengo como pagarles más que con mi lealtad y reciprocidad.

Agradezco infinitamente al Dr. en C. **César Reyes López**, por compartirme sus conocimientos, su tiempo, por tener siempre la respuesta a mi duda y sobre todo por participar en mi formación profesional, fue y será un placer trabajar juntos, gracias por creer en mis manos, en mis ideas, en mis inquietudes pero sobre todo por creer en mi trabajo, por creer en mí.

A la Dra. en C. **Analilia Arroyo Becerra** por su valiosa aportación en la realización del presente trabajo, por haber aceptado ser mi directora de tesis, por creer en mí, por regalarme su amistad y por muchas cosas más quedo agradecido con usted y su esposo el cual también me brindo su amistad y apoyo.

A mi **comité tutorial** por todo su apoyo, disposición y observaciones realizadas al presente trabajo, que sin dudarlo no hubiera sido igual sin ustedes.

Quiero dar un agradecimiento especial para la Dra. en C. **Doris Cerecedo Mercado** porque además de ser parte del comité tutorial me brindo su amistad y el gesto de confianza que depositó en mí, jamás lo olvidaré, eso que usted hizo por nosotros en momentos tan difíciles no cualquier persona lo hace. Mil gracias.

A la Dra. en C. **Laurence Marchat** por sus comentarios apoyo y atención que me ha prestado desde mi inicio en posgrado, por ser buena orientadora y que sin interés alguno participo en la realización de este trabajo.

A la Dra. en C. **Claudia Benítez** por todo su apoyo tanto personal como profesional.

Gracias al Dr. **Guillermo Guidos** que además de apoyo me brindo su amistad.

A mis compañeros del laboratorio y el doctorado tanto de mi generación como de otras generaciones por esos momentos tan buenos y por permitir que aprendiéramos juntos.

Como dedicatoria especial quiero incluir a tres personas que sin conocerme me abrieron las puertas del campo laboral, de mi primer trabajo formal.

Al C. José del Pilar Córdova Hernández, gracias por apostar en mí, por creer en mi desempeño con sólo analizar mi currículum y en pensar que sería un buen elemento para formar parte de la gran familia llamada “sección 44”.

Al C. José de Jesús Zamudio Aguilera, por todo el apoyo recibido desde que me incorporé a las líneas de los agremiados de la sección 44.

A la C. Norma Rueda Traconi, le agradezco infinitamente el hecho de ponerme en un lugar de mucha responsabilidad apostando en que sería capaz.

Mi compromiso es con toda la sección 44 y me uno a sus palabras “Nada ni nadie detendrá el avance de la sección 44”.

**“Unidos vencemos”**



“El mejor castigo que pueden tener los injustos es tu triunfo” CMLP

“En la vida, no hay premios ni castigos, sino consecuencias" Robert Green Ingersoll

“...Si no sabes dónde vas, cualquier camino sirve...” — Lewis Carroll

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>I. Hipersensibilidad de tipo I – Alergia</b> .....	<b>14</b>
<b>II. Fuentes alergénicas</b> .....	<b>15</b>
<b>III. Los alérgenos</b> .....	<b>16</b>
<b>IV. Las profilinas</b> .....	<b>16</b>
<b>V. Generalidades de las profilinas.</b> .....	<b>17</b>
<b>VI. Familia de genes y expresión de la profilina</b> .....	<b>18</b>
<b>VII. Características estructurales y moleculares</b> .....	<b>21</b>
<b>VIII. Función y distribución</b> .....	<b>21</b>
<b>IX. Función y distribución</b> .....	<b>22</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>X. Objetivo general</b> .....	<b>32</b>
<b>XI. Objetivos particulares</b> .....	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>34</b>
<b>XII. Clonación de profilinas</b> .....	<b>34</b>
<b>a) Obtención de plantas de Amaranthus.</b> .....	<b>34</b>
<b>b) Recolección de polen y tejidos.</b> .....	<b>34</b>
<b>c) Extracción del RNA y RT-PCR</b> .....	<b>34</b>
<b>d) Clonación del cDNA de las profilinas del polen de <i>A. palmeri</i> y otras especies.</b> .....	<b>36</b>

<b>XIII.</b>	<b>Expresión y obtención de extractos proteicos.....</b>	<b>36</b>
a)	Expresión de las profilinas recombinantes del polen de <i>A. palmeri</i> .....	36
b)	Obtención de la fracción proteica no soluble (cuerpos de inclusión).....	37
c)	Preparación de extractos proteicos del polen.....	37
<b>XIV.</b>	<b>Purificación de profilinas recombinantes (rAmpa) y naturales (nAmpa).....</b>	<b>38</b>
a)	Preparación de la columna de afinidad sefarosa-pLp.....	38
b)	Cromatografía de afinidad.....	38
c)	Cromatografía de intercambio iónico.....	39
<b>XV.</b>	<b>Caracterización molecular.....</b>	<b>39</b>
b)	Inmunodetección de las profilinas por Western blot.....	39
c)	Análisis por Dicroísmo Circular (DC) de las proteínas purificadas.....	40
d)	Análisis de las profilinas mediante espectrometría de masas.....	40
e)	Ensayos de cristalización de las profilinas.....	41
<b>XVI.</b>	<b>Caracterización de alergenicidad.....</b>	<b>41</b>
a)	Suero de pacientes (prueba cutánea).....	41
b)	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA).....	44
	<b>RESULTADOS DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>XVII.</b>	<b>Clonación de profilinas.....</b>	<b>45</b>
a)	Obtención de plantas de <i>Amaranthus</i> .....	45
b)	Recolección de polen y tejidos.....	45
c)	Extracción del RNA y RT-PCR.....	47
d)	Clonación del cDNA de las profilinas del polen de <i>A. palmeri</i> y otras especies.....	50
<b>XVIII.</b>	<b>Expresión y obtención de extractos.....</b>	<b>53</b>
a)	Expresión de las profilinas recombinantes del polen de <i>A. palmeri</i> .....	53
<b>XIX.</b>	<b>Purificación de profilinas recombinantes.....</b>	<b>54</b>

<b>XX.</b>	<b>Caracterización molecular</b> .....	<b>56</b>
a)	Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	56
b)	Western blot.....	57
c)	Dicroísmo Circular (DC). .....	57
d)	Espectrometría de masas. ....	59
e)	Ensayos de cristalización. ....	61
<b>XXI.</b>	<b>Caracterización de alergenidad</b> .....	<b>62</b>
a)	Suero de pacientes (prueba cutánea) .....	62
b)	Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). ....	64
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>69</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>70</b>
	<b>APÉNDICE</b> .....	<b>86</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>



## RESUMEN

**Introducción:** En diversos países, los granos de polen de *Amaranthus* son conocidos por su alta alergenicidad. En México, el polen de *Amaranthus palmeri* es una importante fuente de alérgenos, sin embargo, no existen reportes sobre la prevalencia de este polen. La primera profilina alergénica fue identificada en el polen del abedul (Bet v 2) en 1991. Algunos estudios han descrito que pacientes que desarrollan alergias contra profilina de polen comúnmente presentan reactividad cruzada contra la profilina de vegetales y frutas como calabacín, apio, tomate, zanahoria, nueces, melón, naranja durazno e incluso el látex

El objetivo de este estudio fue clonar la profilina del polen de *A. palmeri* y obtener una variante hipoalergénica, la cual pueda ser usada como vacuna.

**Método:** El cDNA de las profilinas de *A. palmeri* fueron amplificados y clonados dentro del vector pJET1.2/blunting y subclonado dentro del vector de sobreexpresión pET3a. Las profilinas fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando como ligando poly-L-prolina acoplada a sefarosa. Además, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular de cuatro isoformas. Las profilinas recombinantes fueron usadas para realizar prueba cutánea “prick” en pacientes alérgicos de cinco hospitales de la ciudad de México y analizadas por ELISA usando el suero de estos mismos pacientes.

**Resultados:** Ocho profilinas fueron clonadas. El cDNA secuenciado reveló que siete de estos tienen 393 nucleótidos que codifican para 131 aminoácidos y el otro cDNA tiene 399 nucleótidos que codifican para una profilina de 133 aminoácidos. Estas isoformas fueron nombradas rAMPA ISO-1 al -8. Las isoformas ISO-3, -4, -7 y -8 fueron expresadas en *E. coli* como proteínas solubles, la isoforma ISO-1 fue obtenida de los cuerpos de inclusión y las isoformas ISO-2, -5 y -6 no se utilizaron para sobreexpresión. Las cinco profilinas fueron purificadas en un sólo paso por cromatografía de afinidad en las mismas condiciones que las profilinas naturales. Los espectros de dicroísmo circular obtenidos para las profilinas de *A. palmeri* son similares a los reportados previamente para la profilina natural de *Phleum pratense*. Una de las isoformas de profilina fue menos reconocida por el suero de pacientes alérgicos.

**Conclusiones:** La isoforma 1 y 7 de las profilinas del polen de *A. palmeri* podría ser usada como vacuna para pacientes alérgicos a profilina.

## ABSTRACT

Background: *Amaranthus* pollen grains are known to be highly allergenic in many countries. In Mexico, *Amaranthus palmeri* pollen is an important allergenic source; however there is not reported data about the prevalence of these pollens. The first allergenic profilin was identified from birch pollen (Bet v 2) in 1991. Many studies have been described that patients who developed allergies against profilin from pollen commonly presented cross-reactivity against to profilin from vegetable and fruits like to zucchini, celery, tomatoes, carrots, nuts, melon, orange, peach and even the latex.

The aim of the study was to clone the profilin from *A. palmeri* pollen and obtain a hypoallergenic profilin variant, which could be used as a vaccine.

Methods: cDNA from *A. palmeri* pollen profilins were amplified and cloned into the pJET1.2/blunting vector and subcloned into pET3a overexpression vector. Profilins were purified by affinity chromatography using as ligand poly-L-proline coupled to sepharose. In addition, we obtained the circular dichroism spectrum of four different isoforms. Recombinant profilins were used for made skin prick tests in allergic patients of five hospitals from Mexico city and profilins were analyzed by ELISA using serum from these patients.

Results: Eight profilins were cloned and cDNA sequencing revealed that seven of these have 393 nucleotides encoding for 131 amino acid residues and the other cDNA has 399 nucleotides that encodes a profilin of 133 amino acid residues. These isoforms were named rAMPA ISO-1 to -8. rAMPA ISO-1, -3, -4, -7 and -8 were expressed in *E. coli* as a soluble protein and ISO-1 was obtained from inclusion bodies. Five profilins were purified at one step by affinity chromatographic in similar conditions that natural profilin. The spectrums obtained from *A. palmeri* profilin are similar to *Phleum pratense* natural profilin previously reported. One of the eight profilins was less recognized than the others by serum from allergenic patients.

Conclusions: rAMPA ISO-1 and -7 from *A. palmeri* pollen could be used as a vaccine for allergenic patients to profilin.

# INTRODUCCIÓN

La alergia es un padecimiento multifactorial que afecta a cerca del 25% de la población mundial, acentuándose principalmente en los países más industrializados <sup>1,2</sup> impactando directamente la economía de estos y sus habitantes, por citar un ejemplo, en Estados Unidos de Norteamérica el costo anual para tratar el asma alérgica es cerca de 6 billones de dólares <sup>3,4</sup>.

En la Ciudad de México un estudio reportado en 2009 mostró que el 42.6% de la población presenta algún tipo de alergia, destacando como en otros países, la rinitis alérgica, siendo el grupo pediátrico el más afectado, tal como se observa para los países de habla inglesa y algunos de América Latina, en donde se reporta que entre el 15 y 23% de su población infantil presenta enfermedades alérgicas. Se ha estimado que las enfermedades alérgicas generan ausentismo escolar y laboral aproximado de entre 3.37 y 6.2 días/año representando un gasto de entre el 10 y 20% del ingreso mensual por familia sin contemplar la falta de ingreso para algunos sectores de la población generados por este mismo ausentismo<sup>5-7</sup>.

## I. Hipersensibilidad de tipo I – Alergia

Las enfermedades alérgicas se inician con la exposición a una molécula alergénica que promueve una respuesta inmunológica, induciendo la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> hacia el tipo T<sub>H</sub>2, estimulando la producción de inmunoglobulinas de tipo E (IgE) por parte de células B diferenciadas<sup>8</sup>. Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta diferenciación han sido motivo de estudio de un gran número de grupos de investigación. Recientemente se han logrado identificar varias de las moléculas del sistema inmunológico y eventos celulares que están involucrados en el desarrollo de la respuesta alérgica<sup>9-11</sup>. Las manifestaciones clínicas de las reacciones alérgicas se desencadenan cuando una persona se expone por segunda ocasión a un mismo alérgeno, para el cual dejó previamente células efectoras sensibilizadas. Este alérgeno se une a las IgE's que a su vez se encuentran unidas a los receptores FcεRI presentes en la superficie de las células cebadas o en basófilos, provocando la liberación de las moléculas proinflamatorias almacenadas en sus gránulos citoplasmáticos, promoviendo la síntesis de nuevos mediadores como TNFα, IL-4, IL-13, IL-15 e IL-16.

Actualmente existen estudios que han descrito con bastante precisión la serie de eventos de señalización que se producen una vez que una célula efectora es activada<sup>12-16</sup>. Las principales manifestaciones clínicas de los padecimientos alérgicos van desde reacciones locales como la dermatitis atópica, rinitis y asma, hasta reacciones sistémicas que pueden derivar en una reacción anafiláctica e incluso la muerte<sup>2</sup>. Después de la etapa de sensibilización, las personas alérgicas son susceptibles a reaccionar contra uno o varios alérgenos a diversos niveles de severidad, quedando expuestos a hacerlo durante periodos que pueden ser relativamente cortos o incluso durante toda su vida<sup>17,18</sup>.

## **II. Fuentes alérgicas**

Existe una amplia variedad de fuentes naturales de las cuales provienen los alérgenos. Específicamente los alérgenos causantes de enfermedades respiratorias alérgicas son denominados Aeroalérgenos por que se encuentran suspendidos en la atmósfera donde habitamos. Los principales aeroalérgenos son provenientes de los granos de polen, proteínas de ácaros y cucarachas, epitelios de animales e insectos y esporas de diversos hongos<sup>19</sup>. Diversos estudios muestran que el polen es una fuente alérgica importante debido a la dificultad para controlar su expansión en el medio ambiente, ya que diversos pólenes pueden ser anemófilos<sup>20-22</sup> y de esta manera sus alérgenos llegan a tener contacto con el sistema inmunológico del paciente.

Algunos estudios recientes afirman que partículas mayores a 20  $\mu\text{m}$  son incapaces de penetrar al tracto respiratorio bajo<sup>23,24</sup> y el tamaño del polen es en promedio de 15-40  $\mu\text{m}$  pero pueden llegar a medir hasta 200  $\mu\text{m}$ , sin embargo una de las fuentes alérgicas más importantes es el polen de algunas plantas<sup>25,26</sup>. Una de las teorías que explica esta contradicción es que los granos de polen tienen contacto directo con la mucosa liberando rápidamente los alérgenos presentes provocando síntomas de asma bronquial alérgica<sup>27</sup>.

El contenido proteico en los granos de polen es bajo, sin embargo es una de las principales fuentes de alérgenos alrededor del mundo. Estudios enfocados a determinar cuáles son los principales alérgenos del polen de diversas plantas han mostrado que no existe relación directa entre la función biológica o la estructura molecular de estos alérgenos con respecto a su alergenidad, esto es, no se ha podido determinar qué es lo que hace que una proteína, comúnmente inocua al



organismo, sea reconocida como un alérgeno y se desencadene una respuesta inflamatoria importante <sup>28</sup>.

### III. Los alérgenos

A los antígenos responsables o causantes de las alergias se les conoce propiamente como alérgenos, que pueden ser de naturaleza proteica, glicoproteica o de sustancias químicas hapténicas por ejemplo la penicilina; estas últimas, al unirse a una proteína portadora se convierten en material inmunogénico. Estas moléculas alergénicas tienen funciones biológicas variables que incluyen a proteasas, proteínas de unión a ligandos, proteínas estructurales, proteínas relacionadas con la patogénesis, proteínas transportadoras de lípidos (PTL), profilinas y proteínas de unión al calcio entre otras. Estos alérgenos pueden provenir principalmente de ácaros, caspa de animales, polen, plantas, insectos, medicamentos y alimentos.

Los alérgenos de origen proteico se pueden agrupar en más de 120 familias de acuerdo a su filogenia, lo cual nos da una idea de la gran diversidad antigénica de estas moléculas. Debido a esto, en 1980 se creó el comité de nomenclatura para alérgenos dando origen a su vez al sistema de nomenclatura de alérgenos, que consiste en usar las tres primeras letras del género seguida por la primera letra de la especie y un número arábigo que indica el orden cronológico en el cual se ha reportado el alérgeno<sup>29</sup>. Un ejemplo es la profilina de *Betula verrucosa*, Bet v 2, en donde Bet indica el género *Betula*; la v proviene de la especie *verrucosa* y el número 2 se refiere a que fue el segundo alérgeno en reportarse para esta especie.

Las profilinas se han asociado ampliamente con las enfermedades alérgicas y a la reactividad cruzada entre distintas fuentes de alérgenos provenientes del polen y alimentos considerándose una familia de alérgenos con alta relevancia clínica.

### IV. Las profilinas

Las profilinas son pequeñas proteínas de entre 12-19 kDa presentes en todos los organismos eucariontes estudiados hasta la fecha<sup>30-32</sup> incluyendo a las plantas<sup>33</sup>.

Se ha descrito la participación de la profilina en diversos procesos biológicos<sup>34</sup> entre los cuales el más estudiado es su intervención en el re-arreglo del citoesqueleto de las células eucariontes<sup>35</sup>, específicamente, regulando la polimerización-despolimerización de la actina involucrándose así de forma importante en la estructura y movilidad celular<sup>36</sup>. Se ha demostrado que esta participación es trascendente en diversos procesos biológicos como son la división celular<sup>37</sup>, en la embriogénesis<sup>38</sup> y la citocinesis<sup>39</sup>.

Alrededor del mundo, diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en describir la contribución de la profilina en algunas enfermedades como el cáncer<sup>40-44</sup>, enfermedad de Parkinson<sup>45</sup> y alergias<sup>33,46,47</sup> entre otras. Sin embargo, en las últimas tres décadas los investigadores han mostrado interés en estudiar la participación de la profilina como un alérgeno de importancia clínica presente en diversas fuentes y una de las características relevantes de estos alérgenos es el fenómeno de reactividad cruzada con profilinas de otras fuentes<sup>48</sup>, como es en el caso del síndrome de alergia polen-alimentos, al cual se atribuye la reactividad cruzada de inmunoglobulina-E (IgE) a distintos epítopes que comparten algunos alérgenos presentes en el polen y en algunos alimentos principalmente de origen vegetal<sup>49,50</sup>. Se ha propuesto que estos alérgenos que ocasionan la reactividad cruzada son principalmente proteínas que cumplen funciones biológicas cruciales de gran importancia por lo cual su secuencia de aminoácidos y/o estructura tridimensional son relativamente conservadas generando así IgE's que reconocen epítopes similares presentes en las proteínas de diferente fuente. De todos los pacientes que presentan el fenómeno de reactividad cruzada por el síndrome polen-alimento, la profilina contribuye con la sensibilización de al menos un 20% de estos pacientes<sup>47</sup>.

## V. Generalidades de las profilinas.

Estas proteínas deben su nombre a su propiedad y función con la cual fue descrita inicialmente, que es la de mantener a la actina en pro-filamentos de actina (**PRO-FIL**amentous act**IN**)<sup>30,51</sup>. A pesar de su descubrimiento en células eucariontes y su función importante, principalmente en el dinamismo de la actina, se han reportado profilinas provenientes de virus y se propone que su función es similar a la reportada en los vertebrados sugiriéndose que los virus pueden utilizar esta proteína como ligando del fosfatidil inositol (PIP2) para tener contacto con las células de

mamíferos<sup>52-56</sup>. Las profilinas juegan un papel crucial en la formación de tejidos de mamíferos y en algunos organismos como animales y plantas superiores pueden expresarse de manera tejido-específica<sup>57</sup>. Se ha demostrado que al suprimir el gen que codifica para una isoforma de este polipéptido, se pueden tener consecuencias desfavorables, por ejemplo el cigoto de ratón después de ser fecundado muere si no está presente el gen de la profilina, lo cual demuestra la importancia de esta en la división celular y por consecuencia en la embriogénesis<sup>38</sup>.

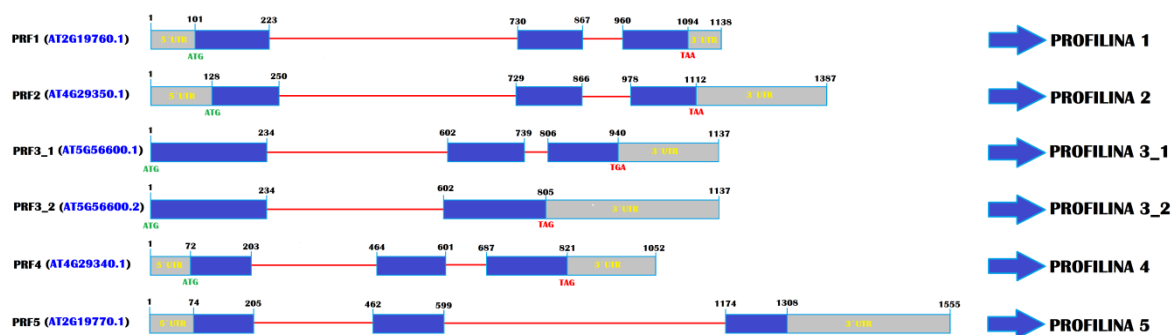
## **VI. Familia de genes y expresión de la profilina**

El número de genes por organismo que codifican para profilinas correlaciona ampliamente con su complejidad. Los eucariontes inferiores contienen uno o dos genes y ocasionalmente tres<sup>58,59</sup>, mientras que en eucariontes superiores, como las plantas, el número de genes que codifican para profilinas es amplio, además pueden ser generadas nuevas variantes del mRNA por splicing alternativo<sup>32,60-64</sup>. Por otra parte, también se han reportado, en algunos virus, la presencia de genes que codifican para profilinas<sup>65</sup>.

En algunos mamíferos, como el humano, se han descrito sólo cuatro genes que codifican para profilinas, dándoles el nombre de *Pfn1* al *Pfn4*<sup>66</sup>. El gen *Pfn1* codifica para la isoforma I la cual es ubicua. El gen *Pfn2* produce por splicing alternativo dos variantes, la profilina II expresada principalmente en células neuronales y una forma menor, profilina IIb, expresada principalmente en riñón<sup>61</sup>. Los genes *Pnf3* y *Pnf4* codifican para variantes que son tejido-específicas localizadas en testículo y riñón respectivamente<sup>67,68</sup>. La expresión de estas proteínas específicas de espermatozoides regulan el desarrollo de la célula y del tejido, lo cual se puede correlacionar con la expresión también específica de proteínas relacionadas con la actina (T-actina 1 y T-actina 2) presentes en células germinales masculinas<sup>69</sup> y de igual manera se ha visto su participación en la reacción acrosomal del espermatozoide de equinodermo<sup>70</sup>.

Dentro del reino plantae, se han descrito genes putativos que codifican para profilina de diversas especies. Las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas contienen aproximadamente diez diferentes genes, entre ellos algunos pseudogenes no codificantes, mientras que las secuencias de ADN codificantes permiten la producción de estos polipéptidos y algunas isoformas del mismo<sup>71</sup>. En la tabla 1 se muestra el número de genes descrito para diversas especies incluyendo un

miembro del reino protista, la alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Las secuencias de ADN genómico que codifican para estos polipéptidos generalmente están formadas por tres exones y dos intrones de diversos tamaños<sup>71,72</sup>. Figura 1.



**Figura 1.** Genes de *A. thaliana* que codifican para profilina. En esta figura se representan los modelos de los genes que codifican para las profilinas de *A. thaliana* que están estructurados principalmente por tres exones (cajas azul y gris) y uno o dos intrones (líneas rojas). La variante *PRF3\_2* del gen *PRF3*, se genera por *splicing*, dando origen a dos exones y un intrón. En color azul se resalta la región codificante de cada gen.

Especie	Genes	Especie	Genes
<i>Eucalyptus grandis</i>	8	<i>Vitis vinífera</i>	4
<i>Glycine max</i>	8	<i>Citrus clementeina</i>	3
<i>Zea mays</i>	8	<i>Citrus sinensis</i>	3
<i>Manihot esculenta</i>	7	<i>Medicago truncatula</i>	3
<i>Arabidopsis lyrata</i>	5	<i>Oryza sativa</i>	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	<i>Sorghum bicolor</i>	3
<i>Mimulus guttatus</i>	5	<i>Aquilegia coerulea</i>	2
<i>Brachypodium distachyon</i>	4	<i>Carica papaya</i>	2
<i>Physcomitrella patens subs patens</i>	4	<i>Cucumis sativus</i>	2
<i>Populus trichocarpa</i>	4	* <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1
<i>Prunus pérsica</i>	4	<i>Selaginella moellendorffii</i>	1
<i>Ricinus communis</i>	4	<i>Volvox carteri</i>	1
<i>Setaria italic</i>	4		

**Tabla 1.** Genes reportados en Phytozome que podrían codificar para profilina. Se muestra en la tabla el número de genes reportados por organismo. Estos datos fueron obtenidos del servidor de Phytozome a partir de una búsqueda en los 25 genomas de plantas verdes secuenciados hasta la fecha. (<http://www.phytozome.net>)



*Arabidopsis thaliana* es la especie más estudiada dentro del reino viridiplantae. En esta especie se han descrito cinco genes que codifican para diferentes profilinas. Estos genes se han logrado clasificar en dos grupos, el primer grupo está constituido por los genes PRF1, PRF2 y PRF3 expresados en todos los órganos de la planta, dicha expresión esta atribuida al primer intrón de los genes PRF1 y PRF2. El grupo dos está formado por los genes PRF4 y PRF5; y se expresan principalmente en tejidos florales u órganos reproductivos como el polen<sup>71,73,74</sup>.

El gen *PRF1* (AT2G19760.1), es el primer miembro de la familia de multigenes de *A. thaliana* y codifica para la profilina 1. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 2 en el locus AT2G19760 y es expresado en todos los tejidos de la planta durante diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, como etapa de cotiledón expandido, etapa de dos, cuatro, seis, ocho, diez y doce hojas visibles, en estadio de polen germinado, la diferenciación de pétalos y la etapa de expansión así como en la etapa de plántulas en desarrollo, sólo por mencionar algunas. Además se han descrito en diferentes componentes celulares como, citoesqueleto, pared celular, citoplasma, citosol, nucléolo, núcleo, membrana plasmática y plasmodesmo<sup>71,72,75-78</sup>.

El gen *PRF2* (AT4G29350.1), codifica para la profilina 2, se localiza en el cromosoma 4 en el locus AT4G29350. Este gen, al igual que el *PRF1*, se encuentra expresado en casi todos los tejidos de la planta y participa en las mismas etapas de desarrollo y crecimiento. Se ha descrito en componentes celulares como citoesqueleto, cloroplastos, citoplasma y membrana plasmática<sup>78-81</sup>, y a diferencia del gen *PRF1*, no se ha detectado en el citosol<sup>82</sup>.

El gen *PRF3* está localizado en el cromosoma 5 en el locus AT5G56600, y codifica para dos isoformas mediante *splicing* (AT5G56600.1 y AT5G56600.2); dichas isoformas son de diferente tamaño. La isoforma generada por AT5G56600.1 está formada por 168 residuos de aminoácidos mientras que la isoforma codificada por AT5G56600.2 es de 145 aminoácidos. Su expresión y localización es similar a las dos anteriores encontrándose en componentes celulares como citoesqueleto, citoplasma y núcleo. Hasta el momento no se ha descrito alguna diferencia de expresión o ubicación tejido específica para cada isoforma producto de este gen<sup>71,72,83</sup>.

Al igual que el gen *PRF2*, el *PRF4* (AT4G29340.1) está localizado en el locus AT4G29340 del cromosoma 4; y codifica para la profilina 4. El producto de este gen se considera específico de polen, sin embargo se ha detectado principalmente en estructuras relacionadas con la reproducción como flores, células del tubo polínico y estambre además en otros tejidos como carpelo, pedicelo,

pétalo, raíz y sépalo. Su expresión se observa en etapas de desarrollo y crecimiento como antesis, fase L del polen maduro, etapa M del polen germinado, diferenciación de pétalos y en la etapa de expansión. Se ha detectado en orgánulos como el núcleo y al igual que *PRF1*, *PRF2* y *PRF3* la profilina 4 es abundante en citoplasma<sup>72,81,84-87</sup>.

El gen *PRF5* (AT2G19770.1) se localiza en el cromosoma 2 en el locus AT2G19770 y codifica para la profilina 5. Esta isoforma se considera específica de polen y se ha localizado en procesos como maduración de polen, crecimiento de tubos polínicos, antesis, diferenciación de pétalos y en la etapa de expansión al igual que *PRF4*<sup>77,85,86,88-90</sup>. Se ha propuesto que las profilinas presentes en el polen de *Alnus glutinosa*, *Corylus avellana*, *Phleum pretense*, *Secale cereale* y *Artemisia vulgaris* participan en el proceso de fertilización de las plantas<sup>91</sup>.

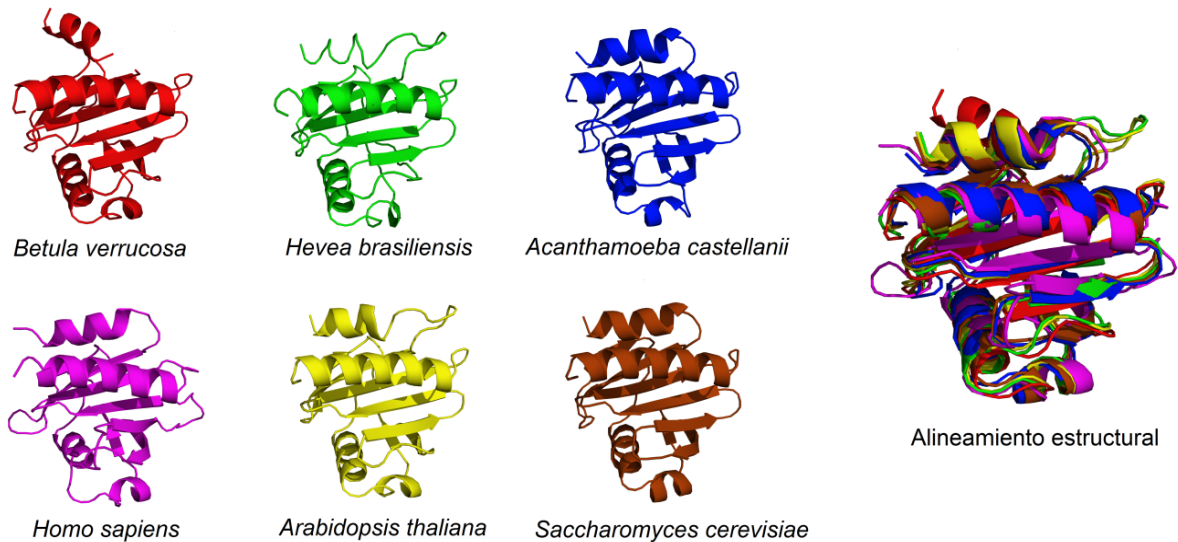
## VII. Características estructurales y moleculares

Las profilinas son proteínas globulares pequeñas, que en términos generales, su estructura y composición de aminoácidos está altamente conservada. Tienen una masa molecular de entre 12-19 kiloDaltons (kDa), su estructura primaria está formada por alrededor de 124-174 residuos de aminoácidos estructurados en tres o cuatro hélices alfa ( $\alpha$ ) y siete hebras beta ( $\beta$ ) antiparalelas, dependiendo del organismo del cual provienen<sup>32,92-94</sup>. La estructura secundaria y terciaria de las profilinas que se han podido definir experimentalmente nos muestra su alta similitud estructural. La conformación tridimensional de las profilinas provenientes del género *Acanthamoeba*, algunos mamíferos y de *Betula verrucosa* muestran un centro compacto formado por siete hebras beta ( $\beta$ ) rodeadas de tres o cuatro hélices alfa ( $\alpha$ ). Las regiones amino y carboxilo terminal conforman dos hélices  $\alpha$  y son adyacentes una de la otra<sup>95-97</sup> (Figura 2).

## VIII. Función y distribución

En términos generales las profilinas se pueden clasificar en dos grupos basados en su secuencia o en propiedades bioquímicas. En el grupo I se encuentran las profilinas ubicuas que se expresan constitutivamente en todos los tejidos, por ejemplo, las profilinas expresadas a partir de los genes *PRF1*, *PRF2*, *PRF3\_1* y *PRF3\_2* de *A. thaliana*. En el grupo II se encuentran las profilinas tejido

específicas, un ejemplo son las profilinas 4 y 5 del polen de *A. thaliana* producto de los genes PRF4 y PRF5<sup>73</sup>, así como las expresadas en células germinales de plantas y animales, estando presentes exclusivamente durante el desarrollo celular y embrionario<sup>71</sup>.



**Figura 2.** Estructura tridimensional y alineamiento estructural. Se muestra la alta homología estructural entre las profilinas de *Betula pendula* (PDB: 1CQA)<sup>98</sup>, *Hevea brasiliensis* (PDB: 1G5U) (no publicado), *Acanthamoeba castellanii* (1PRQ)<sup>99</sup>, *Homo sapiens* (PDB: 1D1J)<sup>100</sup>, *Arabidopsis thaliana* (PDB: 1A0K)<sup>101</sup> y *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 1YPR)<sup>102</sup>. Así mismo, el alineamiento estructural muestra los ligeros cambios presentes entre estas mismas estructuras.

## IX. Función y distribución

En términos generales las profilinas se pueden clasificar en dos grupos basados en su secuencia o en propiedades bioquímicas. En el grupo I se encuentran las profilinas ubicuas que se expresan constitutivamente en todos los tejidos, por ejemplo, las profilinas expresadas a partir de los genes *PRF1*, *PRF2*, *PRF3\_1* y *PRF3\_2* de *A. thaliana*. En el grupo II se encuentran las profilinas tejido específicas, un ejemplo son las profilinas 4 y 5 del polen de *A. thaliana* producto de los genes PRF4 y PRF5<sup>73</sup>, así como las expresadas en células germinales de plantas y animales, estando presentes exclusivamente durante el desarrollo celular y embrionario<sup>71</sup>.

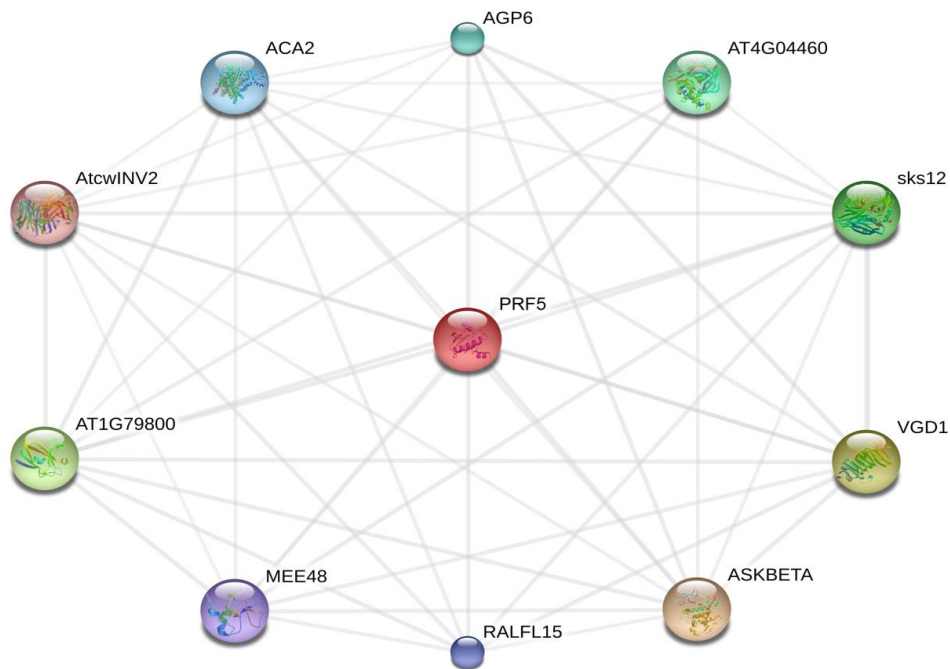
La función de las profilinas está dada por la interacción que tienen con diferentes ligandos, dando cada una de las interacciones diferente función según sea el ligando y la isoforma de profilina que intervengan<sup>103-107</sup>. De estos sitios de interacción que se han caracterizado, se conocen al detalle los

motivos estructurales involucrados en la interacción destacando que las secuencias de aminoácidos que forman estos motivos estructurales son relativamente conservadas en los diferentes organismos<sup>71</sup>. En general, su conformación les permite interactuar adecuadamente con diversos ligandos, ya que dichos motivos estructurales están espacialmente separados y expuestos al solvente<sup>108</sup>.

En la actualidad existen diversas herramientas que nos permiten simplificar las búsquedas de interacciones reportadas y/o predecir estas mismas interacciones proteína-ligando. Utilizando la herramienta STRING del servidor de ExPASy se puede obtener información sobre otros ligandos con los cuales se unen la profilina en este caso específicamente la profilina 5 de *A. thaliana* (PRF5). La mayoría de estos ligandos son enzimas que participan en la embriogénesis y en diversos procesos del polen resaltando así la importancia de la profilina desde el inicio de la vida. Figura 3.

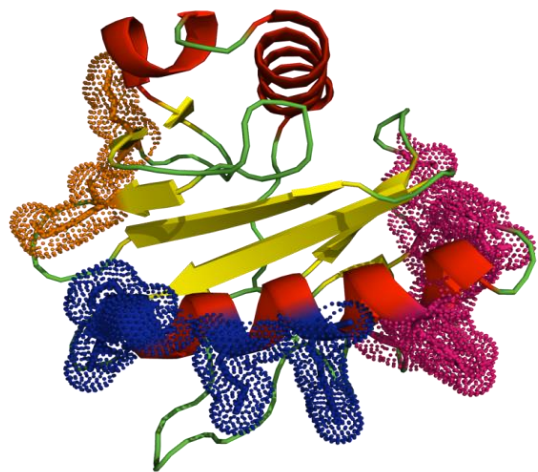
Por otra parte, las interacciones más estudiadas son con G-actina<sup>109-111</sup>, fosfatidil inositol (PIP2)<sup>112</sup>, la subunidad  $\alpha$  de la cinasa p85 (p85 $\alpha$ )<sup>113</sup>. Adicionalmente, se ha descrito su unión a proteínas ricas en secuencias repetidas de L-prolina (pLp)<sup>66,114</sup>, como son la dinamina I<sup>115</sup>, clatrina<sup>116</sup>, sinapsina<sup>117</sup> entre otras<sup>104,118</sup>. Figura 4.

Por otro lado, se ha evidenciado que las mutaciones en algunos aminoácidos modifica la interacción con ciertos ligandos por ejemplo, al realizar la mutante Y5A en la profilina de *Sacharomyces pombe* disminuye considerablemente su afinidad a los ligandos ricos en poli-L-prolina<sup>119</sup>, así como la mutación Y6F en una profilina de humano disminuye la afinidad al mismo ligando<sup>120</sup>, sin embargo al realizar esta misma mutación Y6F en la profilina 4 de maíz (ZmPRO4) se ve el efecto contrario, aumentando la afinidad a poli-L-prolina sin afectar la afinidad a la actina<sup>121</sup>.



**Figura 3.** Ligandos que se unen a la profilina 5 de *A. thaliana* (PRF5). Esta proteína presente en polen de dicha especie se une a ligandos como: calcio ATPasa 2 (ACA2), proteínas arabinogalactanos 6 (AGP6), proteína beta cinasa relacionada a shaggy (ASKBETA), proteína de la familia aspartil proteasas (AT4G04460), invertasa 2 de la pared celular de *A. thaliana* (AtcwINV2), proteína que contiene el dominio de tipo plastocianina (AT1G79800), arresto de embrión de efecto materno 48 (MEE48), RALF-LIKE 15 (factor de alcalinización rápida (RALF15)), SKU5 Similar 12 (sks12), VANGUARD1 (inhibidor enzimático/pectinesterasa VGD1).

**Figura 4.** Sitios de interacción con diferentes ligandos de profilina de *Hevea brasiliensis* (PDB: 1G5U). En esta imagen se representan en puntos de diversos colores los sitios de interacción de la profilina con diferentes ligandos. En puntos de color naranja se representa el posible sitio de interacción con PIP2, de color azul se muestra el sitio de interacción con actina y de color rosa se muestra el sitio de interacción a polímeros de poli-L-prolina. Como se puede observar los sitios están espacialmente separados (imagen realizada con PyMOL v1.7.4.4).



En ratón ocurre un caso particular en donde el ARNm que codifica para esta proteína sufre splicing alternativo dando como resultado dos tipos de profilina, de las cuales una no puede unirse a la G-actina<sup>61</sup>. Otro caso reportado es la profilina del virus *Vaccinia*, la cual tiene baja afinidad para unirse a actina y polímeros de L-prolina (pLp) potenciando su unión a PIP2 indicando la diferenciación en el proceso biológico que interviene<sup>65</sup>. Como nos podemos dar cuenta, las profilinas son proteínas de gran importancia en muchos procesos celulares, lo cual puede explicar en parte la alta conservación de estas proteínas, además de la presencia de más de una isoforma en diversas especies. Además también se le ha atribuido la responsabilidad de alérgeno.

## ANTECEDENTES

Las profilinas provenientes de plantas son consideradas como alérgenos relevantes en pacientes con alergia al polen y/o alimentos observando un alto porcentaje de unión de IgE's del suero de estos pacientes a profilinas de distintas fuentes<sup>33,50,91,92,97</sup>.

Durante las últimas tres décadas los investigadores se han dado a la tarea de secuenciar el marco de lectura abierto que codifica para las profilinas así como la secuencia de aminoácidos en organismos unicelulares y animales. Actualmente muchos grupos de investigación enfocan sus estudios en las profilinas de plantas debido a su importante participación como alérgeno. La primera identificación de la profilina como alérgeno fue la proveniente del polen del árbol del abedul, *Betula verrucosa*<sup>33,46</sup>, posteriormente algunos investigadores han centrado sus estudios en la búsqueda de profilinas alérgicas presentes en otros pólenes con importancia etiológica notable, como: *Phleum pratense*<sup>47,122</sup>, *Lolium perenne*<sup>123</sup>, *Artemisia vulgaris*<sup>124,125</sup>, *Zea mays*<sup>126</sup>, *Triticum aestivum*<sup>127</sup>, *Ambrosia elatior*<sup>128</sup>, *Olea europea*<sup>129</sup>, *Corylus avellana*<sup>130</sup>, *Alnus glutinosa*<sup>131</sup>, *Castanea sativa*<sup>131,132</sup>, entre otros. Con menor capacidad alérgica o de más reciente descripción, tenemos las profilinas producidas por los pólenes de *Mercurialis annua*<sup>133,134</sup>, *Crocus sativus*<sup>135</sup>, *Zygophyllum fabago*<sup>136,137</sup>, *Ricinus communis*<sup>138</sup>, *Brassica napus*<sup>139</sup> entre otros. Se han identificado hasta el momento más de 800 secuencias de profilina y sus isoformas de diferentes organismos (<http://www.uniprot.org/>) de las cuales 73 están reportadas como alérgenos en la base de datos de Allergome, en donde se reportan las evidencias experimentales que demuestran la alergenidad de estas proteínas y que están presentes en 43 especies diferentes (Anexo 1). Debido al gran interés de los científicos en esta proteína se ha resuelto la estructura tridimensionalmente de más de 40 profilinas de las 800 reportadas (<http://www.pdb.org>).

Las profilinas del polen de abedul, de algunas gramíneas y de artemisa presentan una alta identidad en su secuencia de aminoácidos, cercana al 80%, y tienen antigenicidad y alergenidad similares<sup>140-142</sup>.

Las profilinas alérgicas procedentes de plantas tienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Mientras que las profilinas no alérgicas provenientes de otros eucariontes presentan una menor identidad, cercana al 30%<sup>143,144</sup>. Interesantemente, la secuencia de los

extremos amino y carboxilo terminal de las profilinas de animales inferiores, plantas y hongos están altamente conservadas mientras que entre los vertebrados son altamente divergentes<sup>71</sup>. En la figura 5 se muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de todas las profilina reportadas como alérgenos en la base de datos Allergome donde se puede observar el alto grado de conservación de estas secuencias. Esta característica puede ser la responsable de la reactividad cruzada que se presenta en esta familia de panalérgenos. En la figura 6 se muestra un árbol filogenético en donde se observa un agrupamiento cerrado entre las diferentes especies.

En el norte y el centro de Europa se ha reportado que la profilina está dentro de los cuatro principales alérgenos con importancia clínica debido a que los pacientes alérgicos a rosáceas presentan reacción cruzada con pólenes de abedul y/o gramíneas, con una incidencia de reconocimiento por IgE específica a profilina en un poco menos del 20% de los casos<sup>145-147</sup>. Esta reactividad cruzada, como se ha mencionado, se cree que se debe en gran parte a la alta conservación de la secuencia de aminoácidos y a su amplia homología en su estructura terciaria.

Como se ha descrito, las profilinas son alérgenos importantes provenientes del polen de árboles, maleza, hierba y algunos alimentos. Otros estudios realizados por diferentes investigadores han descrito que la profilina proveniente del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), también conocida como Hev b 8, es reconocida por las IgE's presentes en el 100% de pacientes que padecen espina bífida y en un 95% en personas alérgicas al látex que trabajan para el sector salud<sup>148,149</sup>.

En niños con espina bífida y adultos alérgicos al látex se reporta que la profilina es un alérgeno relevante desde el punto de vista de frecuencia de reconocimiento *in vivo* para ambos grupos, pero es escasa la presencia en extractos de látex natural y posee baja afinidad de fijación de IgE<sup>150,151</sup>.



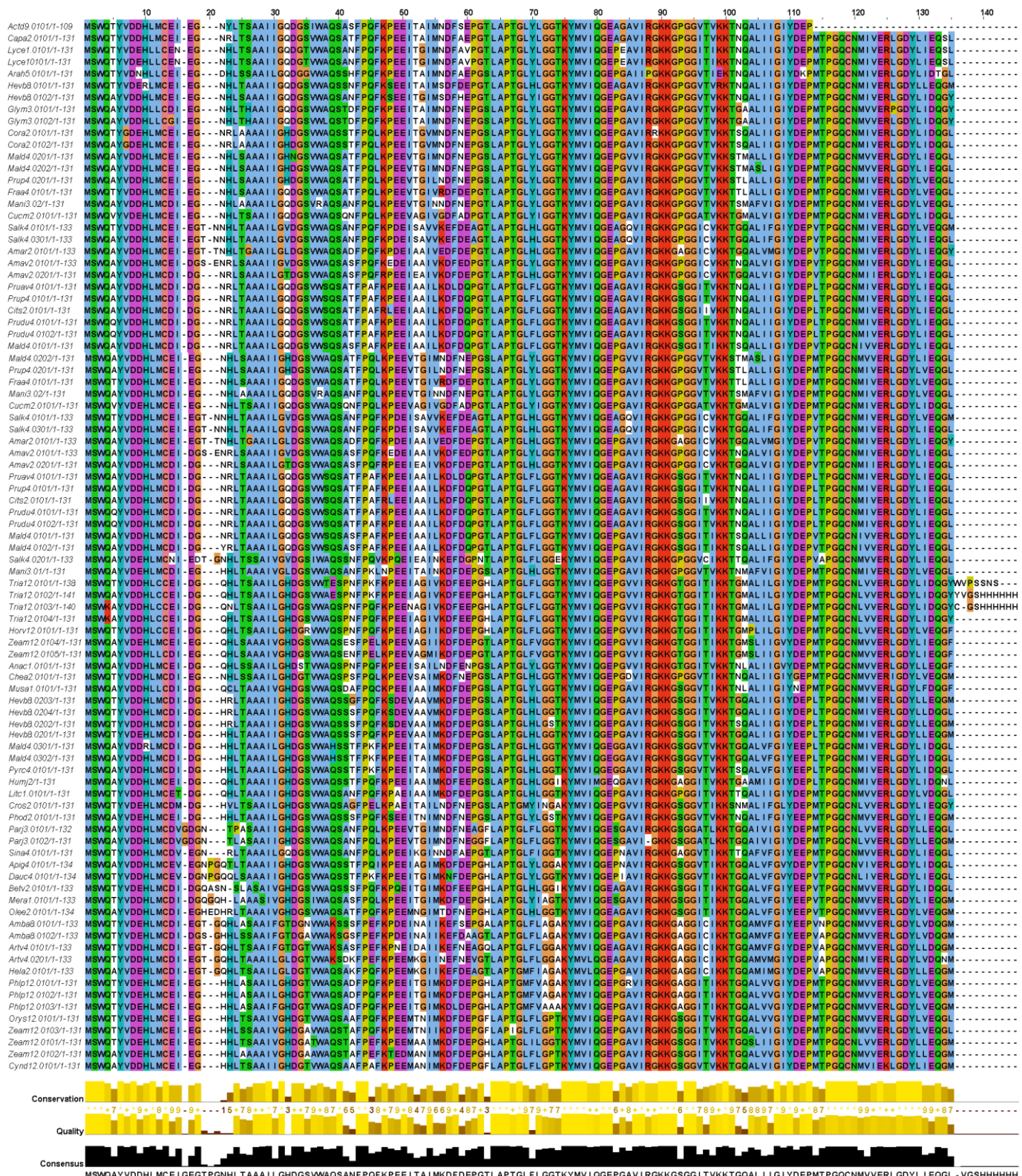
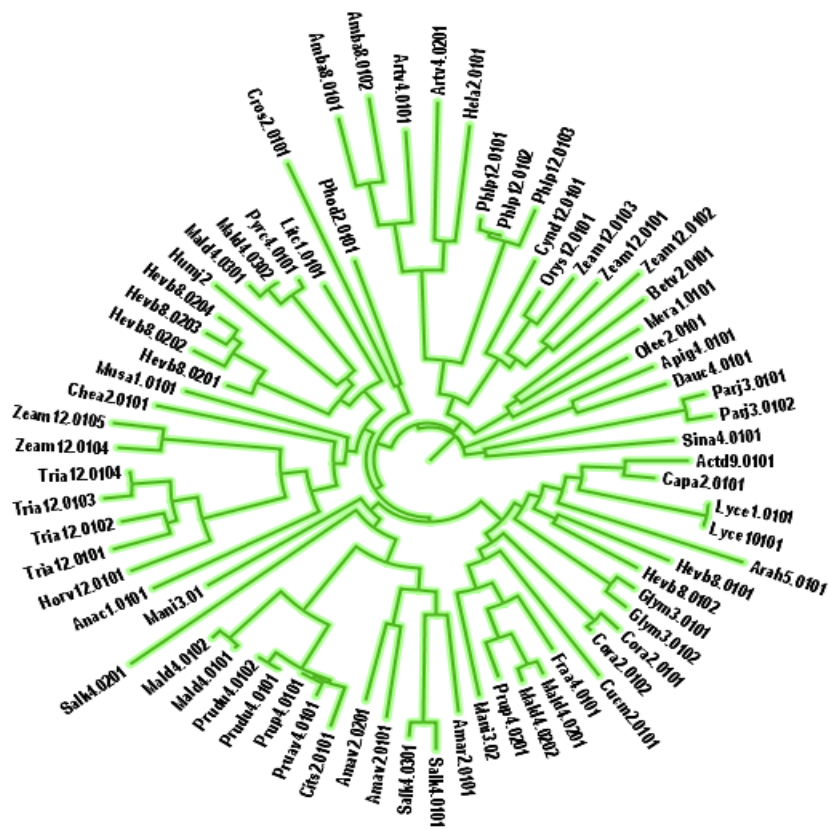


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos. El alineamiento múltiple se realizó con todas las secuencias de profilinas alérgicas reportadas hasta el momento (73 profilinas de 43 especies diferentes) utilizando el programa Clustal W. Se puede observar la alta identidad entre los aminoácidos de las diferentes secuencias.



**Figura 6.** Árbol filogenético de profilinas alergénicas. Se utilizaron las 73 secuencias de 43 especies diferentes para hacer el árbol filogenético utilizando el programa Fig Tree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Se destaca la presencia de al menos cuatro grupos principales, algunos bien definidos que tienen en común la fuente de la cual proviene la profilina; sin embargo en otros grupos se presentan isoformas de profilinas divergentes a su especie, un ejemplo son las profilinas de *Zea mays* (cereal) con las profilinas de *Triticum aestivum* (cereal), sin embargo podemos observar otras profilinas de *Z. mays* (cereal) agrupadas con *Phleum pratense* (pasto), *Cynodon dactylon* (pasto), *Betula verrucosa* (árbol).

Para el género de *Amaranthus* se ha determinado la presencia de profilinas que son reconocidas por las IgE’s del suero de pacientes alérgicos. En la India, se realizó un estudio en donde determinaron el reconocimiento de IgE’s de sueros de pacientes alérgicos al polen del *Amaranthus spinosus* observando la presencia de IgE’s que reconocían una proteína de aproximadamente 14 kDa de masa molecular<sup>152</sup> la cual se puede proponer que sea una profilina. Estudios similares realizados por diferentes grupos de investigación han descrito la importante alergenicidad de la profilina de *Amaranthus viridis*<sup>153</sup> y *Amaranthus retroflexus*<sup>154</sup> teniendo como resultado la completa identificación como alérgenos y la clonación y secuenciación de tres profilinas, dos de *A. viridis* y una de *A. retroflexus*.

En nuestro grupo de investigación, recientemente se demostró la importante participación de estas proteínas provenientes del polen de *A. palmeri* en la sensibilización de distintos grupos de personas alérgicas. Describiendo de esta manera la presencia de al menos cuatro isoformas de profilina presentes en el polen de esta fuente. Además proponemos que dos de estas isoformas de profilina comparten epítopes de reconocimiento por IgE's con algunas otras profilinas, como es el caso de la profilina de látex (Hev b8). Con base en lo anterior proponemos que existen epítopes compartidos responsable de la alergenicidad y el reconocimiento cruzado que se observa en el estudio de pacientes alérgicos.

En este trabajo se presenta la identificación, clonación, purificación y caracterización de las profilinas del polen de *A. palmeri*, y se resalta la diferencia en sensibilización de los pacientes juzgada mediante pruebas cutáneas, teniendo prevalencias para amaranto y fresno del 35 % y para la isoforma 8 (21%), isoforma 4 (18%), isoforma 1 (14%) e isoforma 7 (11%), que al analizar los datos en conjunto resulta una prevalencia del 27% para las profilinas recombinantes del polen de *A. palmeri*.

Con los resultados mostrados en este trabajo podemos hacer hincapié en la importante participación de las profilinas de distintas fuentes en la sensibilización de personas alérgicas, sobre todo la importante participación de las profilinas del polen de *A. palmeri* en la población metropolitana.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes avances en este campo, aún no se ha logrado desarrollar una terapia efectiva y dirigida que evite que una persona alérgica deje de reaccionar contra los alérgenos a los cuales está sensibilizada. Una de las propuestas que se han explorado durante varios años es desensibilizar a las personas alérgicas a través del uso de vacunas compuestas de extractos alergénicos naturales. Se han empleado principalmente extractos proteicos conteniendo a los alérgenos solubles, sin embargo no se han logrado estandarizar adecuadamente estos extractos, por lo que existen variaciones en el contenido de los componentes individuales en cada preparación, impidiendo controlar la cantidad de cada uno de los alérgenos que se emplean en las terapias para desensibilizar a los pacientes<sup>155</sup>. Adicionalmente, es posible que los individuos alérgicos sólo reaccionen contra unos pocos alérgenos presentes en la fuente alergénica, por lo cual es importante identificar, caracterizar y clonar él o los principales alérgenos provenientes de diferentes fuentes y así permitir la estandarización y optimización de los preparados alergénicos empleados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas. Además en el estudio a nivel molecular de diferentes alérgenos, proporcionará información que permita determinar cuáles son las características moleculares responsables de que una proteína sea capaz de desencadenar una respuesta alérgica. Esto último permitiría producir moléculas modificadas que tengan baja alergenicidad y que puedan ser empleadas en los tratamientos en cantidades mayores y evitando varios de los efectos secundarios actuales de la inmunoterapia<sup>156-159</sup>.

La importancia de conocer las regiones a las cuales se unen las IgE's estriba en que con este conocimiento se podrían realizar o seleccionar modificaciones puntuales en los residuos más importantes para la unión, con la finalidad de evitar que se unan los anticuerpos al alérgeno modificado, esto evitaría que se desarrolle la respuesta inflamatoria alérgica. Al evitar que se desencadene la respuesta inflamatoria, se pueden emplear estas moléculas para terapias de desensibilización, evitándose muchos de los efectos negativos de esta práctica así como eliminar los factores de riesgo en una reacción anafiláctica<sup>157,158</sup>.

# OBJETIVOS

## X. Objetivo general

Caracterizar molecularmente variantes de la profilina del polen del *Amaranthus palmeri* y determinar su importancia en la sensibilización de personas alérgicas a ésta planta.

## XI. Objetivos particulares

- 1) Clonar, expresar y caracterizar parcialmente las profilinas del polen de *Amaranthus palmeri*
- 2) Determinar las propiedades de unión entre las profilinas recombinantes y las IgE's de personas alérgicas al *Amaranthus palmeri*
- 3) Identificar variantes y/o generar mutantes que reduzcan significativamente la unión a las IgE's del suero de pacientes alérgicos

## HIPÓTESIS

Las profilinas del polen de *Amaranthus palmeri* son alérgenos de relevancia clínica en la Ciudad de México y sus propiedades de unión a IgE's se ven afectadas significativamente por cambios en algunos aminoácidos de su secuencia.

# METODOLOGÍA

## XII. Clonación de profilinas

### a) Obtención de plantas de *Amaranthus*.

Se adquirieron semillas de distintas especies de *Amaranthus* las cuales fueron sembradas bajo condiciones de invernadero usando una mezcla estéril de tierra agrícola:agrolita:peatmoss (2:1:1). En el caso específico de las semillas de *A. palmeri* fueron donadas por el Dr. Eduardo Espitia Rangel Director Regional del CIR CENTRO-INIFAP del germoplasma a su cargo. Se dejaron crecer a diferentes estadios y se obtuvieron tejidos de estas mismas. Adicionalmente se colectaron muestras de tres plantas de amaranto; una de amaranto cultivar Tepetitla, *Amaranthus ssp* nombrada con la letra A, y dos de ellas fueron amaranto silvestre *Amaranthus ssp* nombradas con las letras B y C respectivamente.

### b) Recolección de polen y tejidos.

El polen fresco fue colectado de dos plantas de *A. palmeri* del 4 al 15 de enero del 2012. La recolección de polen se llevó a cabo entre las 9:00 y 11:00 de la mañana. Los granos de polen fueron liberados de las anteras mediante golpes suaves en el tallo principal o agitación justo debajo de la inflorescencia. El polen fue colectado en papel filtro, se retiraron los restos macroscópicos del material floral y se almacenó a -80° C hasta su uso. Se tomaron muestras de diferentes tejidos y etapas de crecimiento de las plantas. Además se usaron varios tejidos de *Glycine max*, *Zea mays*, *Ricinus communis* y *Arabidopsis thaliana* como controles positivos del material genético.

### c) Extracción del RNA y RT-PCR.

Se utilizaron 50 mg de tejido vegetal y/o polen de *A. palmeri* y las otras especies para la extracción del RNA total con TRIzol® siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza e integridad fue evaluada mediante electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa al 1.2 % con formaldehído al 4% en amortiguador de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPs). La



concentración fue determinada mediante espectrofotometría a 260 nm, y la pureza se evaluó a partir del cociente de las absorbancias a 260/280 y 260/230 nm para calcular su grado de contaminación proteica y de carbohidratos y sales respectivamente.

Cuatro  $\mu\text{g}$  del RNA total fue retrotranscrito usando el kit “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas) y el oligo-dT (18) como *primer* (iniciador), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la amplificación del cDNA se diseñaron primers degenerados en las regiones conservadas de genes de profilinas reportadas previamente y a partir de la secuencia de aminoácidos reportada previamente por nuestro grupo de investigación (Landa-Pineda C.M; 2010). Los *primers* usados fueron, para la amplificación de la cadena en sentido: PROF-FW (5'-GAGATATACCATATGTCGTGGCARRCGTACGT-3') y para la cadena antisentido se utilizó el oligonucleótido PROF-RV (5'-AGAGGGATCCTTACAGGCCCTGATCAAGGAGGTAATC-3'). Los sitios de restricción para las nucleasas NdeI y BamHI que se incorporaron a cada oligonucleótido respectivamente se muestran en negritas. El cDNA fue amplificado por PCR usando 0.3  $\mu\text{g}$  del producto de la síntesis de la primera cadena, 75 ng de los primers degenerados, Taq DNA polimerasa master mix (ampliçon III) y cuanto baste para 25  $\mu\text{L}$  (cbp 25  $\mu\text{L}$ ) de agua grado biología molecular bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	1 min	1
94° C	0.5 min	35
52° C	0.5 min	
72° C	1 min	
72° C	5 min	1

**Tabla 2.** Condiciones para la amplificación por PCR de los genes que codifican para las profilinas.

El producto amplificado se analizó en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se almacenó a -20° C hasta su uso.



#### **d) Clonación del cDNA de las profilinas del polen de *A. palmeri* y otras especies.**

Los productos de PCR de aproximadamente 400-450 pb fueron aisladas y purificadas mediante el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit; (Fermentas). Los productos obtenidos se ligaron en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Fermentas). Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos resultantes, se distribuyeron en una placa de agar con en medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37° C durante 16 horas. Las colonias resultantes fueron analizadas por PCR de colonia y sus plásmidos fueron extraídos y restringidos con las enzimas NdeI y BamHI. La restricción enzimática se analizó en geles de agarosa al 1.8% y el producto liberado de aproximadamente 400-450 pb fue purificado y ligado dentro del vector pET3a en los sitios de clonación NdeI y BamHI. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ ; las colonias crecidas se analizaron por PCR de colonia, restricción enzimática y por secuenciación de nucleótidos. Las construcciones que contenían secuencias de nucleótidos con homología a profilinas se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3)*pLyss* y *Rosetta-gami 2*.

### **XIII. Expresión y obtención de extractos proteicos**

#### **a) Expresión de las profilinas recombinantes del polen de *A. palmeri*.**

Las profilinas recombinantes fueron expresadas en las cepas de *E. coli* BL21(DE3)*pLyss* y *Rosetta-gami 2*. Una colonia fresca con la construcción pET3a-Ampa se utilizó para inocular 5 mL de medio de cultivo LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37° C con agitación a 200 rpm durante 15 horas. Por cada 50 mL de medio de cultivo 2XYT se utilizó un mililitro del pie de cultivo anterior adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37° C a 200 rpm hasta alcanzar la densidad óptica (D.O.) de 0.4-0.6 a 600 nm. La sobreexpresión de las proteínas recombinantes se indujo con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.6 mM incubando a 37° C durante toda la noche (15 horas) y 200 rpm. Las bacterias fueron cosechadas mediante centrifugación a 4,500 rpm durante 30 minutos a 4° C y el botón bacteriano fue resuspendido en amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, NaCl 300 mM,

PMSF 0.1 mM). Para asegurarse de la completa lisis bacteriana se utilizaron 8 ciclos de sonicación de 10 segundos a 85% de amplitud y 15 segundos de descanso, todo el proceso de sonicación se realizó en hielo. La fracción soluble fue separada mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4° C; el sobrenadante fue dializado contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. El sobrenadante y el *pellet* fueron analizados mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 16 % con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

**b) Obtención de la fracción proteica no soluble (cuerpos de inclusión).**

La fracción no soluble (*pellet*) que se obtuvo después del clarificado, se lavó dos veces con Tris-HCl 50 mM pH 8.0 adicionado con Tritón X-100 1%, cada lavado fue de 20 minutos. Mediante centrifugación a 12000 rpm durante 30 min a 4° C se separó el sobrenadante y se eliminó. El *pellet* resultante se lavó con agua des-ionizada y filtrada. Se repitió el paso de centrifugación y el sobrenadante fue descartado, el *pellet* se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 adicionado con urea 8 M, se dejó en agitación lenta durante cuatro horas a 25° C. Se separó la pastilla del sobrenadante y en este caso el sobrenadante fue dializado de forma lenta contra 6 litros de amortiguador fosfatos 50 mM pH 7.4 distribuido en 3 cambios.

**c) Preparación de extractos proteicos del polen.**

Un gramo de polen de *A. palmeri* (Alergomex) fue desengrasado mediante tres cambios alternados de etanol-acetona (1:1) y dietil éter. La extracción se realizó con amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0.5 mM; pH 8.0) 1:10 peso/volumen (p/v) en agitación suave a 4° C durante 16 horas. Los granos de polen fueron separados por centrifugación a 16,000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22 µm de tamaño de poro bajo condiciones de esterilidad. Todos los pasos de la extracción se hicieron a 4° C. El contenido proteico del extracto se cuantificó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Reagent; Pierce)

#### XIV. Purificación de profilinas recombinantes (rAmpa) y naturales (nAmpa)

##### a) Preparación de la columna de afinidad sefarosa-pLp.

Las profilinas se purificaron a través de cromatografía de afinidad. Se preparó una columna de sefarosa-pLp (poli-L-prolina) siguiendo el método modificado de Lindberg *et al.*, 1988. Brevemente, 1 g de sefarosa (Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4 Fast Flow) se lavó 10 veces con 15 mL de solución de lavado (HCl 1 mM). Se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación a 800 rpm durante 3 minutos. La sefarosa lavada se acopló con 55 mg de polímero de pLp (Peso molecular 1,000-10,000, Sigma-Aldrich) previamente equilibrado con 10 mL de amortiguador salino de acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, NaCl 0.5 M, pH 8.3) a 4° C durante 24 horas. Los grupos libres de la resina que no reaccionaron se bloquearon con amortiguador de bloqueo (Tris HCl 0.1M, NaCl 0.5M, pH 8.0) durante 4 horas. Se lavó la resina (sefarosa-pLp) 5 veces de forma alterna con amortiguador de lavado 2 (CH<sub>3</sub>COONa 0.1M, pH 4.0) y 5 veces con amortiguador de acoplamiento sin NaCl (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 8.3). El rendimiento aproximado del gel es de 4.5 mL por cada gramo de sefarosa. La resina obtenida se almacenó en etanol al 20% a 4° C hasta su uso.

##### b) Cromatografía de afinidad.

La columna de sefarosa-pLp se equilibró con 15 volúmenes de columna de amortiguador de extracción a flujo constante de 0.5 mL/min utilizando un cromatógrafo de líquidos BioLogic® LP system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se hizo pasar el extracto proteico por la columna a flujo de 0.2 mL/min y posteriormente se lavó con 15 volúmenes de columna con amortiguador de extracción para eliminar todo el material proteico no retenido de forma específica a la columna. Las proteínas retenidas se eluyeron con una solución de cloruro de guanidinio 4 M y se recolectaron en una sola fracción. Con la finalidad de evidenciar la presencia de proteínas en las diferentes etapas de la separación cromatográfica, se registró la absorción a 280 nm (A<sub>280</sub>) mediante un detector de flujo acoplado al equipo. El producto eluido se dializó contra 2000 volúmenes de amortiguador de extracción utilizando una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3.5 kDa. El producto del dializado se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso.

### c) Cromatografía de intercambio iónico.

El producto obtenido de la columna de afinidad previamente dializado se fraccionó utilizando una columna aniónica Mono® Q 5/50 (Amersham-GE Healthcare) acoplada a un equipo FPLC (AKTA® FPLC, GE Healthcare). Como fase de unión para las proteínas se empleó un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0 en agua des-ionizada grado cromatográfico. La elusión de las proteínas se realizó a través de un gradiente lineal de amortiguador de fosfatos adicionado con NaCl 1M a un flujo de 0.5 mL/min. Para las profilinas naturales, se colectaron las fracciones de forma manual en volúmenes de 0.5 mL, para las profilinas recombinantes se colectó sólo la fracción principal en la cual se encuentra la profilina. Las fracciones dializadas que contenían las isoformas de la profilina del polen de *A. palmeri* se almacenaron en refrigeración a 4° C hasta su uso.

## XV. Caracterización molecular.

### a) Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los productos obtenidos de las diferentes etapas sobreexpresión y purificación se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida AB-3 (49.5% T, 3% C) al 16%. Para la reducción de puentes disulfuro y la desnaturalización de las proteínas se utilizó un amortiguador de muestra conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS 0.1% incubando en baño maría a 95° C por 10 minutos. La separación electroforética se realizó a 90 volts en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System de la marca BioRad conectada a una fuente de poder PowerPac Basic de la misma marca. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (G-250) blue silver<sup>160</sup>.

### b) Inmunodetección de las profilinas por Western blot.

Para la inmunodetección de las profilinas se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida al 16% como se describió previamente. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) (Immobilon®-P Membrane, Filter Pore Size 0.45  $\mu$ m, Millipore) a 120 mA durante 70 minutos en una cámara de electrotransferencia Trans-Blot® Semi-Dry a 25°

C. Los sitios libres en la membrana se bloquearon por deshidratación de la misma siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para evidenciar la presencia de las profilinas se incubó la membrana a 37° C durante una hora con anticuerpo monoclonal diluido 1:3000 producido contra la profilina de *A. thaliana* (SIGMA-ALDRICH). El exceso de anticuerpo fue retirado a través de 5 lavados con amortiguador de fosfatos salino adicionado con 0.1% de tween<sup>®</sup> 20 (PBS-T). Se agregó como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón (HRP Goat anti-mouse IgG, BioLegend) acoplado a peroxidasa (HRP) a una dilución de 1:2500 durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) con agitación de 50 rpm. Después de eliminar el anticuerpo no acoplado mediante tres lavados de la membrana con PBS-T y dos lavados más con PBS, la membrana se incubó con una solución de tetrametilbenzidina (TMB, Invitrogen) a TA y la reacción se paró lavando la membrana con agua bidestilada.

**c) Análisis por Dicroísmo Circular (DC) de las proteínas purificadas.**

Se adquirieron los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano (198-250) para cinco isoformas de profilina utilizando un espectropolarímetro JASCO modelo J-815 equipado con un control de temperatura (PTC) y una bañera de agua (JuLabo AWC100). Los espectros de DC se tomaron con 20-50 µg/mL de profilina en amortiguador de Tris-HCl y/o amortiguador de fosfatos 20 mM a 25° C en celda de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico a una velocidad de 20 nm/min, resolución de 1 nm, ancho de banda 1 nm, sensibilidad de 50 mdeg y respuesta de 0.5 seg. Los resultados son expresados en elipticidad molar.

**d) Análisis de las profilinas mediante espectrometría de masas.**

Se obtuvieron los espectros de masas mediante la técnica de MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight). Esta técnica nos permite obtener la masa molecular entre otras características y se emplea principalmente en el análisis de biomoléculas pequeñas como azúcares (1 kDa) hasta proteínas de 300 kDa.

Las profilinas recombinantes (1 mg/mL) se mezclaron con ácido sinapínico en acetonitrilo 30 %, agua 70% y ácido trifluoro acético (TFA) 0.1 %. El equipo fue calibrado con ubiquitina (8 kDa) y

mioglobina (16.95 kDa). La relación masa/carga (m/z) para el ion molecular se obtuvo utilizando un espectrómetro MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics.

e) **Ensayos de cristalización de las profilinas.**

Las profilinas purificadas fueron dializadas contra un amortiguador de Tris-HCl 20mM a pH 7.0 y se concentraron en el sistema ULTRAFREE-0.5 (MILLIPORE) con membrana de corte de 5 kDa mediante centrifugación a 14,000 x g a 4° C hasta obtener tres concentraciones diferentes de 5, 7.5 y 10 mg/mL. Las proteínas concentradas se mezclaron con una solución precipitante (1.5 µL de c/u) contenidas en los kits Crystal Screen y Crystal Screen 2 (Hampton, Research). Un total de 98 pruebas de cristalización se incubaron a 18° C con registro constante de cambios.

## XVI. **Caracterización de alergenicidad.**

a) **Suero de pacientes (prueba cutánea)**

Se realizaron 70 pruebas cutáneas en cinco hospitales de la Ciudad de México utilizando un panel de 13 alérgenos, entre ellos cuatro profilinas recombinantes del polen de *A. palmeri*. Los criterios que se tomaron en cuenta para incluir a los pacientes en el estudio fueron:

1. Pacientes con enfermedad alérgica (asma, rinitis, en cualquiera de sus estadios, conjuntivitis, dermatitis atópica)
2. Edad entre 5 a 70 años
3. Residentes en la zona metropolitana de la ciudad de México
4. Cualquier género
5. Firmar la carta de consentimiento informado para ingresar al estudio y en caso de ser menor de edad el consentimiento de su padre o tutor

Lo criterios de no inclusión fueron:

1. Embarazo confirmado

2. Uso de terapia esteroidea tópica o sistémica, antihistamínicos tópicos o sistémicos dos semanas previas al ingreso al estudio
3. Antecedente de inmunoterapia en el último año
4. Presencia de urticaria o dermografismo
5. Residencia menor a un año en la ciudad de México
6. Presencia de síntomas de crisis de asma en cualquiera de sus estadios
7. Tratamiento con astemizol los dos últimos meses previos al estudio
8. Que no acepten firmar el consentimiento informado
9. Antecedentes personales de inmunodeficiencias severas
10. Lesiones dermatológicas patológicas en lugar de puntura
11. Presencia de tatuajes o cicatrices en lugar de puntura
12. Procesos infecciosos dérmicos en lugar de puntura

Los criterios de eliminación fueron:

1. Ausencia de aparición de eritema a la aplicación de control positivo
2. Ausencia o habón menor de 3 mm en la aplicación de control positivo
3. Reacción al control negativo

El procedimiento por el cual se realizó la prueba cutánea fue mediante “*skin prick test*”. Brevemente, se explicó al paciente en qué consiste el estudio y se solicitó firmar la carta de consentimiento informado, se realizó una asepsia en el lugar de puntura (región anterior de antebrazos, porción central, iniciando a 3 cm de articulación humero radial e igual distancia de articulación radio carpiana), con torunda de algodón inmersa en una solución de alcohol al 70%, en barridos verticales sin pasar más de una vez cada transepto definido. Posteriormente se realizaron marcas lineales con plumón no permanente de forma horizontal de 3 cm de longitud y separación entre cada línea, se aplicó una alícuota de alérgeno a investigar, después se procedió a puncionar la piel sobre la alícuota mediante lanceta para *prick test* y se realizó un ligero rascado y

siguiendo las recomendaciones dadas por el comité de pruebas cutáneas de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI). Como control positivo se utilizó clorhidrato de histamina a una concentración de 10 mg/mL y como control negativo una solución glicero-salina al 50%. Las pruebas se leyeron después de 15 a 20 minutos, se colocó sobre la región puncionada papel toalla para secar la zona y se midió de forma directa la aparición de eritema y/o pápula (roncha) utilizando una regla graduada en milímetros. Cabe mencionar que el estudio fue doble ciego y los alérgenos utilizados se describen en la tabla 3. Los resultados fueron registrados en el expediente de cada paciente. Se consideró como prueba positiva aquella con un área igual o superior a la producida por el control de histamina (3mm), y con ausencia de respuesta al control glicero-salino.

El protocolo siguió los Lineamientos Internacionales para Investigación Biomédica en seres Humanos (CIOS-WHO, 1993), los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la asociación médica mundial (declaración de Helsinki) y los lineamientos locales del comité de ética de cada hospital. Las pruebas se realizaron a doble ciego, teniendo sólo conocimiento de los controles positivo y negativo.

Clave (color)	Alérgeno
A1 (aqua)	Manzana
B1 (aqua/rojo)	Árboles mezcla
C1 (aqua/transparente)	Gramíneas
D1 (aqua/negro)	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (Short ragweed)
E1 (aqua/rojo/transparente)	Control positivo (Histamina)
F1 (Negro)	<i>Dermatophagoides farinae</i>
G1 (negro/transparente)	<i>A. palmeri</i>
H1 (negro/rojo)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
A2 (rojo)	<i>Fraxinus</i> (Fresno)
B2 (rojo/transparente)	Control negativo (Glicerosalino)
C2 (rojo/negro/aqua)	<i>Ambrosia trifida</i> (Tall ragweed)
D2 (azul)	rAmpa ISO-1
E2 (azul/transparente)	rAmpa ISO-4
F2 (azul/rojo)	rAmpa ISO-7
G2 (negro/azul)	rAmpa ISO-8



**Tabla 3.** Panel de alérgenos para “*skin pick test*”. Se muestran los 13 alérgenos probados en los diferentes hospitales, se incluyeron cuatro profilinas recombinantes provenientes del polen de *A. palmeri* además de los controles positivo y negativo.

**b) Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA).**

Se incubaron de forma individual y por duplicado las profilinas en una placa para ELISA (Stripwell™ Microplates, Corning®) utilizando 10 µg de proteína por pozo. La placa se incubó durante toda la noche (15 h) a 4° C. El exceso de antígeno se retiró mediante un lavado con 300 µL de PBS. Los sitios vacíos se bloquearon con 100 µL de solución bloqueadora (BLOT-QuickBlocker®, Chemicon-Millipore) al 3% en PBS durante dos horas y media a 25° C. El exceso de solución bloqueadora se retiró y los pozos se lavaron con 300 µL de PBS. La placa se incubó con 100 µL de suero de paciente (1:5) diluido en amortiguador de ensayo (cat # AB-10XP, Millipore) durante 16 horas a 4° C. Los anticuerpos no unidos se retiraron a través de cuatro lavados de 5 min c/u con 300 µL/pozo de amortiguador de lavado (cat# EWB-HRP, Millipore). Para evidenciar la unión del anticuerpo primario se incubaron los pozos con 100 µL del anticuerpo anti-IgE humana (HRP-conjugated Goat anti-Human IgE polyclonal antibody, GeneTex) acoplado a peroxidasa (HRP) a una dilución de 1:2500 en amortiguador de ensayo, durante 2 horas a 25° C y 50 rpm. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante 5 lavados como se describieron anteriormente. Finalmente, la presencia de los complejos se evidenció adicionando 100 µL de 3,3,5,5 tetrametil-benzidina (TMB) (TMB single solution, Novex by life technologies™) como sustrato. Se permitió desarrollar la reacción en ausencia de luz por 45 min. La reacción se paró adicionando 100 µL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La absorbancia de cada celda se registró en un lector para placas de ELISA (Microplate reader M201, Shenzhen emperor electronic technology co., ltd) a 450 nm.

# RESULTADOS DISCUSIÓN

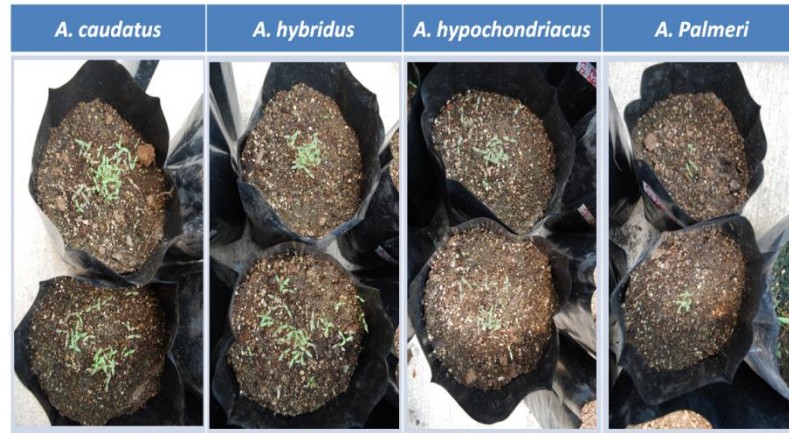
## XVII. Clonación de profilinas

### a) Obtención de plantas de *Amaranthus*.

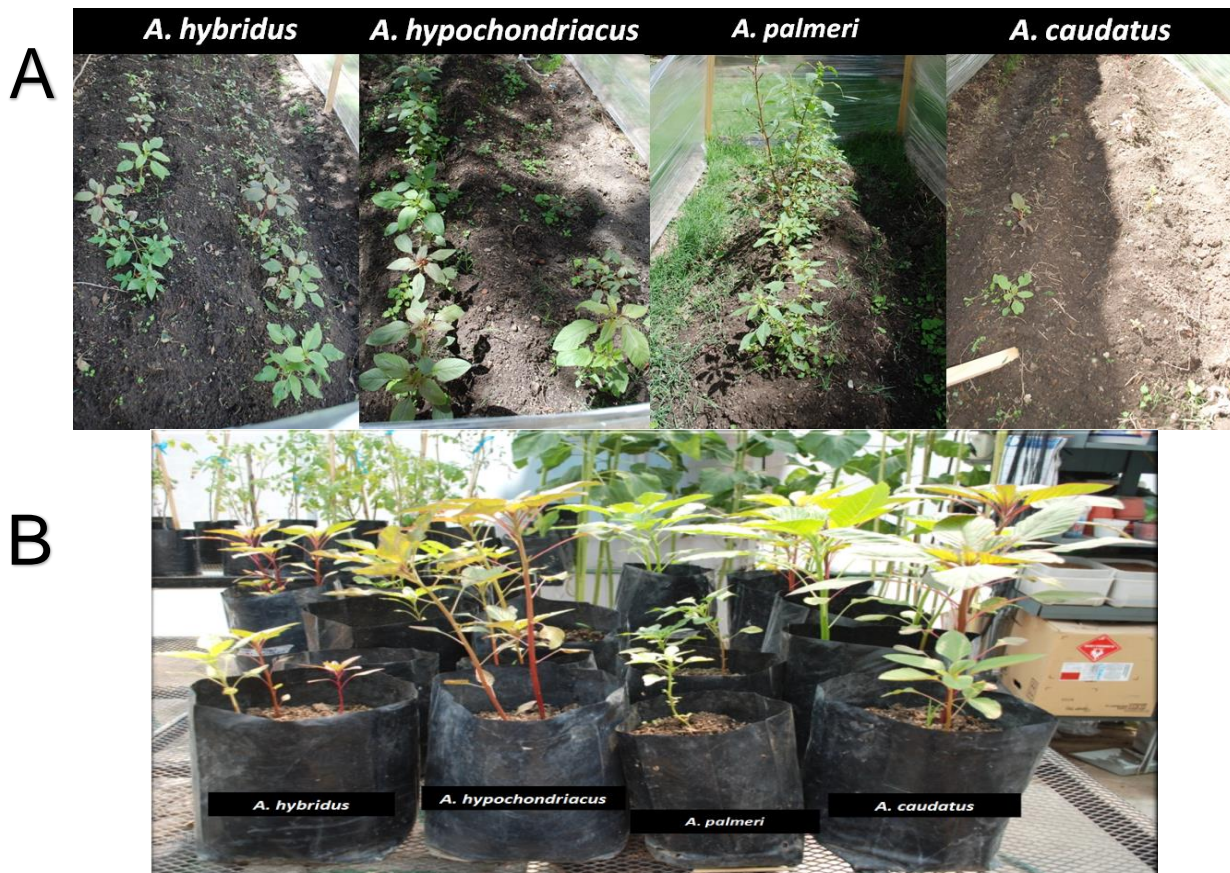
Las semillas del germoplasma de *A. palmeri* fueron generosamente donadas por el Dr. Eduardo Espitia Rangel; Director Regional del CIR CENTRO del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Adicionalmente se obtuvieron semillas de otras especies de amaranto comestibles (*Amaranthus hybridus*, *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus caudatus*) las cuales fueron adquiridas a través del Consejo de Administración, de Obleas dulce vida SPR de RL; cultivar de Huazulco, Temoac Morelos, México. El crecimiento se dio sin dificultad bajo las condiciones descritas, utilizando como primer muestra plántulas completas de 6 días post-siembra, todas ellas en estadio de cotiledones expandidos (Figura 7). Unas plántulas fueron trasplantadas al campo libre (Figura 8A) y otras se mantuvieron en invernadero (Figura 8B) observándose el mejor crecimiento en las plántulas al aire libre, sin embargo estas fueron atacadas por una plaga de chapulines, que como dato importante se destaca que la especie de *A. caudatus* fue la más afectada.

### b) Recolección de polen y tejidos.

Los tejidos utilizados para la extracción del RNA se resumen en la tabla 4. La finalidad de utilizar diferentes estadios y tejidos de las plantas fue para garantizar la clonación de las profilinas ya que éstas, como se ha mencionado, se expresan de manera tejido-específica y algunas de ellas sólo en ciertas etapas del desarrollo en *A. thaliana* y esta información se desconoce en amaranto. El polen de *A. palmeri* fue recolectado con una pureza mayor al 95% y se usó para la extracción del RNA total. Todos los tejidos obtenidos se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido y de manera inmediata se procesaron para la extracción del RNA.



**Figura 7.** Plántulas de *Amaranthus* con 6 días post-siembra crecidas en condiciones de invernadero.



**Figura 8.** Plantas de *Amaranthus* 8 semanas post-siembra. (A) Campo abierto. (B) Invernadero. El crecimiento de las plántulas es parejo en invernadero y en campo abierto es desigual para cada especie.

Fuente	Tejido
<i>A. palmeri</i>	Polen, plántula completa, hojas jóvenes
<i>A. hybridus</i>	Plántula completa, hojas jóvenes
<i>A. hypochondriacus</i>	Plántula completa, hojas jóvenes
<i>A. caudatus</i>	Plántula completa, hojas jóvenes
<i>Amaranthus ssp</i> (A)	Hoja joven, hoja madura
<i>Amaranthus ssp</i> (B)	Hoja joven, inflorescencia,
<i>Amaranthus ssp</i> (C)	Hoja joven, inflorescencia
<i>R. communis</i>	Hoja joven, flor
<i>G. max</i>	Primeras dos hojas verdaderas, hipocótilo
<i>Z. mays</i>	Hoja joven, inflorescencia masculina inmadura
<i>A. thaliana</i>	Hojas caolinas, flor inmadura completa

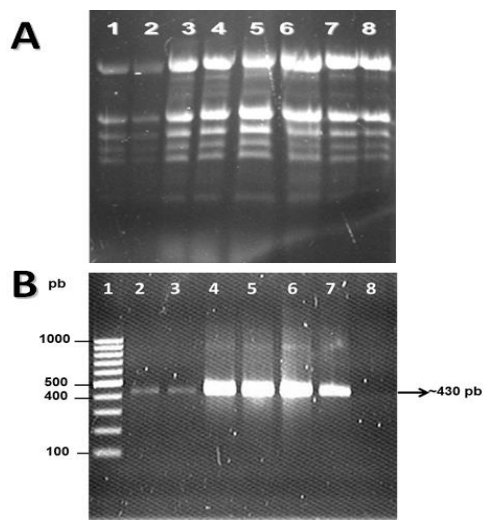
**Tabla 4.** Tejidos utilizados para la extracción del RNA total. Se muestran los diferentes tejidos utilizados, esto con la finalidad de obtener el mayor número posible de isoformas independientemente del estadio.

### c) Extracción del RNA y RT-PCR.

El RNA total extraído de los diferentes tejidos fue analizado a través de electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa observando una buena integridad (Figura 9A). El análisis espectrofotométrico mostró que la calidad del material era adecuada para la síntesis de cDNA (Tabla 5). Es importante destacar que las diferencias en el rendimiento están dadas por la naturaleza de la especie y del tejido del cual se parte, destacando que la menor concentración se obtuvo a partir del polen. La síntesis de cDNA específico se realizó mediante RT-PCR teniendo como estrategia el uso de oligonucleótidos degenerados diseñados con base en la conservación de codones de secuencias que codifican para profilinas de *Hevea brasiliensis*, amaranto (*A. retroflexus* y *A. viridis*) y la secuencia parcial de aminoácidos obtenida por espectrometría de masas para dos profilinas expresadas en el polen de *A. palmeri* (Figura 10). Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% observándose el enriquecimiento de un fragmento de aproximadamente 430 pb (Figura 9B) el cual fue purificado.

Fuente	Tejido	[ $\mu\text{g/mL}$ ]
<i>A. palmeri</i>	Polen	472
	Plántula completa	691
	Hojas jóvenes	579
<i>A. hybridus</i>	Plántula completa	1070
	Hojas jóvenes	783
<i>A. hypochondriacus</i>	Plántula completa	1481
	Hojas jóvenes	2151
<i>A. caudatus</i>	Plántula completa	740
	Hojas jóvenes	1244
<i>A. ssp (A)</i>	Hojas jóvenes	4231
	Hojas maduras	1660
<i>A. ssp (B)</i>	Hojas maduras	735
	Inflorescencia	1057
<i>A. ssp (C)</i>	Hojas maduras	787
	Inflorescencia	2508
<i>R. communis</i>	Hojas jóvenes	9572
	Flor	2551
<i>G. max</i>	Primeras dos hojas verdaderas	8366
	Hipocótilo	1509
<i>Z. mays</i>	Hojas jóvenes	1823
	Flor inmadura	2298
<i>A. thaliana</i>	Hojas caolinas	999
	Flor inmadura completa	1714

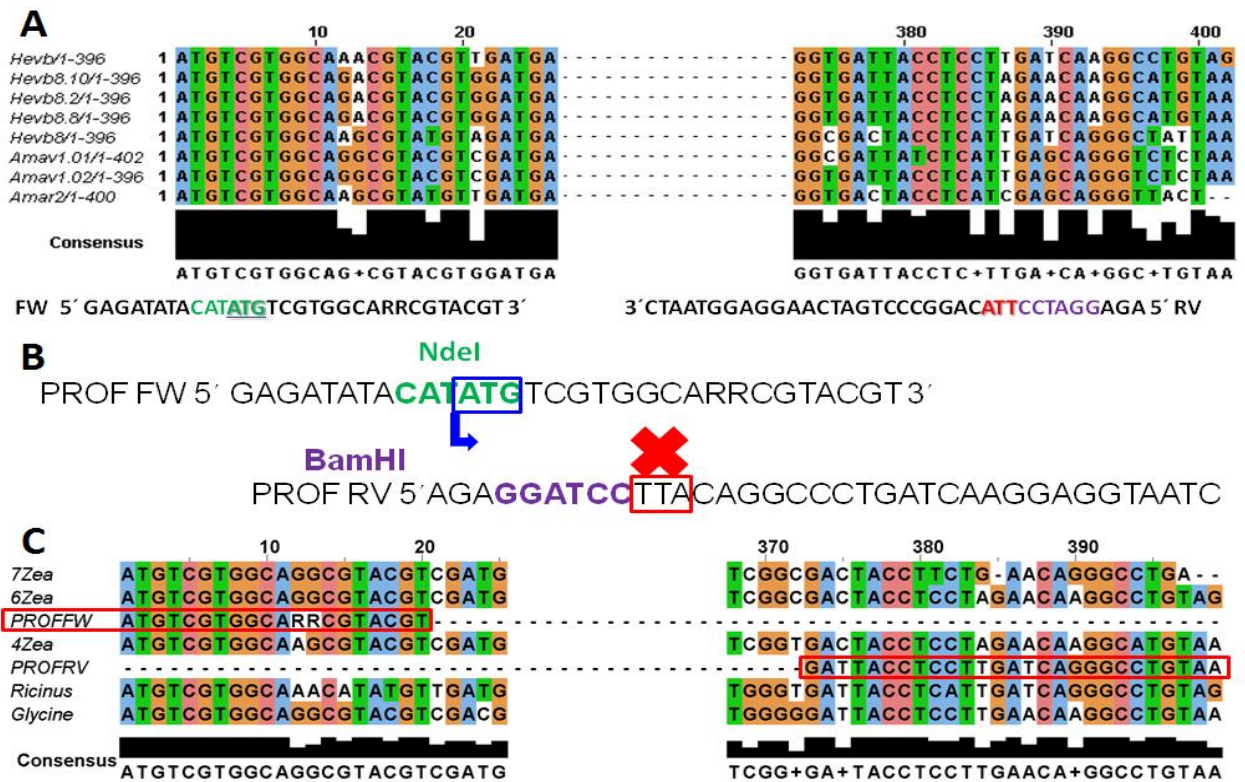
**Tabla 5.** Concentración de la extracción del RNA total para los diferentes tejidos utilizados.



**Figura 9.** Integridad del RNA total y amplificación por RT-PCR. (A). Imagen representativa de la separación electroforética de algunas muestras del RNA obtenidas. En los carriles 1 y 2 se observa RNA del polen de *A. palmeri*, en los carriles 3 y 4 de *A. hybridus*, en carriles 5 y 6 de *A. hypochondriacus* y en los carriles 7 y 8 de *A. caudatus*.

(B) Fragmentos amplificados por RT-PCR de diferentes plantas. En el carril 1 marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Fermentas- Thermo Scientific), en carriles 2 y 3 los fragmentos obtenidos usando como templado el cDNA del polen de *A. palmeri*, en el carril 4 de *A. hybridus*, en carril 5 de *A. hypochondriacus*, en carril 6 de *A. caudatus*, en carril 7 *G. max* y en carril 8 control negativo de amplificación. Los productos amplificados son de alrededor 430 pb, correspondiente con lo esperado para los genes que codifican profilinas.





**Figura 10.** Alineamiento de secuencias para el diseño de oligonucleótidos degenerados. (A) Se muestra el alineamiento realizado para obtener la secuencia consenso a partir de la cual se basó el diseño de los oligonucleótidos degenerados. (B) Se muestran los oligonucleótidos resultantes incluidos los sitios de restricción. (C) Se muestra un alineamiento múltiple de secuencias reportadas para profilinas contra los oligonucleótidos diseñados observándose la conservación para profilinas de *Z. mays*, *R. communis* y *G. max*.

**d) Clonación del cDNA de las profilinas del polen de *A. palmeri* y otras especies**

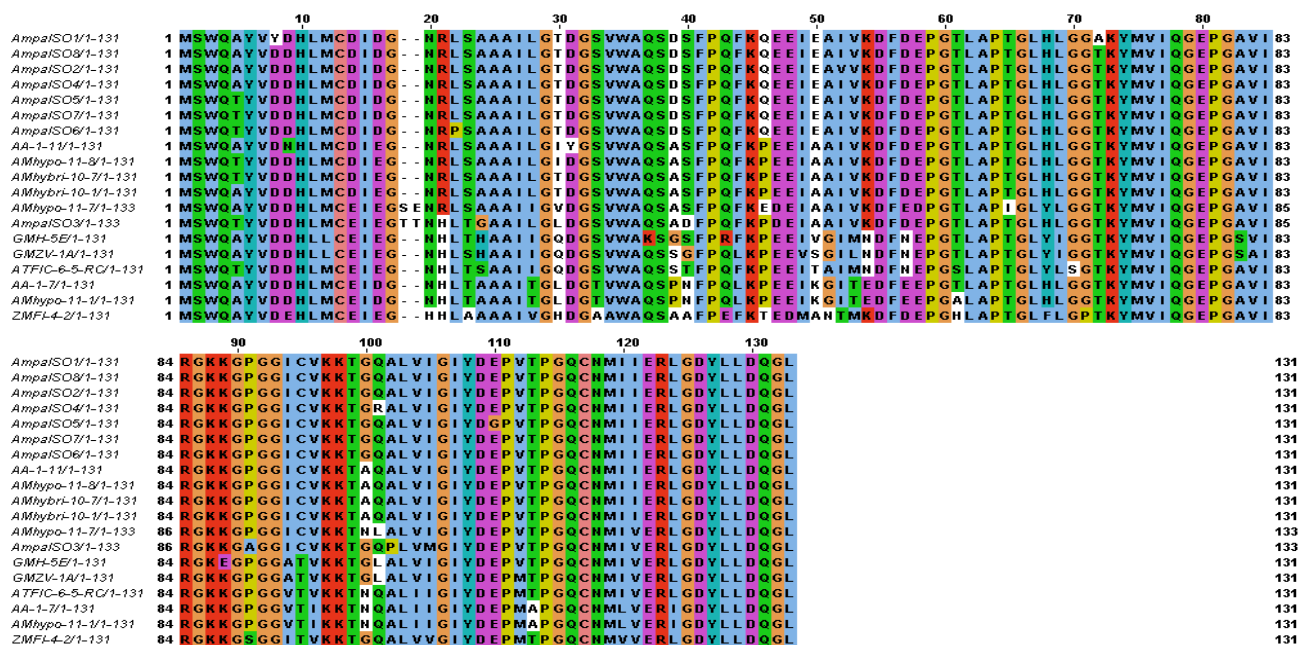
Los fragmentos obtenidos de la RT-PCR fueron purificados y posteriormente clonados en un vector pJET1.2/blunting. Se secuenciaron 49 plásmidos de los diferentes tejidos y plantas y el análisis de las secuencias indicó que se clonaron de 19 profilinas (Figura 11) de siete especies diferentes (Tabla 6) cabe mencionar que ninguna de las secuencias había sido reportada previamente en la literatura o bases de datos, permitiéndonos hacer una aportación de las 19 secuencias. El análisis de secuencias de nucleótidos muestra un marco de lectura abierto de entre 393-399 nucleótidos. Se tradujeron las secuencias y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias usando el programa Clustal-W (Figura 12). Las secuencias obtenidas presentan de 131 a 133 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de entre 13.9 y 14.3 kDa y un punto isoeléctrico (*pI*) teórico de entre 4.50 y 4.60. Es importante destacar que cuatro profilinas del polen de *A. palmeri* presentan el mismo *pI* teórico a pesar de tener diferente masa molecular y secuencia.

<b>Fuente</b>	<b>Tejido</b>	<b>Clonas</b>
<i>A. palmeri</i>	Polen	8
<i>A. hybridus</i>	Plántula completa	2
<i>A. hypochondriacus</i>	Plántula completa	3
<i>A. ssp</i> (A)	Hojas jóvenes	2
<i>R. communis</i>	Flor	1
<i>G. max</i>	Primeras dos hojas verdaderas	1
	Hipocótilo	1
<i>Z. mays</i>	Inflorescencia masculina inmadura	1
		<b>19</b>

**Tabla 6.** Profilinas clonadas y tejido de origen. En esta tabla se muestran los diferentes tejidos de los cuales se obtuvo el cDNA para clonar las 19 profilinas.







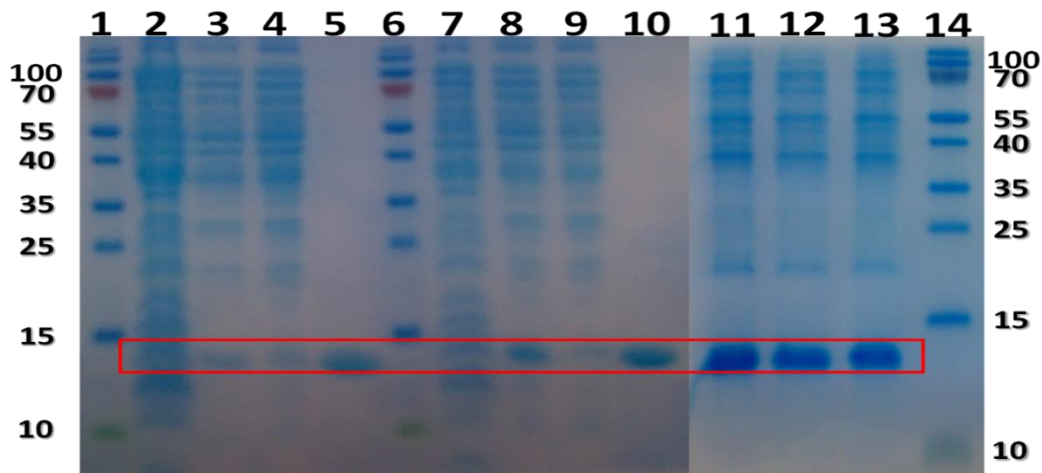
**Figura 12.** Alineamiento múltiple de aminoácidos de profilinas clonadas. Este alineamiento nos muestra la alta conservación de las secuencias haciendo énfasis en los extremos amino y carboxilo terminal.

El alineamiento múltiple muestra una identidad de 85 % y una similitud del 90 %, lo cual, indica la alta conservación de secuencias entre las diferentes especies; sin embargo, se observan cambios puntuales que pueden ser los responsables de las diferencias en la alergenicidad entre estas profilinas, lo cual puede ser corroborado mediante ensayos de ELISA con sueros de pacientes alérgicos. En el alineamiento también se puede observar que la región más divergente está entre los aminoácidos 18 al 54, siendo las secuencias de *A. palmeri* isoforma 3 (Ampa-ISO3), *G. max* (GMH-5E, GMZV-1A), *R. communis* (ATFIC-6-5-RC), *Amaranthus ssp A* (*A. ssp A* 1-7), *A. hypochondriacus* (Amhyppo 11-1) y *Z. mays* (ZMFI4-2) las más divergentes.

## XVIII. Expresión y obtención de extractos

### a) Expresión de las profilinas recombinantes del polen de *A. palmeri*

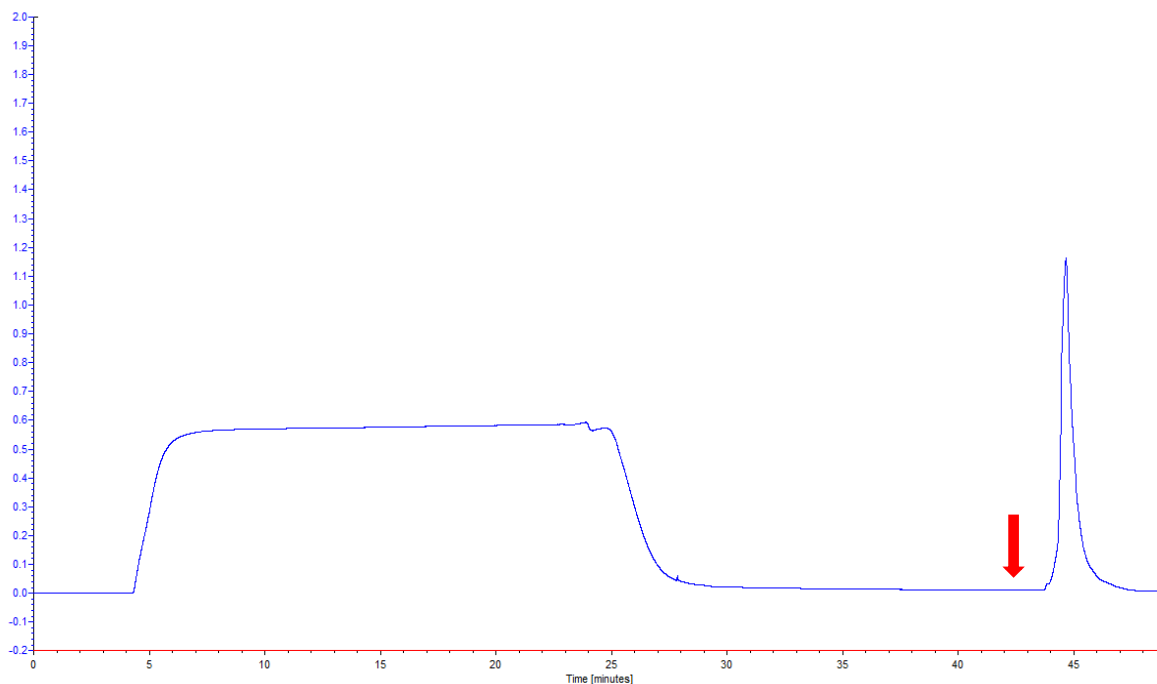
La expresión de las profilinas fue probada en dos cepas; en *E. coli* BL21(DE3)pLysS y *E. coli* Rosetta-gami. En ambos casos se realizó una cinética de expresión usando la combinación de tres variantes; concentración del IPTG, temperatura y el tiempo de expresión, modificando las variantes una a la vez. Los resultados obtenidos nos muestran que la óptima expresión de las profilinas se obtiene con una concentración de 0.6-1 mM de IPTG y entre 6-15 horas de inducción a una temperatura de 37° C, siendo esta última variante la más determinante para la óptima expresión. La expresión de las isoformas de profilina se llevaron a cabo en *E. coli* Rosetta-gami con 0.6 mM de IPTG, a 37° C durante 12-15 horas. Las fracciones soluble y no soluble de los extractos se analizaron en geles de poliacrilamida observándose que las profilinas rAmpa ISO-3, rAmpa ISO-4, rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8 se localizaban en la fracción soluble mientras la isoforma rAmpa ISO-1 se localizaba en la fracción no soluble, por lo cual esta fracción fue tratada para obtener la proteína de forma soluble a partir de cuerpos de inclusión (Figura 13).



**Figura 13.** Expresión de las profilinas recombinantes. Se analizó la sobreexpresión de las profilinas recombinantes en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 16% y se tiñó con Azul de Coomassie G-250 blue silver. En los carriles 1, 6 y 14 se muestra el corrimiento de los marcadores de masa molecular (Fermentas-Thermo Scientific); carril 2, extracto total bacteriano de rAmpa ISO-1; carril 3, extracto de cuerpos de inclusión de rAmpa-ISO1 dializados contra Tris-HCl; carril 4, extracto no unido a la columna de afinidad; carril 5, rAmpa ISO-1 purificada; Carril 7, extracto total bacteriano de rAmpa ISO-3 antes de inducción; carril 8, expresión rAmpa ISO-3; carril 9, extracto no unido a la columna de afinidad de rAmpa ISO-3; carril 10, rAmpa ISO-3 purificada; carril 11, expresión rAmpa ISO-4; carril 12, expresión rAmpa ISO-7 y carril 13, expresión rAmpa ISO-8. El recuadro rojo indica las bandas correspondientes a las profilinas inducidas.

## XIX. Purificación de profilinas recombinantes

Los extractos proteicos totales conteniendo a las profilinas recombinantes se aplicaron a la columna de afinidad de Sefarosa-pLp (Figura 14). La capacidad de unión de la columna es de aproximadamente 1.5 mg por cada mililitro de resina. En cuanto a la expresión, el rendimiento es similar; sin embargo, cuando se purifica varía dependiendo de la isoforma (Tabla 7).

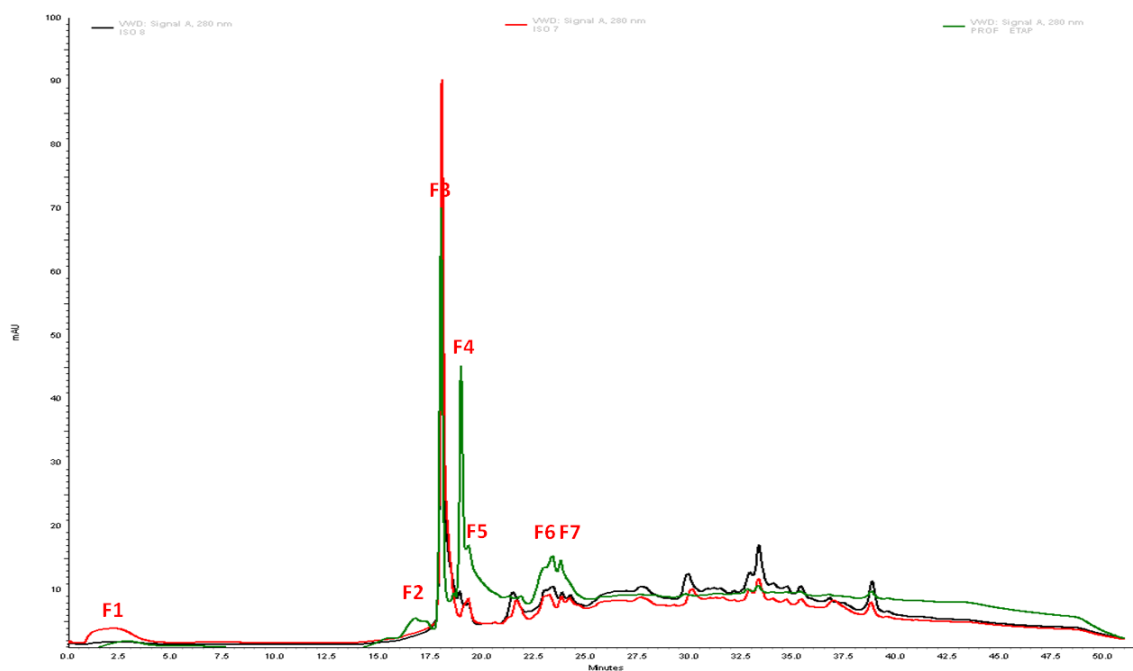


**Figura 14.** Cromatografía de afinidad. Se muestra un cromatograma característico del perfil de elución de las profilinas recombinantes. En este caso el cromatograma corresponde a la isoforma rAmpa ISO-4. En azul se muestra el registro de la absorción a 280 nm. La elución se inició con la adición de una solución de 4 M de cloruro de guanidina (indicado con la flecha) generando una sola fracción de elución.

**Tabla 7.** Rendimiento en la purificación de las profilinas recombinantes. La tabla muestra el rendimiento de las profilinas recombinantes después de la purificación por cromatografía de afinidad a Sefarosa-pLp por cada litro de medio.

Isoforma	Rendimiento
rAmpa ISO-1	9 mg/L
rAmpa ISO-3	8 mg/L
rAmpa ISO-4	11 mg/L
rAmpa ISO-7	12 mg/L
rAmpa ISO-8	11 mg/L

Para obtener las isoformas con un alto grado de pureza, la fracción obtenida de la cromatografía de afinidad fue fraccionada por cromatografía de intercambio iónico a través de una columna Mono-Q. La cromatografía se realizó bajo las mismas condiciones que se obtuvieron las profilinas naturales (nAmpa). En el cromatograma de nAmpa, se observa la separación de siete fracciones principales (F1 al F7), de las cuales, las fracciones F2 a F5 fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales contra la profilina de frijol mediante ensayos de ELISA (Landa-Pineda C.M; 2010). Las isoformas rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8 presentaron el mismo tiempo de retención que la fracción 3, lo cual nos indica que probablemente son las mismas isoformas que se identificaron en el extracto natural las que se clonaron como rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8 (Figura 15) (Landa-Pineda C.M; 2010).

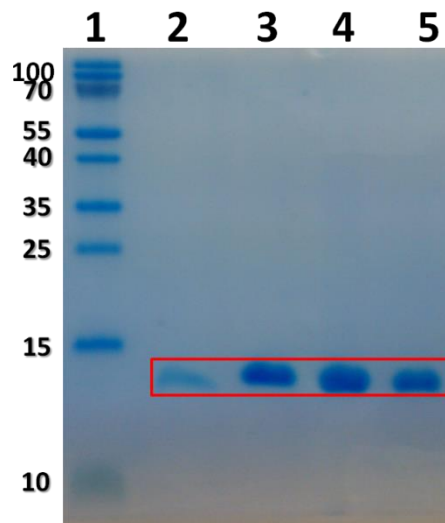


**Figura 15.** Cromatografía de intercambio iónico. Perfil cromatográfico de las profilinas naturales y de dos profilinas recombinantes. La línea en **verde** muestra la presencia de siete fracciones principales, la línea **roja** muestra el perfil de elusión de la profilina rAmpa ISO-7 y la línea **negra** el perfil de elusión de la profilina rAmpa ISO-8. Se puede observar que la fracción F3 de las profilinas naturales, la fracción principal de rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8 presentan el mismo tiempo de retención bajo las mismas condiciones cromatográficas.

## XX. Caracterización molecular

### a) Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

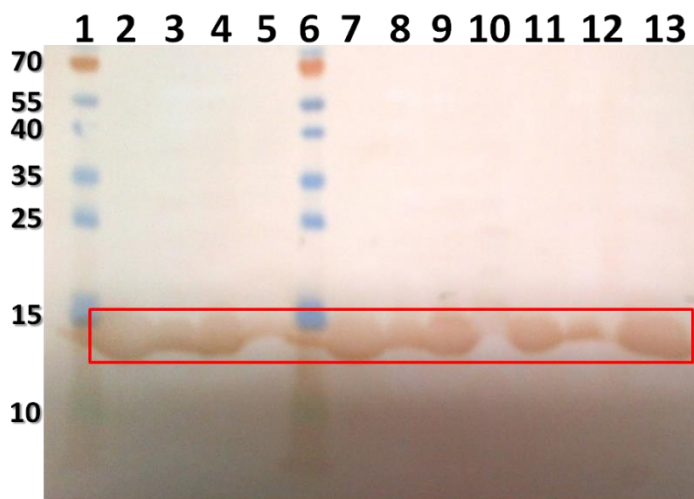
El producto de elusión de la cromatografía de afinidad se analizó mediante geles de acrilamida teniendo como resultado la presencia de una banda única de aproximadamente 14 kDa con una pureza (> 95%), lo cual nos indica que las profilinas recombinantes de *A. palmeri* pueden ser purificadas en un sólo paso obteniendo alta eficiencia y rendimiento. Por otra parte, las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico también se analizaron en geles de acrilamida, observándose el mismo resultado, una banda de aproximadamente 14 kDa para cada isoforma (Figura 16). Las isoformas rAmpa ISO-1 y rAmpa ISO-3 se muestran en la figura 13 en los carriles 5 y 10, respectivamente.



**Figura 16.** Perfil electroforético de la profilinas purificadas. Corrimiento electroforético de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico. En carril 1, marcador de masa molecular (Fermenta-Thermo scientific); carril 2, rAmpa ISO-1; carril 3, rAmpa ISO-4; carril 4, rAmpa ISO-7 y carril 5 rAmpa ISO-8. En el recuadro rojo se muestra el corrimiento electroforéticos esperado para una proteína de 14 kDa. Gel teñido con azul de coomassie G-250 blue silver.

### b) Western blot

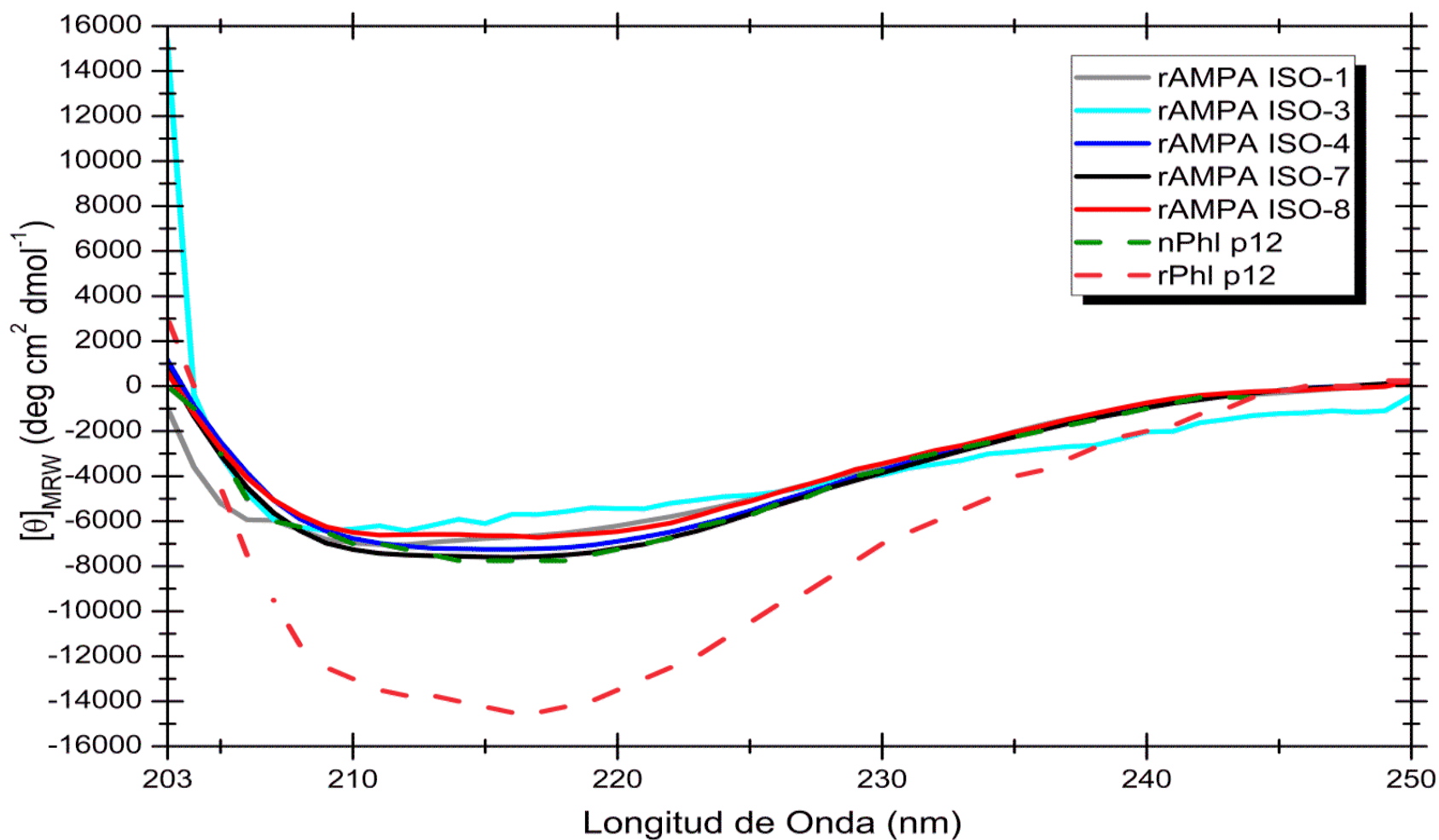
Se realizó la identificación de las proteínas purificadas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo primario contra la profilina 4 del polen de *A. thaliana* que tiene reacción cruzada con las profilinas de *A. palmeri* (Landa-Pineda C.M; 2010), obteniéndose el reconocimiento de una sola fracción para todas las muestras ensayadas (Figura 17).



**Figura 17.** Western blot. Se muestra el reconocimiento de una banda de 14 kDa en los diferentes pasos de sobreexpresión y purificación de las profilinas recombinantes. Carriles 1 y 6, marcador de masa molecular (Fermentas-Thermo scientific); carril 2, expresión de rAmpa ISO-4; carril 3, expresión de rAmpa ISO-7; carril 4, expresión de rAmpa ISO-8; carriles 5 y 10, vacíos; carril 7, cuerpos de inclusión rAmpa ISO-1; carril 8, rAmpa ISO-1 purificada; carril 9, rAmpa ISO-3 purificada; carril 11, rAmpa ISO-4 purificada; carril 12, rAmpa ISO-7 purificada y carril 13, rAmpa ISO-8 purificada.

### c) Dicroísmo Circular (DC).

La estructura secundaria regular de las proteínas recombinantes purificadas fue analizada mediante dicroísmo circular, observándose que el espectro es similar entre ellas y característico a los espectros reportados para otras profilinas (Figura 18). Estos resultados nos indican que los cambios en las secuencias de aminoácidos que presentan las profilinas no afectan significativamente el contenido de estructura secundaria regular de la proteína. Es importante resaltar que los cambios en regiones específicas de estas proteínas sólo se podrían hacer evidentes a través de la resolución de la estructura tridimensional por cristalografía de rayos-X<sup>98,100,101</sup> o por espectrometría de resonancia magnética nuclear.



**Figura 18.** Espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de las profilinas recombinantes. Las proteínas fueron dializadas y diluidas en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4 a una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Las líneas continuas gris, cian, azul, negro y rojo muestran el espectro obtenido para las profilinas rAmpa ISO-1, rAmpa ISO-3, rAmpa ISO-4, rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8, respectivamente. Se muestran los espectros reportados por Valenta R. y colaboradores de una profilina de *Phleum pratense* purificada de fuente natural (nPhl p12, línea verde) y la misma profilina pero recombinante (rPhl p12, línea roja)<sup>161</sup>

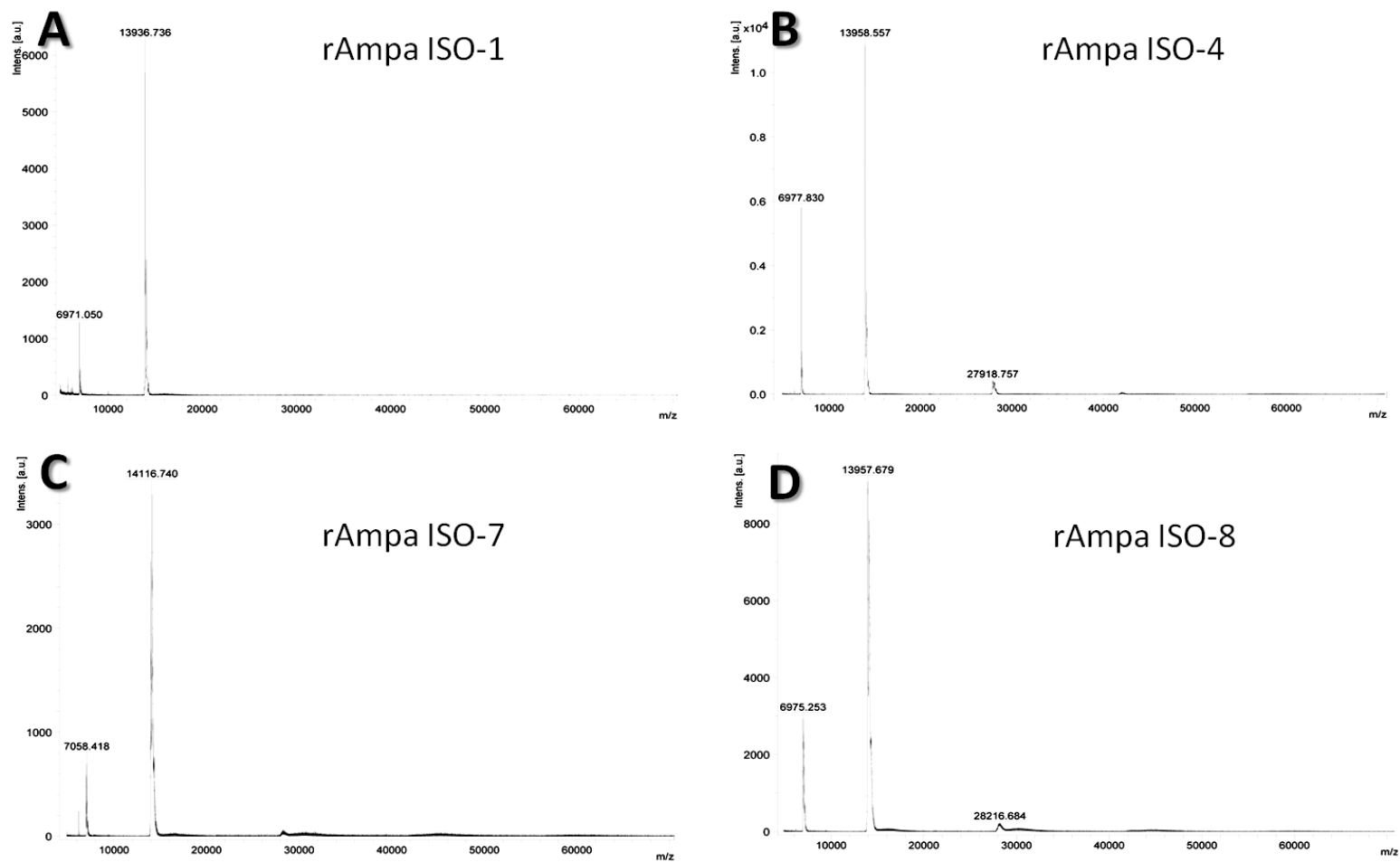
#### d) Espectrometría de masas.

Se determinó la masa molecular de las profilinas recombinantes mediante espectrometría de masas (Tabla 8). Se destaca que las isoformas rAmpa ISO-1, ISO-4 e ISO-8 coincide la masa molecular obtenida con la teórica cuando la proteína no tiene la metionina inicial y sólo la rAmpa ISO-7 coincide la masa molecular experimental con la masa molecular teórica cuando está presente la metionina. Los espectros obtenidos para cada isoforma muestran un claro ion correspondiente a la  $m/z$  de una sola especie que corresponde al monómero y con menor abundancia las especies con cargas  $z^{2+}$  y el dímero ( $m/z \times 2$ ). Es importante destacar que, aunque de forma recurrente los análisis de masas en profilinas de diversas especies el predominio en todos los casos es de monómeros de la proteína, se ha reportado la formación de oligómeros de profilina que van desde dímeros hasta tetrámeros formados por interacciones covalentes como puentes disulfuro o por interacciones iónicas<sup>162</sup>. Es importante mencionar también que la oligomerización de las proteínas está regulada por diversos factores como son, concentración, pH, sales del amortiguador utilizado, temperatura, entre otros factores. Estas proteínas se analizaron en diferentes amortiguadores (Carbonatos, PBS, Tris-HCl) y pH (7-8.5), encontrando que el amortiguador de Tris-HCl 20 mM pH 7.4 es el que promueve la presencia de monómeros, sin embargo no evita la oligomerización o agregación, la cual se da con el tiempo de almacenamiento.

rAmpa	# aa	Masa teórica	Masa teórica	Masa
		con Met	sin Met	experimental
ISO-1	131	14071	13939.8	13936.736
ISO-4	131	14081	13949.8	13958.557
ISO-7	131	14083	13951.8	14116.74
ISO-8	131	14053	13921.8	13957.679

**Tabla 8.** Masa molecular de las profilinas recombinantes. Se calculó la masa teórica de cada una de las isoformas con base en la secuencia de aminoácidos para cada una, considerando la presencia o no de la metionina inicial. En **rojo** se muestran las masas coincidentes entre el valor teórico y el obtenido experimentalmente.





**Figura 19.** Espectros de masas de las profilinas recombinantes. **(A)** Espectro de masas de rAmpa ISO-1 en donde la especie principal corresponde a la relación  $m/z$  para el ion molecular ( $MH^+$ ) de **13936.736** y para ion  $MH_2^{+2}$  es de 6971.050. **(B)** Espectro de masa de rAmpa ISO-4 en donde la especie principal corresponde a una masa de **13958.557** y para el ion  $MH_2^{+2}$  es de 6977.830. Se observa una especie de **27918.757** que corresponde a la masa esperada para un dímero de esta proteína. **(C)** Espectro de masas de rAmpa ISO-7 en donde se muestra una especie principal con una  $m/z$  para el ion molecular ( $MH^+$ ) de **14116.740** y para el ion  $MH_2^{+2}$  de **7058.418**. **(D)** Espectro de masas de rAmpa ISO-8 con una especie principal con una relación  $m/z$  para el ion molecular ( $MH^+$ ) de **13957.679** y para el ion  $MH_2^{+2}$  de **6975.253**. Para esta isoforma se obtiene una especie de **28216.684** que es la masa esperada para un dímero en esta proteína.

e) **Ensayos de cristalización.**

Con la finalidad de obtener cristales proteicos que permitan en un futuro obtener la estructura tridimensional de las profilinas recombinantes, se probaron las condiciones de cristalización de los kits de *Crystal Screen* y *Crystal Screen 2*. En total se probaron 98 condiciones con diferentes concentraciones de proteína. Se obtuvieron microcristales en las condiciones que se muestran en la Tabla 9.

Isoforma	[mg/mL]	Tris-HCl 0.1M + Sulfato de amonio 1.6M			° C
		pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0	
rAmpa ISO-4	6.3		☑	☑	18
rAmpa ISO-7	11.8	☑	☑		
rAmpa ISO-8	6.7		☑	☑	

**Tabla 9.** Condiciones de cristalización. Se utilizó el mismo amortiguador y sal, sólo se varió la concentración de proteína y el pH la cual se obtuvo la formación de microcristales. En la tabla se marcan las condiciones preferentes de cristalización.

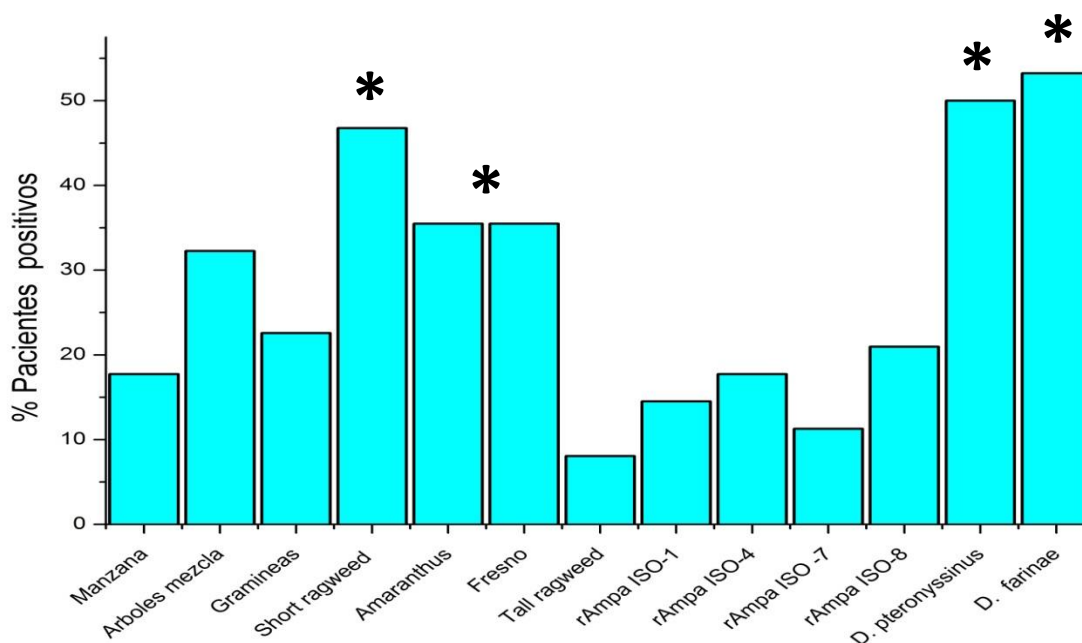
Las condiciones con las cuales se obtuvieron los microcristales fueron con la misma concentración de amortiguador y sal variando sólo el pH 0.5 unidades. Las tres isoformas formaron microcristales cuando se usa pH 8.5, sin embargo, para la isoforma rAmpa ISO-7 se obtuvieron cristales de mejor calidad a pH 8.0 y para las isoformas rAmpa ISO4 y rAmpa ISO8 a pH 9. Es importante destacar que no obstante que existen varias profilinas de plantas y animales cuya estructura tridimensional se ha obtenido por cristalografía de rayos-X<sup>98,101</sup>, las condiciones de cristalización para cada proteína es particular, por lo que es necesario siempre realizar una gran cantidad de pruebas para obtener cristales con una calidad adecuada para la difracción de rayos-X.

## XXI. Caracterización de alergenicidad.

### a) Suero de pacientes (prueba cutánea)

Los resultados de las pruebas cutáneas en pacientes alérgicos se utilizaron para contar con un estimado que nos permitiera conocer la prevalencia de IgE para las profilinas recombinantes en pacientes alérgicos al polen de *A. palmeri*. Las profilinas utilizadas fueron rAmpa ISO1, rAmpa ISO-4, rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8. Se captaron 71 nuevos pacientes de los cuales se analizaron sólo 62 que cumplían con los criterios establecidos en el protocolo descrito en materiales y métodos.

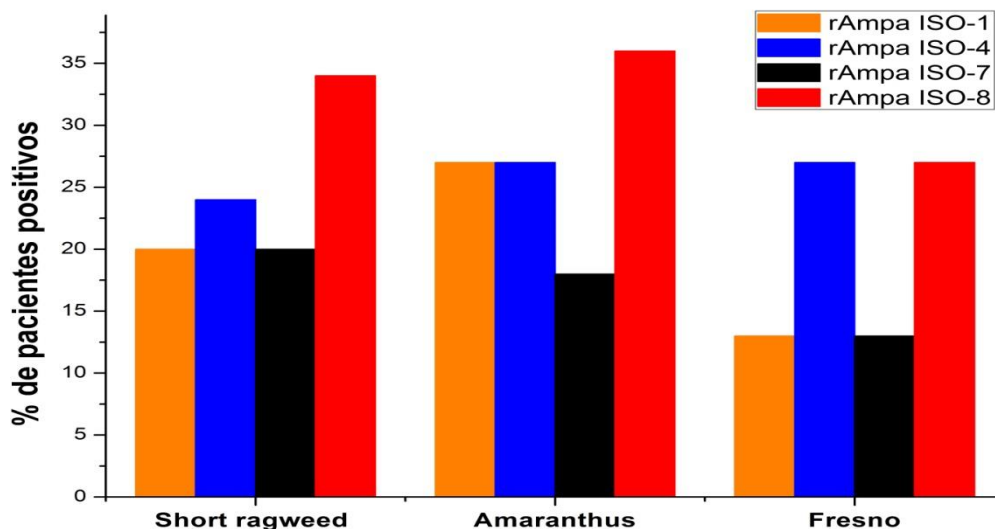
Los alérgenos con mayor prevalencia de reconocimiento fueron los ácaros *Dermatophagoides farinae* (53%) y *Dermatophagoides pteronyssinus* (50%) seguido de ambrosía (*Short ragweed*) (46%), *A. palmeri* y fresno, estos dos últimos con un 35% de pruebas positivas (Figura 20).



**Figura 20.** Prevalencia de pruebas cutáneas. Se resaltan con asterisco (\*) las principales fuentes alérgicas. Los ácaros *D. pteronyssinus* y *D. farinae* mostraron una prevalencia del 50 y 53 % respectivamente. Ambrosía fue la tercera especie más prevalente con 47 %. *Amaranthus* y fresno representan la cuarta fuente de alérgenos en la población estudiada ambos con una prevalencia del 36 %.

Para el caso de las profilinas recombinantes se pudo observar que tienen una prevalencia entre 11 y 21 % de forma individual, pero si contemplamos la prevalencia de todas las profilinas, es decir, que los pacientes con prueba cutánea positiva a cualquiera de las cuatro isoformas la prevalencia aumenta al 31 %. La profilina rAmpa ISO-8 es la que presenta mayor reconocimiento *in vivo* de las cuatro isoformas probadas y rAmpa ISO-7 es la que presenta el menor reconocimiento. Este resultado es relevante ya que la diferencia entre ambas isoformas es de sólo un residuo de aminoácido en la posición 5. Esto nos indica que la alanina 5, presente en la isoforma identificada como rAmpa ISO-8, le confiere mayor alergenicidad a esta proteína en comparación a la isoforma que tiene una treonina en la misma posición.

Es importante resaltar que el 41 % de los pacientes que presentó una prueba cutánea positiva a la ambrosía también lo fue a cualquiera de las cuatro profilinas probadas. De manera similar, el 45 % de los pacientes con IgE para el extracto del polen de *A. palmeri* tuvieron pruebas positivas para las profilinas recombinantes y el 36% se observó para los pacientes alérgicos al fresno (Figura 21). Estos resultados nos indican la relevancia en la reactividad cruzada que podría presentarse entre las profilinas recombinantes aquí reportadas y las profilinas presentes en estas fuentes.



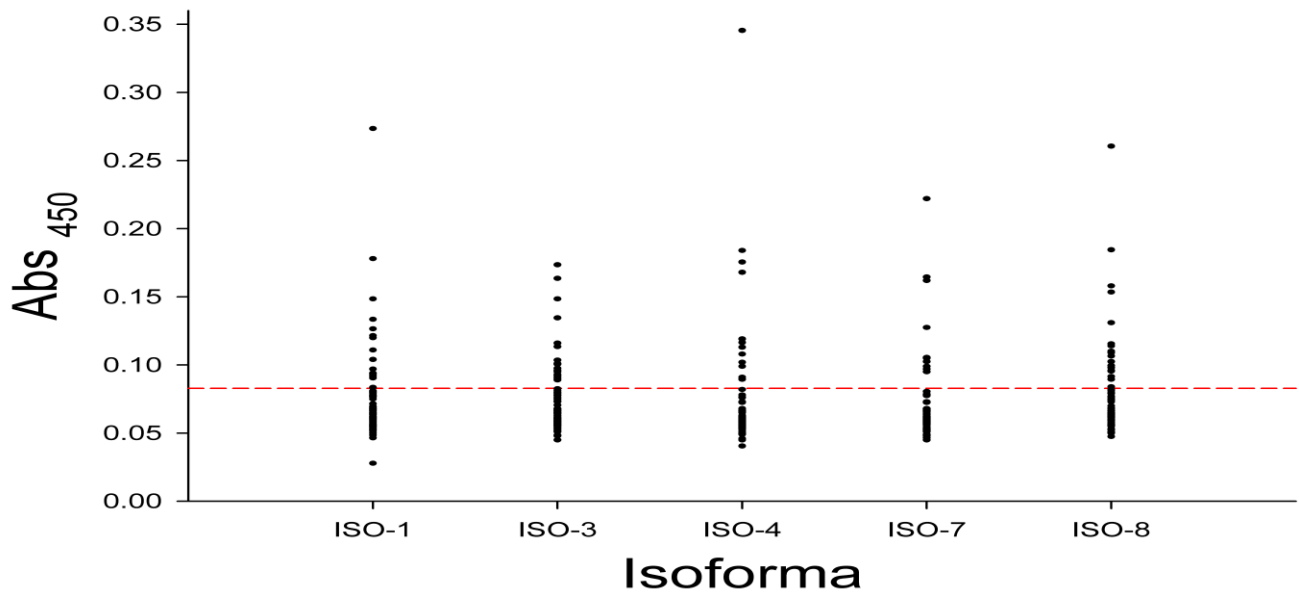
**Figura 21.** Pruebas cutáneas positivas para profilinas y otra fuente. Porcentaje de pacientes con pruebas cutáneas positivas para las profilinas de *A. palmeri* y al menos otra fuente alergénica. Se destaca que la isoforma rAmpa ISO-8 (barras en rojo) es la que se presenta una mayor prevalencia de reconocimiento para personas alérgicas al polen de diferentes plantas y que la isoforma rAmpa ISO-7 (barras en negro) es la de menor prevalencia.

Adicionalmente encontramos que el 45 % de los pacientes que tienen pruebas cutáneas positivas al polen de *A. palmeri* presentan IgE para al menos una de las cuatro isoformas, específicamente, el 27% para la isoforma rAmpa ISO-1 y rAmpa ISO4, el 18 % para rAmpa ISO-7 y el 36% con rAmpa ISO-8, lo que indica que la isoforma 8 podría ser uno de los principales alérgenos presentes en el polen de *A. palmeri* y probablemente un alérgeno relevante en la reactividad cruzada con otras fuentes.

#### **b) Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).**

Se realizaron ensayos de ELISA con las isoformas rAmpa ISO-1, rAmpa ISO-3, rAmpa ISO-4, rAmpa ISO-7 y rAmpa ISO-8 utilizando 83 sueros de pacientes alérgicos, 56 de estos obtenidos de los hospitales en donde se realizó el estudio de prevalencia a profilinas recombinantes de *A. palmeri*. El resto de los sueros (27) fueron obtenidos de pacientes con prueba cutánea positiva a pastos, árboles, polen y/o malezas y negativa para *A. palmeri*.

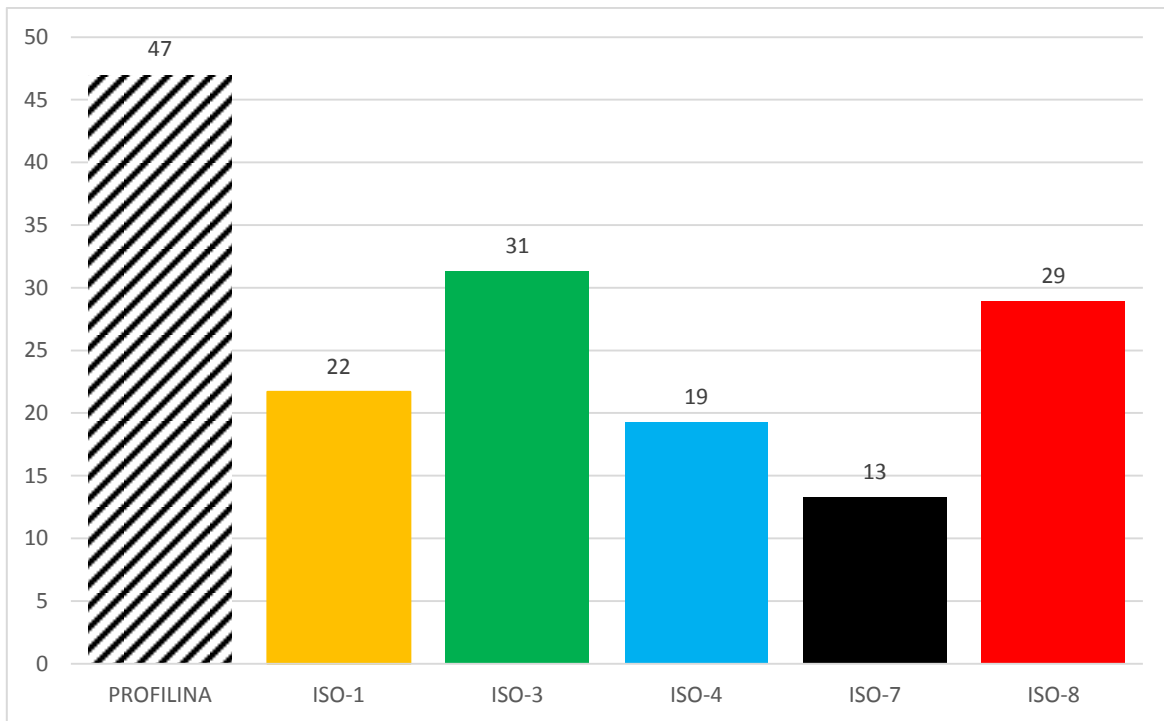
Los resultados muestran que 39 sueros de pacientes (47%) tienen IgE's que reconocen al menos una de las cinco profilinas recombinantes (Figura 22). La isoforma 3 fue reconocida por 26 sueros lo que representa el 31% de todos los pacientes y un 67% dentro de las profilinas, es decir, de los 39 sueros que reconocen a cualquiera de las cinco profilinas, 26 reconocen a la isoforma 3. En segundo lugar de alergenicidad se encontró a la isoforma 8 con 24 sueros, representando un 29%. La isoforma 1 es reconocida por 18 sueros representando un 22 %, La isoforma 4 es reconocida por 16 sueros y la isoforma 7 por 11, lo que representa un 19 y 13 % respectivamente (Tabla 10) (Figura 23). Cabe mencionar que pocos sueros fueron mono sensibilizados para una sola isoforma de profilina, es decir, la mayoría de los sueros reconocieron a más de una isoforma, esto es algo característico para las profilinas debido a la alta conservación de la secuencia que da su alta reactividad cruzada, de hecho nueve sueros reconocieron a las cinco isoformas.



**Figura 22.** ELISA de suero de pacientes. Se muestran los resultados para los ensayos de ELISA de los 83 sueros de pacientes (eje Y) con cada una de las profilinas recombinantes (eje X). La línea punteada, indica el corte de positividad para el ensayo, la cual está formada por los controles negativos más tres desviaciones estándar. Los puntos que están por encima de la línea punteada fueron tomados como positivos para su profilina correspondiente.

Isoforma	Sueros Positivos	Porcentaje	% profilinas	
<b>ISO-1</b>	18/83	22	18/39	46
<b>ISO-3</b>	26/83	31	26/39	67
<b>ISO-4</b>	16/83	19	16/39	41
<b>ISO-7</b>	11/83	13	11/39	28
<b>ISO-8</b>	24/83	29	24/39	62
<b>ISO-1,3,4,7 y/o 8</b>	39/83	47	39/39	100

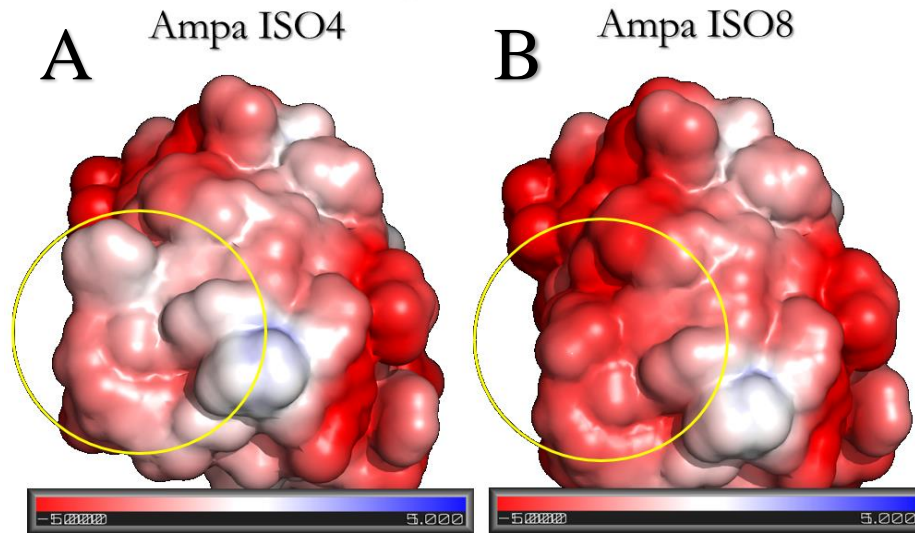
**Tabla 10.** Suero de pacientes analizados por ELISA. La tabla nos indica el número y porcentaje de sueros positivos para cada isoforma analizada. Las dos últimas columnas nos indican el número y porcentaje de sueros positivos que contribuyen cada isoforma para los 39 sueros positivos.



**Figura 23.** Porcentaje de sueros positivos por isoforma. Se graficó en el eje Y el porcentaje de sueros positivos contra el eje X que representa cada isoforma. La primera barra indica el porcentaje de sueros positivo para al menos una isoforma de profilina recombinante. La profilinas con mayor porcentaje de reconocimiento es la rAmpa ISO-3 seguida de la isoforma rAmpa ISO-8. La isoforma rAmpa ISO-7 fue la menos reconocida.

Los ensayos de ELISA nos indican que la isoforma 3 (isoforma larga de 133 aminoácidos) es la más alergénica con reconocimiento del 31%. La profilina menos alergénica es la isoforma 7 y en segundo lugar la isoforma 4 con 13 y 19 % respectivamente. Estos resultados nos sugieren que se debe realizar un análisis detallado de los cambios en la estructura tridimensional y potencial de superficie de cada una de las isoformas para explicar con mayor precisión el fenómeno de alergenicidad y reactividad cruzada que presentan las profilinas del polen de *A. palmeri*, tomando en cuenta que la divergencia entre estas isoformas de profilinas es de no más de 20 aminoácidos entre las isoformas más divergente. más divergentes. Con lo anterior se proponen a las isoformas 3 y 8 como los principales alérgenos presentes en el polen de *A. palmeri* y por otra parte a las isoformas 4 y 7 como posibles candidatos para realizar vacunación de pacientes alérgicos a profilinas de distintas fuentes.

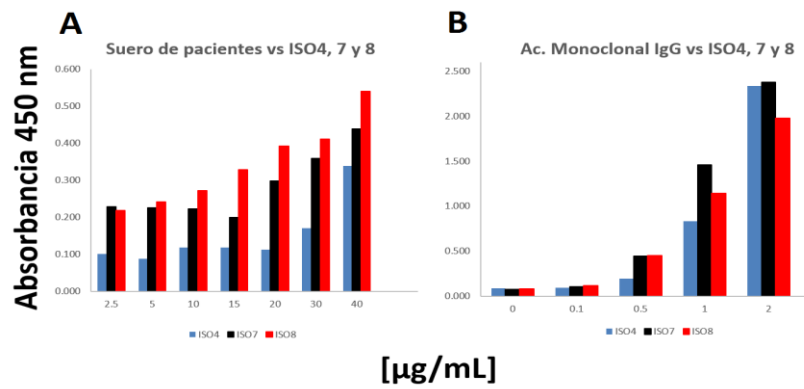
Mediante análisis *in silico* se proponen algunos cambios en aminoácidos relevantes para la alergenicidad de la proteína, como es el caso del cambio R99Q entre las isoformas 4 y 8 respectivamente (Figura 24)



**Figura 24.** Potencial de superficie de las Isoformas 4 y 8. En el panel A se muestra el potencial de superficie para la ISO-4 y en el panel B para la ISO-8. Los círculos resaltan el cambio de carga en la superficie siendo neutra para la ISO-4 y negativa para la ISO-8.

La isoforma 8 es más reconocida tanto por las IgE's del suero individual de pacientes como por el "pool" de sueros con respecto a las isoformas 4 y 7 (Figura 25A). Adicionalmente, se realizó ensayos de ELISA de estas mismas isoformas con un anticuerpo monoclonal de tipo IgG contra la profilina 4 del polen de *A. thaliana* mostrando un reconocimiento diferencial entre la isoforma 4 y 8, lo que hace pensar en la presencia de epítopes diferenciales entre anticuerpos de tipo IgE e IgG (Figura 25B).





**Figura 25.** Ensayo de ELISA con pool de suero y anticuerpo monoclonal. En ambos gráficos se muestra en eje Y absorción a 450 nm y en eje X concentración en µg/mL. **A.** El reconocimiento del pool de sueros de pacientes se observa mayor para la isoforma 8. **B.** En términos generales se puede observar menor reconocimiento del anticuerpo IgG hacia la isoforma 8 dando a suponer la presencia de un epítopes que puede participar en el swich para la formación de las inmunoglobulinas de clase cadena Epsilon (IgE) o cadena gamma (IgG).

Este resultado nos indica la contribución de la arginina 99 en la disminución de la alergenicidad, permitiendo proponer la influencia de la carga positiva de dicho aminoácido, generando un cambio, al menos aparente, en el potencial de superficie de la proteína.

## CONCLUSIONES

El polen de *A. palmeri* es una importante fuente alérgica en la Ciudad de México y área metropolitana y probablemente la profilina de este polen es uno de los principales alérgenos presentes de esta planta. Las prevalencias reportadas hasta el día de hoy, en donde incluyen a *A. palmeri* como fuente alérgica, muestran que el polen de dicha planta presenta prevalencias significativas, tal vez por su naturaleza de maleza, ornato o como base en la dieta de algunas poblaciones rurales y no rurales del país. Por otra parte, estudios de monitoreo de aire realizados por la Red Mexicana de Aerobiología (REMA) en el Distrito Federal y área metropolitana indican que el polen de la familia *Amaranthaceae* se encuentra en concentraciones bajas; sin embargo está presente durante todo el año, con excepción del mes de Febrero. Esto apunta a la relevancia clínica de estos alérgenos para los pacientes alérgicos tanto por su presencia como por la reactividad cruzada entre las familias *Amaranthaceae/Chenopodiaceae*.

Las pruebas cutáneas se realizaron con cuatro profilinas de las ocho clonadas provenientes del polen de *A. palmeri*, inclusive algunas de ellas presentes en otro estadio de la plántula (resultados no mostrados). El análisis mediante prueba cutánea de las diferentes isoformas nos muestra la diferencia en alergenidad entre cada una de ellas, lo cual es reforzado con los análisis de ELISA para los mismos sueros de pacientes.

Basado en lo anterior, este trabajo nos permite proponer a las Isoformas 3 y 8 como los principales alérgenos presentes en el polen de *A. palmeri* y a las isoformas 4 y 7 como candidatas importantes para la desensibilización de pacientes alérgicos a profilinas de distintas fuentes además de abrir nuevas líneas de investigación sobre epítopes presentes en profilinas y la contribución de las cargas laterales de los aminoácidos que conforman estos epítopes para evitar la interacción con su parátipe correspondiente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RW, Pickup J. *Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene*: Clin Exp Allergy 2006.
2. Holgate ST. Science, medicine, and the future. Allergic disorders. *Bmj*. 2000;320(7229):231-234.
3. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(1):30-37.
4. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(2):109-113.
5. López PG MM, Huerta. LJ, Mejía CF y col. . Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México. . *Rev Alerg Mex*. 2009;56(3):72-79.
6. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62(9):758-766.
7. Committee IS. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *The European respiratory journal*. 1998;12(2):315-335.
8. Montero Vega MT. New aspects on inflammation in allergic diseases. *Allergologia et immunopathologia*. 2006;34(4):156-170.
9. Aguilar Angeles D, Serrano Miranda E, Rojo Gutierrez MI, Bermejo Guevara MA, Estrada Parra S. [Th1 and Th2 lymphocytes in perennial allergic rhinitis]. *Revista alergía Mexico*. 2006;53(3):85-88.
10. Koscher V, Milhe F, El Biaze M, Vervloet D, Magnan A. Variation of T-cell activation in allergic subjects during natural pollen exposure. *Allergy*. 2006;61(1):35-42.
11. Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy*. 2006;61(1):3-14.
12. Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(2):305-318; quiz 319-320.

13. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(6):1277-1284.
14. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(2):331-336.
15. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(6):1214-1225; quiz 1226.
16. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature reviews. Immunology*. 2006;6(3):218-230.
17. Morar N, Willis-Owen SA, Moffatt MF, Cookson WO. The genetics of atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(1):24-34; quiz 35-26.
18. Reed CE. The natural history of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(3):543-548; quiz 549-550.
19. Condemi JJ DS, Bielory L, Burks AW, Fischer JT, Ledford KD, et al. . Ambiente interior y ambiente exterior. *Alergia e inmunología*. Vol Segunda edición2003:96-107.
20. Maj A CA, Moin M, Gholami M, Kohno S, Nabe T, et al. . The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollens grains. *Aerobiología*. 2004;20:111-118.
21. Solomon WR. Aerobiology of pollinosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1984;74(4 Pt 1):449-461.
22. White JF, Bernstein DI. Key pollen allergens in North America. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2003;91(5):425-435; quiz 435-426, 492.
23. Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(1):51-56.
24. D'Amato G, Spiekma FT, Liccardi G, et al. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy*. 1998;53(6):567-578.

25. Garcia-Ortega P, Bartolome B, Enrique E, Gaig P, Richart C. Allergy to *Diplotaxis erucoides* pollen: occupational sensitization and cross-reactivity with other common pollens. *Allergy*. 2001;56(7):679-683.
26. Kerkhof M, Postma DS, Schouten JP, de Monchy JG. Allergic sensitization to indoor and outdoor allergens and relevance to bronchial hyperresponsiveness in younger and older subjects. *Allergy*. 2003;58(12):1261-1267.
27. Jesús Márquez JAS-C, María Suárez-Cervera. Allergenic and antigenic proteins released in the apertural sporoderm during the activation process in grass pollen grains. . *Sexual Plant Reproduction*. 1997;10(5):269-278.
28. Lopez Campos C, Rincon Castaneda CB, Borja Aburto V, et al. [Respiratory function in allergic asthmatic children and its relation to the environmental pollen concentration]. *Revista alergía Mexico*. 2003;50(4):129-146.
29. Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(2):414-420.
30. Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of molecular biology*. 1977;115(3):465-483.
31. Reichstein E, Korn ED. Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation. *The Journal of biological chemistry*. 1979;254(13):6174-6179.
32. Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M. The profile of profilins. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2007;159:131-149.
33. Valenta R, Duchene M, Breitenbach M, et al. A low molecular weight allergen of white birch (*Betula verrucosa*) is highly homologous to human profilin. *International archives of allergy and applied immunology*. 1991;94(1-4):368-370.
34. Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in cell biology*. 2004;14(8):461-469.
35. Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in cell biology*. 2004;14(7):386-394.

36. Haarer BK, Brown SS. Structure and function of profilin. *Cell motility and the cytoskeleton*. 1990;17(2):71-74.
37. Valster AH, Vidali L, Hepler PK. Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. *Protoplasma*. 2003;222(1-2):85-95.
38. Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(7):3832-3836.
39. Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M. Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell*. 1994;79(2):303-314.
40. Janke J, Schluter K, Jandrig B, et al. Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(10):1675-1686.
41. Roy P, Jacobson K. Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2004;57(2):84-95.
42. Zou L, Jaramillo M, Whaley D, et al. Profilin-1 is a negative regulator of mammary carcinoma aggressiveness. *British journal of cancer*. 2007;97(10):1361-1371.
43. Zou L, Hazan R, Roy P. Profilin-1 overexpression restores adherens junctions in MDA-MB-231 breast cancer cells in R-cadherin-dependent manner. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2009;66(12):1048-1056.
44. Wittenmayer N, Jandrig B, Rothkegel M, et al. Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(4):1600-1608.
45. Kondo T, Shirasawa T, Itoyama Y, Mori H. Embryonic genes expressed in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience letters*. 1996;209(3):157-160.
46. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 1991;253(5019):557-560.

47. Valenta R, Duchene M, Ebner C, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(2):377-385.
48. Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, et al. Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 2001;756(1-2):315-325.
49. Fernandez Rivas M. [Cross-reactivity between fruit and vegetables]. *Allergologia et immunopathologia*. 2003;31(3):141-146.
50. Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, et al. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2011;106(5):429-435.
51. Carlsson L NL, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. . *Profilin, a low-molecular weight protein controlling actin polymerisability*. . Amsterdam: North Holland Publishing; 1976.
52. Blasco R, Cole NB, Moss B. Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *Journal of virology*. 1991;65(9):4598-4608.
53. Bitko V, Oldenburg A, Garmon NE, Barik S. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC microbiology*. 2003;3:9.
54. Burke E, Mahoney NM, Almo SC, Barik S. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *Journal of virology*. 2000;74(2):669-675.
55. Zeile WL, Condit RC, Lewis JI, Purich DL, Southwick FS. Vaccinia locomotion in host cells: evidence for the universal involvement of actin-based motility sequences ABM-1 and ABM-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13917-13922.
56. Polet D, Lambrechts A, Vandepoele K, Vandekerckhove J, Ampe C. On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins. *FEBS letters*. 2007;581(2):211-217.

57. Braun A, Aszodi A, Hellebrand H, Berna A, Fassler R, Brandau O. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene*. 2002;283(1-2):219-225.
58. Arasada R, Gloss A, Tunggal B, et al. Profilin isoforms in Dictyostelium discoideum. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(5):631-641.
59. Polet D, Lambrechts A, Ono K, et al. Caenorhabditis elegans expresses three functional profilins in a tissue-specific manner. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2006;63(1):14-28.
60. Lambrechts A, Braun A, Jonckheere V, et al. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8209-8219.
61. Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 21:3795-3803.
62. Cooley L, Verheyen E, Ayers K. chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. *Cell*. 1992;69(1):173-184.
63. Honore B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS letters*. 1993;330(2):151-155.
64. Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. Differentially expressed genes in hemocytes of Vibrio harveyi-challenged shrimp Penaeus monodon. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2006;39(1):26-36.
65. Machesky LM, Cole NB, Moss B, Pollard TD. Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*. 1994;33(35):10815-10824.
66. Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1359(2):97-109.
67. Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y. Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Experimental nephrology*. 2001;9(4):265-274.



68. Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C. Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Molecular human reproduction*. 2005;11(1):53-64.
69. Tanaka H, Iguchi N, Egidio de Carvalho C, Tadokoro Y, Yomogida K, Nishimune Y. Novel actin-like proteins T-ACTIN 1 and T-ACTIN 2 are differentially expressed in the cytoplasm and nucleus of mouse haploid germ cells. *Biology of reproduction*. 2003;69(2):475-482.
70. Tilney LG, Bonder EM, Coluccio LM, Mooseker MS. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *The Journal of cell biology*. 1983;97(1):112-124.
71. Huang S, McDowell JM, Weise MJ, Meagher RB. The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant physiology*. 1996;111(1):115-126.
72. Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB. Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2002;52(1):22-32.
73. Jeong YM, Mun JH, Lee I, Woo JC, Hong CB, Kim SG. Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profilin gene family members. *Plant physiology*. 2006;140(1):196-209.
74. Christensen HE, Ramachandran S, Tan CT, Surana U, Dong CH, Chua NH. Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1996;10(2):269-279.
75. McKinney EC, Kandasamy MK, Meagher RB. Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isoform, PRF1, alter seedling development. *The Plant cell*. 2001;13(5):1179-1191.
76. Wang Z, Guo CQ, Ren HY. [Profilins in plant cells]. *Zhi wu sheng li yu fen zi sheng wu xue xue bao = Journal of plant physiology and molecular biology*. 2006;32(3):261-270.
77. Van Damme D, Bouget FY, Van Poucke K, Inze D, Geelen D. Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2004;40(3):386-398.

78. Marmagne A, Ferro M, Meinnel T, et al. A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6(11):1980-1996.
79. Zybaïlov B, Rutschow H, Friso G, et al. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PloS one*. 2008;3(4):e1994.
80. Davis AJ, Im YJ, Dubin JS, Tomer KB, Boss WF. Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 binds F-actin and recruits phosphatidylinositol 4-kinase beta1 to the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(19):14121-14131.
81. Deeks MJ, Cvrckova F, Machesky LM, et al. Arabidopsis group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *The New phytologist*. 2005;168(3):529-540.
82. Ito J, Batth TS, Petzold CJ, et al. Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *Journal of proteome research*. 2011;10(4):1571-1582.
83. Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E. DNA array analyses of Arabidopsis thaliana lacking a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2004;40(5):752-771.
84. Kandasamy MK, Burgos-Rivera B, McKinney EC, Ruzicka DR, Meagher RB. Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with actin in the regulation of plant development. *The Plant cell*. 2007;19(10):3111-3126.
85. Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S. Proteome mapping of mature pollen of Arabidopsis thaliana. *Proteomics*. 2005;5(18):4864-4884.
86. Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant physiology*. 2008;148(3):1201-1211.
87. Noir S, Brautigam A, Colby T, Schmidt J, Panstruga R. A reference map of the Arabidopsis thaliana mature pollen proteome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(4):1257-1266.

88. Becker JD, Boavida LC, Carneiro J, Haury M, Feijo JA. Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant physiology*. 2003;133(2):713-725.
89. Wellmer F, Riechmann JL, Alves-Ferreira M, Meyerowitz EM. Genome-wide analysis of spatial gene expression in Arabidopsis flowers. *The Plant cell*. 2004;16(5):1314-1326.
90. Schmid M, Davison TS, Henz SR, et al. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature genetics*. 2005;37(5):501-506.
91. Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *International archives of allergy and immunology*. 1992;97(4):287-294.
92. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;964:47-68.
93. Wiedemann P, Giehl K, Almo SC, et al. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(47):29915-29921.
94. Kursula I, Kursula P, Ganter M, Panjekar S, Matuschewski K, Schuler H. Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure*. 2008;16(11):1638-1648.
95. Domke T, Federau T, Schluter K, et al. Birch pollen profilin: structural organization and interaction with poly-(L-proline) peptides as revealed by NMR. *FEBS letters*. 1997;411(2-3):291-295.
96. Metzler WJ, Farmer BT, 2nd, Constantine KL, Friedrichs MS, Lavoie T, Mueller L. Refined solution structure of human profilin I. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995;4(3):450-459.
97. Verdino P, Barderas R, Villalba M, et al. Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *Journal of immunology*. 2008;180(4):2313-2321.

98. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*. 1997;5(1):33-45.
99. Liu S, Fedorov AA, Pollard TD, Lattman EE, Almo SC, Magnus KA. Crystal packing induces a conformational change in profilin-I from *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of structural biology*. 1998;123(1):22-29.
100. Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt CE. X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *Journal of molecular biology*. 1999;294(5):1271-1285.
101. Thorn KS, Christensen HE, Shigeta R, et al. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*. 1997;5(1):19-32.
102. Eads JC, Mahoney NM, Vorobiev S, et al. Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry*. 1998;37(32):11171-11181.
103. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 1996;87(2):227-239.
104. Reinhard M, Giehl K, Abel K, et al. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *The EMBO journal*. 1995;14(8):1583-1589.
105. Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, et al. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *The EMBO journal*. 1998;17(4):967-976.
106. Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, et al. Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;243(1):86-89.
107. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, et al. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(53):37908-37914.

108. Skare P, Karlsson R. Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS letters*. 2002;522(1-3):119-124.
109. Chik JK, Lindberg U, Schutt CE. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 1996;263(4):607-623.
110. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, Lindberg U. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*. 1993;365(6449):810-816.
111. Schutt CE, Rozycki MD, Chik JK, Lindberg U. Structural studies on the ribbon-to-helix transition in profilin: actin crystals. *Biophysical journal*. 1995;68(4 Suppl):12S-17S; discussion 17S-18S.
112. Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*. 1985;314(6010):472-474.
113. Bhargavi V, Chari VB, Singh SS. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochemistry and molecular biology international*. 1998;46(2):241-248.
114. Mahoney NM, Rozwarski DA, Fedorov E, Fedorov AA, Almo SC. Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nature structural biology*. 1999;6(7):666-671.
115. Gareus R, Di Nardo A, Rybin V, Witke W. Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(5):2803-2811.
116. Mondin M, Carta M, Normand E, Mulle C, Coussen F. Profilin II regulates the exocytosis of kainate glutamate receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(51):40060-40071.
117. McCaffery CA, DeGennaro LJ. Determination and analysis of the primary structure of the nerve terminal specific phosphoprotein, synapsin I. *The EMBO journal*. 1986;5(12):3167-3173.
118. Wear MA, Schafer DA, Cooper JA. Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Current biology : CB*. 2000;10(24):R891-895.

119. Lu J, Pollard TD. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(4):1161-1175.
120. Sohn RH, Chen J, Koblan KS, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(36):21114-21120.
121. Gibbon BC, Zonia LE, Kovar DR, Hussey PJ, Staiger CJ. Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *The Plant cell*. 1998;10(6):981-993.
122. Laffer S, Vrtala S, Duchene M, et al. IgE-binding capacity of recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1994;94(1):88-94.
123. De Canio M, D'Aguanno S, Sacchetti C, et al. Novel IgE recognized components of *Lolium perenne* pollen extract: comparative proteomics evaluation of allergic patients sensitization profiles. *Journal of proteome research*. 2009;8(9):4383-4391.
124. Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, et al. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;101(2 Pt 1):196-206.
125. Wopfner N, Gadermaier G, Egger M, et al. The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen. *International archives of allergy and immunology*. 2005;138(4):337-346.
126. Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, et al. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*. 2006;61(1):128-135.
127. Pahr S, Constantin C, Mari A, et al. Molecular characterization of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2012;42(4):597-609.
128. Wopfner N, Gruber P, Wallner M, et al. Molecular and immunological characterization of novel weed pollen pan-allergens. *Allergy*. 2008;63(7):872-881.
129. Martinez A, Asturias JA, Monteseirin J, et al. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy*. 2002;57 Suppl 71:17-23.

130. Razna K, Bezo M, Nikolaieva N, Garkava K, Brindza J, Ziarovska J. Variability of *Corylus avellana*, L. CorA and profilin pollen allergens expression. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 2014;49(9):639-645.
131. Niederberger V, Pauli G, Gronlund H, et al. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(4 Pt 1):579-591.
132. Hirschwehr R, Jager S, Horak F, et al. Allergens from birch pollen and pollen of the European chestnut share common epitopes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1993;23(9):755-761.
133. Vallverdu A, Garcia-Ortega P, Martinez J, et al. *Mercurialis annua*: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *International archives of allergy and immunology*. 1997;112(4):356-364.
134. Vallverdu A, Asturias JA, Arilla MC, et al. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;101(3):363-370.
135. Varasteh AR, Moghadam M, Vahedi F, Kermani T, Sankian M. Cloning and expression of the allergen Cro s 2 profilin from saffron (*Crocus sativus*). *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2009;58(3):429-435.
136. Belchi-Hernandez J, Moreno-Grau S, Sanchez-Gascon F, et al. Sensitization to *Zygophyllum fabago* pollen. A clinical and immunologic study. *Allergy*. 1998;53(3):241-248.
137. Asturias JA, Arilla MC, Aguirre M, et al. Quantification of profilins by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Journal of immunological methods*. 1999;229(1-2):61-71.
138. Garcia-Gonzalez JJ, Bartolome-Zavala B, Del Mar Trigo-Perez M, et al. Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29(9):1265-1275.

139. Focke M, Hemmer W, Valenta R, Gotz M, Jarisch R. Identification of oilseed rape (*Brassica napus*) pollen profilin as a cross-reactive allergen. *International archives of allergy and immunology*. 2003;132(2):116-123.
140. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;95(5 Pt 1):962-969.
141. Fritsch R, Ebner C, Kraft D. Allergenic crossreactivities. Pollens and vegetable foods. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1997;15(4):397-404.
142. van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *International archives of allergy and immunology*. 1992;98(2):97-104.
143. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2006;36(7):920-929.
144. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(1):141-147.
145. Fernandez-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29(9):1239-1247.
146. Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;100(6 Pt 1):728-733.
147. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(10):1403-1410.
148. Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *International archives of allergy and immunology*. 1998;116(2):83-92.



149. Reyes L. C. A. S RRA. Características bioquímicas y moleculares de alérgenos de látex de *Hevea brasiliensis*. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*. 2002;11(3):92-100.
150. Mazon A, Nieto A, Linana JJ, Montoro J, Estornell F, Garcia-Ibarra F. Latex sensitization in children with spina bifida: follow-up comparative study after two years. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2000;84(2):207-210.
151. Nieto A. MA, Pamies R. et al. . Espina bífida y alergia al látex. . In: Blanco Coverra C QGSe, ed. *Alergia al látex 2002*. Barcelona: MRA Editions: Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica.; 2002.
152. Singh AB, Dahiya P. Antigenic and allergenic properties of *Amaranthus Spinous* pollen--a commonly growing weed in India. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2002;9(2):147-151.
153. Song JJ ZHaLZ. Cloning of panallergen profilin from pollen and leaves of *Amaranthus viridis* L. . College of Life Science Institute of Allergy and Immunology; 2007.
154. Tehrani M SM, Assarehzadegan MA, Jabbari F and Varasteh A. . Cloning, Expression and Purification of *Amaranthus retroflexus* Pollen Allergen, *Ama r 2*. Immunobiochemistry: Aviccena Research Institute, Immunology Research Center.
155. Ortega-Martell JA H-HR, Huerta-López J. . Vacunas terapéuticas para enfermedades alérgicas. *Alerg. Asma Inmunol. Pedia*. 2002;11:106.
156. Huggins JL, Looney RJ. Allergen immunotherapy. *American family physician*. 2004;70(4):689-696.
157. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*. 2006;6(10):761-771.
158. Varney VA, Hamid QA, Gaga M, et al. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(2):644-651.
159. Niederberger V, Horak F, Vrtala S, et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101 Suppl 2:14677-14682.

160. Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327-1333.
161. Westritschnig K, Linhart B, Focke-Tejkl M, et al. 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. *Journal of immunology*. 2007;179(11):7624-7634.
162. Korupolu RV, Achary MS, Aneesa F, et al. Profilin oligomerization and its effect on poly (L-proline) binding and phosphorylation. *International journal of biological macromolecules*. 2009;45(3):265-273.

## APÉNDICE

Profilinas de distintas fuentes reportadas como alergénicas. Tabla generada con los datos depositados en la base de datos del allergome hasta el 25 de junio del 2014.

<http://www.allergome.org>

Nomenclatura	Nombre común de la fuente	Código allergome
<a href="#">Act d 9.0101</a>	<i>Actinidia deliciosa</i> , <i>Actinidiaceae</i> , Chinese Gooseberry, Green Kiwi, Plants, Yangtao	5741
<a href="#">Ama r 2.0101</a>	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , Careless Weed, Plants, Redroot Amaranth, Redroot Pigweed, Spiny Amaranth	8184
<a href="#">Ama v 2.0101</a>	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , Plants, Slender Amaranth	9449
<a href="#">Ama v 2.0201</a>	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , Plants, Slender Amaranth	9450
<a href="#">Amb a 8.0101</a>	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , <i>Ambrosia elatior</i> , <i>Asteraceae</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Short Ragweed	2536
<a href="#">Amb a 8.0102</a>	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , <i>Ambrosia elatior</i> , <i>Asteraceae</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Short Ragweed	2537
<a href="#">Ana c 1.0101</a>	<i>Ananas comosus</i> , <i>Bromeliaceae</i> , Pineapple, Plants	3075
<a href="#">Api g 4.0101</a>	<i>Apiaceae</i> , <i>Apium graveolens</i> , Celeriac, Celery, Plants	5996
<a href="#">Ara h 5.0101</a>	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Fabaceae</i> , Groundnut, Legumes, Peanut, Plants	3097
<a href="#">Art v 4.0101</a>	<i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Asteraceae</i> , English Mugwort, Mugwort/Ragweed-related Species, Plants	1652
<a href="#">Art v 4.0201</a>	<i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Asteraceae</i> , English Mugwort,	1653

	Mugwort/Ragweed-related Species, Plants	
<a href="#">Bet v 2.0101</a>	<i>Betula pendula</i> , <i>Betula verrucosa</i> , <i>Betulaceae</i> , Birch, Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Fagales</i> , Plants, Silver Birch	3136
<a href="#">Beta v 2.0101</a>	<i>Amaranthaceae</i> , Beetroot, <i>Beta vulgaris</i> , Common Beet, Plants	5815
<a href="#">Cap a 2.0101</a>	Bellpepper, <i>Capsicum annuum</i> , Paprika, Plants, <i>Solanaceae</i>	3177
<a href="#">Che a 2.0101</a>	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Chenopodium album</i> , Goosefoot, Lamb's-quarters, Plants	3189
<a href="#">Cit s 2.0101</a>	<i>Citrus sinensis</i> , Plants, <i>Rutaceae</i> , Sweet Orange	3200
<a href="#">Cor a 2.0101</a>	Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Corylaceae</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i> , Hazelnut, Plants	3217
<a href="#">Cor a 2.0102</a>	Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Corylaceae</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i> , Hazelnut, Plants	3218
<a href="#">Cro s 2.0101</a>	<i>Crocus sativus</i> , <i>Iridaceae</i> , Plants, Saffron, Saffron Crocus	3222
<a href="#">Cuc m 2.0101</a>	Cantaloupe, <i>Cucumis melo</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , Muskmelon, Plants	3230
<a href="#">Cyn d 12.0101</a>	Bermuda grass, <i>Cynodon dactylon</i> , Grasses, <i>Panicum dactylon</i> , Plants, <i>Poaceae</i>	3233
<a href="#">Dau c 4.0101</a>	<i>Apiaceae</i> , Carrot, Carrots, <i>Daucus carota</i> , Plants	3245
<a href="#">Fra a 4.0101</a>	<i>Fragaria ananassa</i> , Plants, <i>Rosaceae</i> , Strawberry	3287
<a href="#">Gly m 3.0101</a>	<i>Fabaceae</i> , <i>Glycine hispida</i> , <i>Glycine max</i> , Legumes, Plants, Soy, Soyabean	373
<a href="#">Gly m 3.0102</a>	<i>Fabaceae</i> , <i>Glycine hispida</i> , <i>Glycine max</i> , Legumes, Plants, Soy, Soyabean	374
<a href="#">Hel a 2.0101</a>	<i>Asteraceae</i> , <i>Helianthus annuus</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Sunflower	3307

<a href="#">Hev b 8.0101</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	398
<a href="#">Hev b 8.0102</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	399
<a href="#">Hev b 8.0201</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	400
<a href="#">Hev b 8.0202</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	401
<a href="#">Hev b 8.0203</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	402
<a href="#">Hev b 8.0204</a>	<i>Euphorbiaceae, Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	403
<a href="#">Hor v 12.0101</a>	Barley, Grasses, <i>Hordeum sativum</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , Plants, <i>Poaceae</i>	3327
<a href="#">Hum j 2</a>	<i>Cannabaceae, Humulus japonicus, Humulus scandens</i> , Japanese Hop, Plants	1693
<a href="#">Lit c 1.0101</a>	Lichee, Litchi, <i>Litchi chinensis</i> , Lychee, <i>Nephelium litchi</i> , Plants, <i>Sapindaceae</i>	3353
<a href="#">Mal d 4.0101</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2414
<a href="#">Mal d 4.0102</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2415
<a href="#">Mal d 4.0201</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2416
<a href="#">Mal d 4.0202</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2417
<a href="#">Mal d 4.0301</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2418
<a href="#">Mal d 4.0302</a>	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2419
<a href="#">Man i 3.01</a>	<i>Anacardiaceae, Mangifera indica</i> , Mango, Plants	3782
<a href="#">Man i 3.02</a>	<i>Anacardiaceae, Mangifera indica</i> , Mango, Plants	3783

<a href="#">Mer a 1.0101</a>	Annual Mercury, <i>Euphorbiaceae</i> , <i>Mercurialis annua</i> , Plants	3375
<a href="#">Mus a 1.0101</a>	Banana, <i>Musa acuminata</i> , <i>Musa cavendishii</i> , <i>Musaceae</i> , Plants, Wild Banana	7633
<a href="#">Ole e 2.0101</a>	<i>Olea europaea</i> , <i>Oleaceae</i> , Olive Tree, Olive-related Species, Plants	3383
<a href="#">Ory s 12.0101</a>	Grasses, <i>Oryza sativa</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Rice	3395
<a href="#">Par j 3.0101</a>	Parietaria, <i>Parietaria diffusa</i> , <i>Parietaria judaica</i> , Pellitory, Plants, <i>Urticaceae</i>	511
<a href="#">Par j 3.0102</a>	Parietaria, <i>Parietaria diffusa</i> , <i>Parietaria judaica</i> , Pellitory, Plants, <i>Urticaceae</i>	512
<a href="#">Phl p 12.0101</a>	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3416
<a href="#">Phl p 12.0102</a>	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3490
<a href="#">Phl p 12.0103</a>	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3417
<a href="#">Pho d 2.0101</a>	<i>Arecaceae</i> , Date Palm, <i>Phoenix dactylifera</i> , Plants	3423
<a href="#">Pru av 4.0101</a>	Cherry, Plants, <i>Prunus avium</i> , <i>Rosaceae</i> , Sweet Cherry	3450
<a href="#">Pru du 4.0101</a>	Almond, Almond Tree, <i>Amygdalus communis</i> , Plants, <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Rosaceae</i>	3452
<a href="#">Pru du 4.0102</a>	Almond, Almond Tree, <i>Amygdalus communis</i> , Plants, <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Rosaceae</i>	3453
<a href="#">Pru p 4.0101</a>	<i>Amygdalus persica</i> , Nectarine, Peach, <i>Persica vulgaris</i> , Plants, <i>Prunus persica</i> , <i>Rosaceae</i>	737
<a href="#">Pru p 4.0201</a>	<i>Amygdalus persica</i> , Nectarine, Peach, <i>Persica vulgaris</i> , Plants, <i>Prunus persica</i> , <i>Rosaceae</i>	738
<a href="#">Pyr c 4.0101</a>	Pear, Plants, <i>Pyrus communis</i> , <i>Rosaceae</i>	3459

<a href="#">Sal k 4.0101</a>	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	8171
<a href="#">Sal k 4.0201</a>	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	8201
<a href="#">Sal k 4.0301</a>	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	10365
<a href="#">Sin a 4.0101</a>	Bird Rape, <i>Brassica alba</i> , <i>Brassicaceae</i> , Plants, <i>Sinapis alba</i> , Turnip, White Mustard	7637
<a href="#">Sola l 1.0101</a>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Lycopersicon lycopersicum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , Plants, <i>Solanaceae</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> , Tomato	3358
<a href="#">Tri a 12.0101</a>	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3498
<a href="#">Tri a 12.0102</a>	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3499
<a href="#">Tri a 12.0103</a>	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3500
<a href="#">Tri a 12.0104</a>	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	5901
<a href="#">Zea m 12.0101</a>	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3530
<a href="#">Zea m 12.0102</a>	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3531
<a href="#">Zea m 12.0103</a>	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3532
<a href="#">Zea m 12.0104</a>	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3538
<a href="#">Zea m 12.0105</a>	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3533

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: **Prevalencia de sensibilización al polen de *Amaranthus palmeri* y profilinas recombinantes del mismo**” registrado ante el H. Comité Local de Investigación con el número \_\_\_\_\_.

El objetivo de esta investigación es conocer la prevalencia en la sensibilización al polen del *Amaranthus palmeri*, profilinas del dicho polen y otras fuentes alergénicas en pacientes con alergia que residen en el Distrito Federal.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en aceptar la realización de pruebas cutáneas alergológicas específicas, por método de “skin prick”.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio. Los posibles efectos adversos son: edema local, prurito local y exacerbación de mis síntomas los cuales serán vigilados por el investigador y ocurren en menos del 1 % de los pacientes.

El investigador principal se ha comprometido a proporcionarme los resultados de la investigación y aclarar cualquier duda que le planteé acerca del procedimiento que se llevará a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier asunto relacionado con la investigación. Los resultados serán confidenciales

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto y sin alterar el tratamiento que debo recibir.

\_\_\_\_\_  
INVESTIGADOR PRINCIPAL

\_\_\_\_\_  
PACIENTE

\_\_\_\_\_  
TESTIGO

\_\_\_\_\_  
TESTIGO



## VÁLVULAS DE SEGURIDAD PARA EFECTOS ADVERSOS LOCALES Y/O SISTÉMICOS

### a) En caso de haber una reacción adversa local:

- ✓ Roncha y eritema local: Hidrocortisona en crema al 1% se colocará abarcando toda la superficie de las ronchas mayores a 3mm y/o que causen prurito, con un abatelenguas, justo después de la lectura.
- ✓ Prurito intenso, Síntomas de rinitis: Se dará por vía oral hidroxizina 10 mg en dosis única o bien Difenhidramina 30 mg IM , dando la recomendación de continuar con el medicamento en casa en caso de continuar con los síntomas.

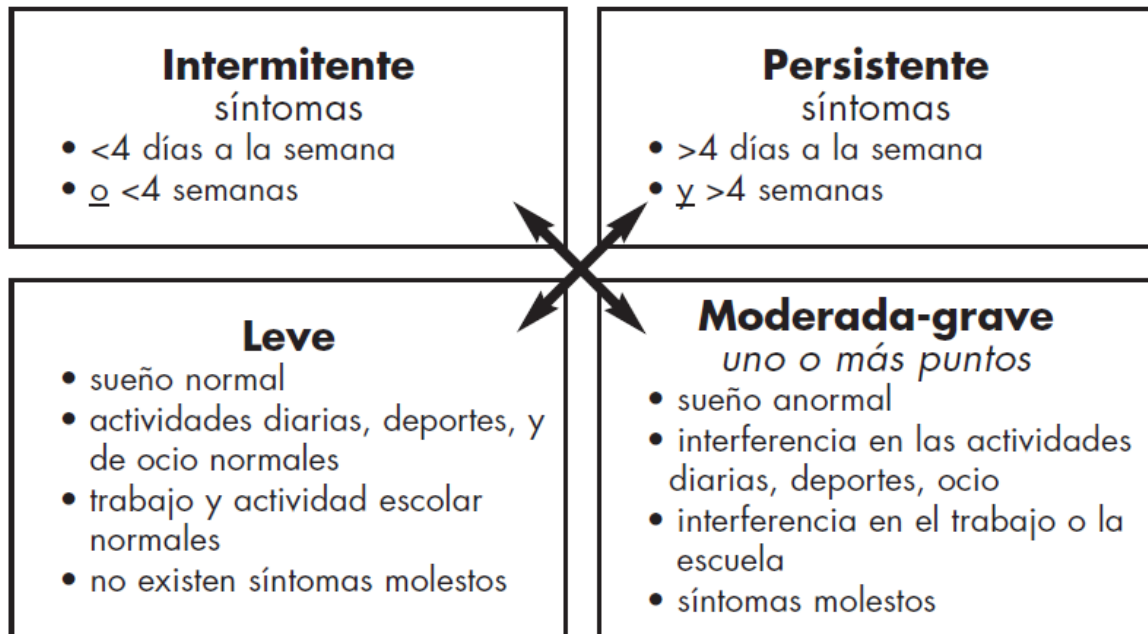
### b) En caso de presentar reacciones sistémicas:

- ✓ Exacerbación de síntomas bronquiales: Micronebulización con salbutamol 0.03-0.05 ml diluido en 3 ml de Sol. Salina y se valorará mejoría en caso de no haberla, se procederá a realizar una segunda a los 30 minutos checando la frecuencia cardiaca del paciente y una tercera en caso de no haber respuesta después de otros 30 minutos, se valorará por parte del investigador la necesidad de aplicar nebulizaciones alternas con pulmicort 1 ampula diluida en solución salina. En caso de una reacción severa se aplicará metilprednisona a dosis de 2-3 mg/kg.

### c) En caso de anafilaxia:

- ✓ Contaremos con carro rojo en el que habrá adrenalina y ésta se aplicará a dosis de 0.1 mg (IM) en caso necesario, tendremos preparado laringoscopio y cánulas orotraqueales y se procederá a intubación orotraqueal en caso de no haber respuesta a la aplicación de adrenalina y que presenta pérdida del estado de despierto, o datos de insuficiencia respiratoria.

## CLASIFICACIÓN DE RINITIS ALÉRGICA DE ACUERDO A ARIA 2008



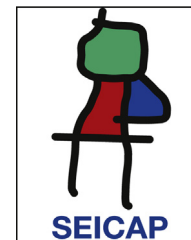
CLASIFICACIÓN DE SEVERIDAD DE ASMA DE ACUERDO A GINA 2007

	<b>Síntomas/Diurnos</b>	<b>Síntomas/Nocturnos</b>	<b>PEF o FEV<sub>1</sub></b>	<b>Variabilidad PEF</b>
<b>Intermitente</b>	< 1 vez a la semana Asintomático y PEF normal entre ataques	<= 2 veces al mes	>/= 80%	< 20%
<b>Leve Persistente</b>	> 1 vez a la semana pero < 1 vez al día Los ataques pueden afectar la actividad	> 2 veces al mes	>/= 80%	20-30%
<b>Moderado Persistente</b>	Diarios Los ataques afectan la actividad	> 1 vez a la semana	60% - 80%	> 30%
<b>Severo Persistente</b>	Continuos Actividad física limitada	Frecuentes	</= 60%	> 30%

# ANEXOS



**Allergologia et  
immunopathologia**  
Sociedad Española de Inmunología Clínica,  
Alergología y Asma Pediátrica  
[www.elsevier.es/ai](http://www.elsevier.es/ai)



ORIGINAL ARTICLE

## Major allergen from *Amaranthus palmeri* pollen is a profilin: Isolation, partial characterisation and IgE recognition

C.M. Landa-Pineda<sup>a</sup>, A. Arroyo-Becerra<sup>b</sup>, A. Rosas-Alvarado<sup>c</sup>, L.M. Terán<sup>d</sup>,  
M.L. Garcia-Cruz<sup>d</sup>, L.A. Marchat<sup>a,\*</sup>, C.A. Reyes-López<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ENMyH, IPN, México

<sup>b</sup> CIBA, IPN, México

<sup>c</sup> Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, HGM, México

<sup>d</sup> Departamento de Inmunogenética y Alergia, INER, México

Received 17 February 2015; accepted 7 May 2015

### KEYWORDS

Allergen;  
*Amaranthus palmeri*;  
Pollen;  
Profilin

### Abstract

**Background:** Pollens represent a rich source of proteins that are also potential elicitors of IgE-mediated pollen allergy. Sensitisation to panallergens could play an important role in diagnosis and specific immunotherapy, because these molecules are present in different plant pollens and plant foods and have marked structural similarity in different species. Profilins are one of the most common panallergens to be studied because they are responsible for a large number of sensitisations and are clearly related to cross-reactivity and co-sensitisation. This study aimed to isolate and characterise a new allergen of *Amaranthus palmeri* pollen and to determine its allergenicity.

**Methods:** *A. palmeri* pollen profilin was purified using poly-L-proline-Sepharose affinity chromatography followed by anion exchanger chromatography. Identification of purified protein was carried out by mass spectrometry. Specific IgE was estimated in sera of patients with positive skin prick test to *A. palmeri* pollen extract, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Principal findings:** Purified protein appeared as a single band at 14 kDa in SDS-PAGE gel. Mass spectrometric analysis of the gel band identified two highly conserved peptides corresponding to allergenic profilins from pollen of other plants. Sera from about 60% of allergic patients have IgE that recognises the purified *A. palmeri* protein.

**Conclusion:** A 14 kDa protein of *A. palmeri* pollen was purified and identified as allergenic profilin, which was recognised by sera from pollen allergic patients.

© 2015 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [lmarchat@gmail.com](mailto:lmarchat@gmail.com) (L.A. Marchat), [careyes@ipn.mx](mailto:careyes@ipn.mx) (C.A. Reyes-López).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.002>

0301-0546/© 2015 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Landa-Pineda CM, et al. Major allergen from *Amaranthus palmeri* pollen is a profilin: Isolation, partial characterisation and IgE recognition. Allergol Immunopathol (Madr). 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.002>

## Introduction

Allergy represents the most prevalent human disorder, affecting almost 30% of the population in developed and developing countries.<sup>1</sup> Allergic diseases include rhinoconjunctivitis, allergic asthma, and allergic dermatitis.<sup>1,2</sup> Allergic tissue inflammation can be mitigated by anti-inflammatory drugs and immunosuppressive agents, however, only allergen-specific immunotherapy is considered as an effective and efficient treatment, with long-lasting clinical effects and can prevent the progression of mild forms of allergy to severe manifestations.<sup>3</sup> Recently, genetically engineered hypoallergenic derivatives have been incorporated to desensitisation immunotherapy.<sup>4</sup> This strategy requires detailed molecular and immunological studies to identify and design hypoallergenic molecules that can be used in allergen-specific immunotherapy.<sup>3</sup>

Recent reports indicate that around half of allergic people present reactions to pollen allergens from different plants.<sup>5</sup> Furthermore, pollen-allergic patients frequently exhibit allergic symptoms after the ingestion of several kinds of plant-derived foods. This might be simply attributed to poly-sensitisation to different allergenic plants.<sup>6</sup> Another explanation for this phenomenon is the concept of IgE cross-reactivity between functional and structural related allergens, which are known as panallergens.

Panallergens are evolutionarily conserved, ubiquitous components of several complex sources of allergens, which usually act as minor allergens. However, their presence has important clinical implications in establishing the phenomenon of food-pollen cross-reactivity, in the interpretation of diagnostic tests and in the preparation of immunotherapy extracts.

One of the most studied pollen and plant-derived food panallergens is profilin, a well-known ubiquitous cytoskeleton protein that is highly conserved among eukaryotic cells. Binding sites and interacting motifs for different substrates have been characterised in many profilins, including plant proteins. In addition, secondary and tertiary structures of all profilins so far elucidated are amazingly similar. Profilins are involved in different molecular and cellular processes through binding to actin monomers,<sup>7</sup> actin-related proteins (ARPs), poly-L-proline (pLp) stretches,<sup>8</sup> and phosphatidylinositol lipids.<sup>9</sup> Profilin was recognised as an allergen for the first time in birch pollen.<sup>10</sup> Then, it was described as a relevant allergen in plant-derived foods, principally celery, carrot, peach, pear, apple, potato, tomato and pumpkin seed, which suggests that profilins could be responsible, at least in part, for cross-reactions between different allergens sources.<sup>5,11</sup>

Different clinical studies show that *Amaranthus palmeri* pollen is an important allergen source in the USA, Thailand and Mexico.<sup>12-14</sup> However, little is known about the clinically relevant allergens of this pollen.

To gain insights into the allergens of *A. palmeri* pollen, in this work we performed the isolation and purification of a profilin from pollen grains and evaluated its allergenic properties. Our results allowed the identification of four profilin isoforms in *A. palmeri* pollen and demonstrated their recognition by IgE from sera of *A. palmeri*-allergic people.

## Materials and methods

The study was approved by the Ethical Committee of the National School of Medicine and Homeopathy of National Polytechnic Institute, Mexico and was carried out in compliance with the guidelines of the Helsinki Declaration of 1975. Participants gave their written informed consent.

### Pollen extract preparation

Pollen from *A. palmeri* (purity higher than 95%), was purchased by *Antigenos Allergomex Distribuidora S.A. de C.V.*, Pollen was defatted by repeated changes of ethanol-acetone and diethyl ether. Defatted pollen (1 g) was suspended in 10 mL of 50 mM carbonate buffer (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA and 0.5 mM PMSF; pH 8.0) and shaken for 16 h at 4 °C. Pollen grains were separated by centrifugation at 10,000 × g for 15 min, the supernatant was filtered through a 0.22 μm pore size PVDF membrane (Millipore) and dialysed against 50 mM carbonate buffer pH 8.0. Total proteins in aqueous pollen extract were quantified using the BCA Protein Assay kit (Pierce, USA) and protein integrity was verified by SDS-PAGE.

### Chromatographic isolation of profilin isoforms

Profilin isoforms were purified by affinity chromatography using a poly-L-proline-Sepharose support. Briefly, protein extract was applied to a home-made pLp-Sepharose support at a flow rate of 0.5 mL/min. Unbound proteins were washed away with 50 mM carbonate buffer (20 column volumes), and 1 M guanidine hydrochloride (two volumes) in ultrapure water. Then, retained profilins were eluted with 4 M guanidine hydrochloride and dialysed against 50 mM carbonate buffer, pH 8.0. Finally, eluted proteins were fractionated through an anion exchange column (Mono Q<sup>TM</sup> GE Healthcare) coupled to a HPLC (1220 Infinity LC, Agilent Technologies) equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. Retained proteins were eluted with the same buffer containing 1 M NaCl. Each fraction was analysed by 16% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining to evaluate profilin homogeneity. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method.

### Immunodetection of profilin

*A. palmeri* pollen extract and profilin obtained from affinity-chromatography were separated by 16% SDS-PAGE and electro-transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore) using standard methods. Membranes were completely dried to block unoccupied sites and prevent nonspecific binding of antibodies. Then, membranes were incubated at room temperature for two hours with a monoclonal antibody against *Arabidopsis thaliana* profilin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (1:3000 dilution). After washing with PBS-Tween 0.05%, membranes were incubated for 1 h at room temperature with an anti-mouse-IgG-HRP antibody (BioLegend<sup>®</sup>) (1:5000 dilution). Finally, bound antibodies were detected using 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) as substrate.

## Profilin-specific monoclonal antibody binding

The main Mono Q fractions obtained from affinity chromatography fraction were analysed by ELISA. Briefly, immunoplates (Corning Inc.) were coated with 10 µg of protein per well diluted in coating buffer (0.05M carbonate bicarbonate buffer pH 9.6). Plates were incubated overnight at 4 °C, washed with PBS-Tween 0.25% and blocked with 5% blocking agent (BLOT-QuickBlocker®, Millipore) in PBS at 25 °C for 2 h. After washing with PBS-Tween solution, 100 µl of a monoclonal antibody against *A. thaliana* profilin (1:5000 dilution) were added in each well and incubated for one hour at room temperature. Plates were washed again and incubated for 1 h at room temperature with an anti-mouse-IgG-HRP antibody (1:5000 dilution). Chromogenic substrate was prepared by adding 50 µl of a tetramethylbenzidine (TMB) solution (6 mg/ml in dimethyl sulfoxide) and 1.5 µl of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 2.5 ml of 0.1 M sodium acetate (pH 5.5) solution. One hundred microlitres of the chromogenic substrate were added to each well. After 15 min of incubation in the dark, colour development was stopped by addition of 100 µl of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Optical density was read at 450 nm using an ELISA plate reader (Stat Fax 303+, Awareness Technology, Inc.).

## Profilin identification by mass spectrometry

Mono Q column fractions that were detected as positive in the ELISA experiment described above, were first analysed by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA, USA). Because this experiment failed to identify protein (see below), proteins were then identified by mass spectrometry. For this, other aliquots of Mono Q fractions were submitted to 16% SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Bands corresponding to about 14 kDa, which is the expected molecular weight for profilin, were manually excised from polyacrylamide gel with a sterile scalpel. Gel pieces were washed twice with 50% (v/v) acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) for 15 min to remove Coomassie dye. After dehydration with 100% (v/v) acetonitrile for 10 min at room temperature, gel pieces were vacuum-dried and rehydrated with sequencing-grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) at 37 °C overnight. Then, in-gel tryptic digested samples were separated by Capillary HPLC and analysed by Electrospray tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) using a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Peptide mass and sequence were established from MS data and MS/MS fragmentation patterns of the peptides. Protein identification was performed by searching a non-redundant protein sequence database (NCBI) restricted to green plants using the Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com>).

## Detection of IgE against *A. palmeri* profilin by ELISA

The presence of specific-IgE that recognise *A. palmeri* profilins was evaluated by ELISA in serum of 15 allergic people with pollinosis, manifested by disease history and positive skin prick test (SPT) to *A. palmeri* pollen extract and other pollens. Five subjects with negative SPT

responses were used as negative controls. Briefly, immunoplates were coated with purified profilin as described above. Wells were then incubated with patients' serum (1:10 in PBS-Tween 0.05%) for 3 h at 25 °C and 15 h at 4 °C. After washing, biotinylated anti-human IgE (Zymed®) was added to each well (1:4000) and incubated for 2 h at 25 °C. The immunoplate was washed and incubated for 2 h with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Zymed®) at room temperature. Enzymatic reaction was detected using tetramethylbenzidine as substrate; the reaction was stopped with 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> after 15 min incubation at room temperature and optical density was read at 450 nm (OD<sub>450</sub>). A sample was considered positive when the OD<sub>450</sub> value was higher than the mean value obtained for SPT negative people plus three standard deviations.

## Results

### *A. palmeri* pollen has a protein fraction that was recognised by an anti-profilin monoclonal antibody

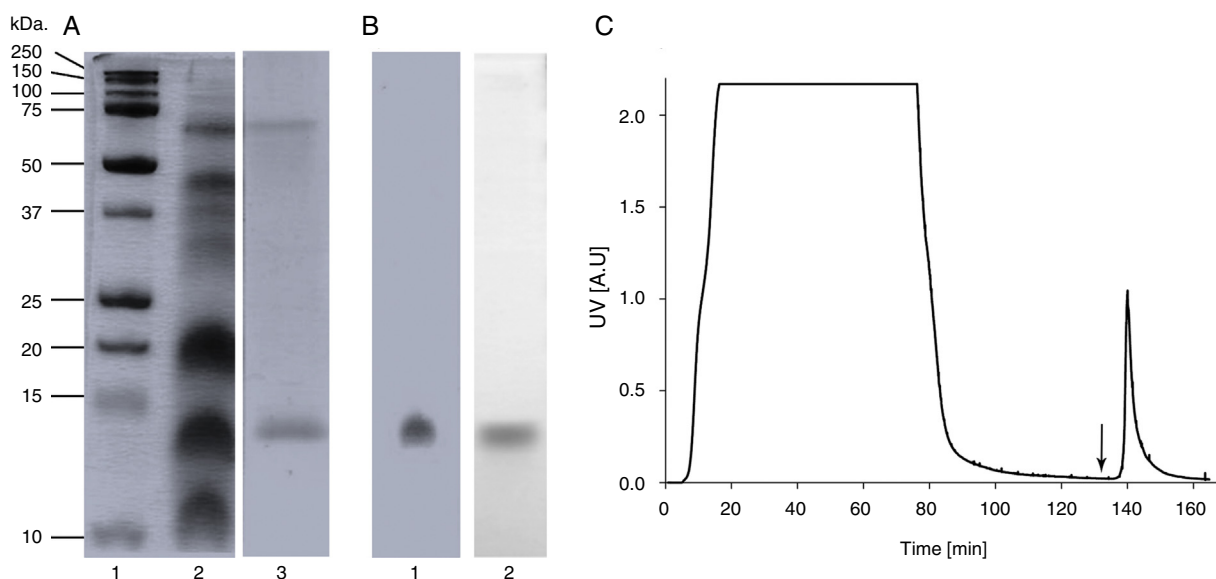
SDS-PAGE analysis of *A. palmeri* pollen extract revealed the presence of several proteins with molecular masses ranging from 12 to 75 kDa (Fig. 1A). Interestingly, profilin-specific monoclonal antibody immunodetected a unique band with a molecular mass of 14 kDa, which probably corresponds to *A. palmeri* profilin (Fig. 1A). Because profilins have conserved binding sites for poly-L-proline (pLp), we purified this allergen from *A. palmeri* pollen by affinity chromatography using a pLp-Sepharose column. Proteins with pLp affinity were obtained in a single elution fraction (Fig. 1C) with a yield of 150 µg per gram of *A. palmeri* pollen processed. SDS-PAGE analysis confirmed the presence of a predominant band of about 14 kDa, which corresponds to the expected molecular weight for profilin (Fig. 1B). Notably, this band was immunodetected by a monoclonal antibody against profilin from *A. thaliana*, which strongly suggests the presence of homologous proteins in this fraction (Fig. 1B).

### *A. palmeri* pollen has at least four profilin isoforms

Proteins retained in pLp-Sepharose column were then submitted to anionic-exchange chromatography using a Mono Q column. Results evidenced the separation of seven main fractions (Fig. 2A). Notably, fractions F2–F5 were recognised by a monoclonal antibody against profilin from *A. thaliana* pollen in ELISA (Fig. 2B). Altogether, these results indicate the presence of at least four profilin isoforms in *A. palmeri* pollen extract.

Only fractions F4 and F5 were submitted to mass spectrometry analysis, because fractions F2 and F3 were insoluble proteins. In both fractions, mass spectrometry analysis identified two peptides that correspond to the sequence of profilin from other plants. Particularly, peptide 1 (YMVIQGEPEGAVIR) totally matches with amino acids 72–84 in profilin from *Hevea brasiliensis*, while peptide 2 (LGDYLLDQGL) corresponds to the 122–131 amino acids region of the same protein. Moreover, regions corresponding to both peptides are highly conserved among allergenic profilins obtained from the allergome database





**Figure 1** Purification of profilin of *A. palmeri* pollen by Affinity chromatography. (A) SDS-PAGE of pollen extracts. Total and purified proteins were separated on 15% acrylamide gel and stained by colloidal Coomassie blue. Lane 1, molecular weight markers (kDa); lane 2, total protein extract; lane 3, purified proteins. (B) Immunodetection of profilin. Total and purified proteins were immunodetected by monoclonal antibody against profilin from *A. thaliana*. Lane 1, total protein extract; lane 2, purified proteins. (C) Elution profile of retained proteins from p-L-p-Sheparose column (arrow indicate addition of 4M of guanidine-HCl).

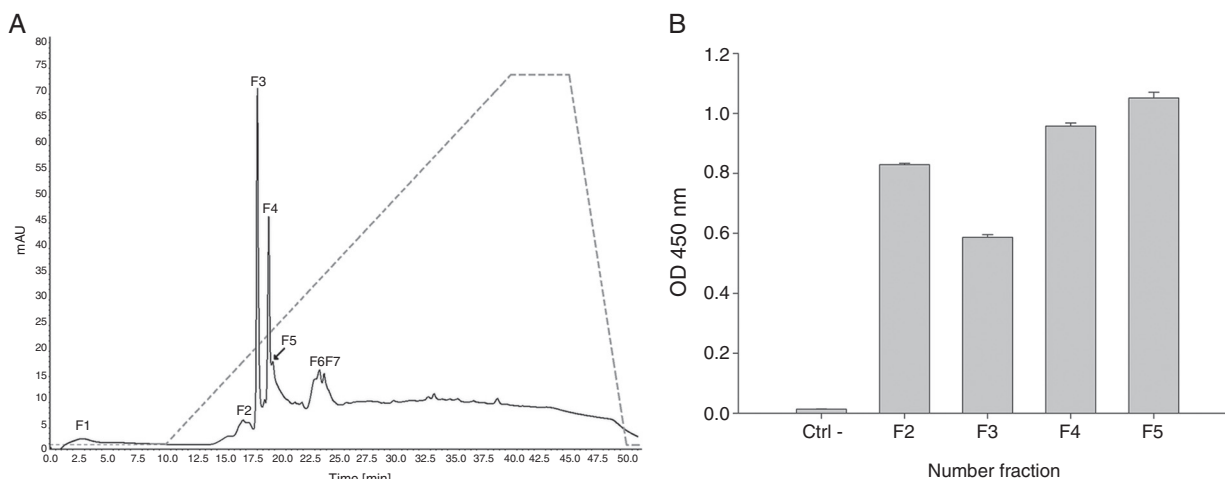
(<http://www.allergome.org/>) and aligned with clustal-W software (Fig. 3).

### *A. palmeri* profilin is a relevant allergen

Patients' characteristics and sensitisation profiles are summarised in Table 1. Respiratory symptoms of rhinitis were reported in 12 of 15 patients (80%) and rhinitis and asthma symptoms were reported in three of 15 (20%) patients. No food allergy symptoms were reported in any patient. High

prevalence of sensitisation to *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Chenopodium album* and *Atriplex stocksii* pollen were reported in patients with positive SPT to *A. palmeri* pollen.

In order to evaluate the allergenicity of *A. palmeri* pollen profilin, we analysed serum from 15 individual patients' with positive SPT to *A. palmeri* pollen extract by ELISA, using the profilins contained in the fraction obtained from affinity chromatography as antigen. Result showed that 9 out of 15 sera contain specific IgE antibodies that recognised profilins coated in wells, representing 60% of the sera tested (Fig. 4).



**Figure 2** Anion-exchange chromatography on Mono Q and ELISA assay. (A) Ion-exchange chromatography of profilin retained from affinity column. Solid line represents  $A_{280}$ ; segmented line represents salt gradient up to 1M NaCl. Major fractions are labelled F1–F7. (B) Fractions recognised by a monoclonal *A. thaliana* profilin antibody in ELISA. Antibody against *A. thaliana* profilin binding with no protein in wells was used as negative control (Ctrl–).



**Table 1** Sensitisation profiles as estimated by skin prick testing or specific immunoglobulin E determination.

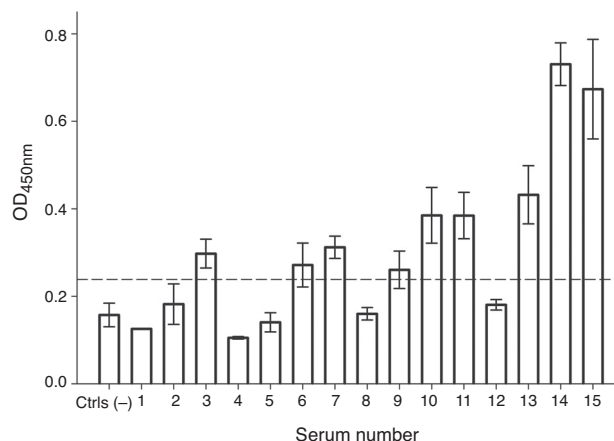
Allergen source	Rhinitis (n/%)	Rhinitis and asthma (n/%)	SPT (+) (n/%)	Specific IgE to <i>A. palmeri</i> profilin (n/%)
<i>Amaranthus palmeri</i>	12/80	3/20	15/100	9/60
<i>Fraxinus excelsior</i>	11/73	2/13	12/80	8/53
<i>Ligustrum vulgare</i>	10/66	3/20	13/87	7/47
<i>Chenopodium album</i>	6/40	3/20	8/53	5/33
<i>Atriplex stocksii</i>	7/47	2/13	9/60	7/47

Abbreviations: SPT (+), positive skin prick test.

**A** *Amaranthus\_palmeri\_1* ---YMVIQEGP GAVIR----  
*Hevea\_brasiliensis* 71 GTKYMVIQEGP GAVIRGKKGS 91  
*Amaranthus\_retroflexus* 71 GTKYMVIQEGP GAVIRGKKGA 91  
*Amaranthus\_viridis* 71 GTKYMVIQEGP GAVIRGKKGP 91  
*Phleum\_pratense* 71 GAKYMVIQEGP GRVIRGKKGA 91  
*Betula\_verrucosa* 71 GIKYMVIQEGAGAVIRGKKGS 91  
 \*\*\*\*\*,\* \*\*\*

**B** *Amaranthus\_palmeri\_2* ---LGDYLLDQGL  
*Hevea\_brasiliensis* 121 VERLGDYLLLEQGM 131  
*Amaranthus\_retroflexus* 121 VERLGDYLLIEQGY 133  
*Amaranthus\_viridis* 121 VERLGDYLLIEQGL 133  
*Phleum\_pratense* 121 VERLGDYLLVEQGM 131  
*Betula\_verrucosa* 121 VERLGDYLLIDQGL 133  
 \*\*\*\*\*: \*\*

**Figure 3** Comparison of identified *A. palmeri* peptide amino acid sequences with profilins from other allergenic sources. (A) Peptide 1 (internal peptide) and (B) peptide 2 (C-terminal peptide). Sequence identity (\*) and amino acid changes with conserved physicochemical properties (;) of peptides identified in *A. palmeri* pollen profilin were identified through compared with sequences of profilins from highly allergenic sources from *H. brasiliensis* (CAA75312), *A. retroflexus* (ACP43298), *A. viridis* (ABW37744), *P. pratense* (Y09457) and *B. verrucosa* (P25816).



**Figure 4** IgE recognition of profilin by individual sera from patients hypersensitive to *A. palmeri* pollen. ELISA assay responses for sera of 15 patients. A pool of five non-allergic subject serum was used as controls (Ctrls-). A sample was considered positive when the OD<sub>450</sub> value was higher than the mean value obtained for skin prick test negative people plus three standard deviations. The error bars indicate the standard deviation between ELISA replicates.

## Discussion

Because of the high amino acid sequence identity between profilins from different organisms and consequently their comparable immunogenicity, profilins have been described as pan-allergens of various plant species.<sup>15</sup> In this study, the identification of profilin from *A. palmeri* pollen and the presence of profilin-specific IgE antibodies in serum of patients is reported. In *A. palmeri*, at least four profilin isoforms are expressed in pollen, as demonstrated by anion-exchange chromatography and ELISA using a monoclonal antibody against *A. thaliana* pollen profilin. Similarly, several isoforms have been reported for allergenic profilin from pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (isoforms Amb a 8.01 and Amb a 8.02),<sup>16</sup> *Amaranthus viridis* (Ama v 2.0101 and Ama v 2.0201),<sup>17</sup> *Phleum pratense* (Phl p 12.0101, Phl p 12.0102, Phl p 12.0103),<sup>18</sup> *Salsola kali* (Sal k 4.0101, Sal k 4.0201, Sal k 4.0301),<sup>19</sup> among other pollens. Purification yield of profilin by affinity chromatography was 150 µg/g of pollen, slightly higher than previously reported for other pollens using similar purification protocols, such as sunflower, olive and lambsquarters, which showed yields between 30 and 100 µg/g of pollen.<sup>20-23</sup> Moreover, purity of profilin after anion-exchange chromatography was more than 95% according to SDS-PAGE and colloidal Coomassie Blue staining.

Fractions (F4 and F5) from anion-exchange chromatography containing profilin isoforms were initially subjected to automated Edman sequencing; however assays failed to release a NH<sub>2</sub>-terminal residue from these fractions (data not shown). These results suggested the presence of a possible post-translational modification of profilin from *A. palmeri* pollen. NH<sub>2</sub>-terminal blockage typically occurs when the α-amino groups are acylated or when the N-terminal residue is a pyrrolidone carboxylic acid formed by cyclisation of glutamine.<sup>24</sup> Proteins with serine and alanine termini are the most frequently acetylated, plant profilins display a very high degree of amino acid sequence homology in N-terminal segment (residues 1–15).<sup>23,25,26</sup> Importantly, serine 2 is present in all reported sequences of allergenic profilins from pollen, which reinforced the idea that a post-translational modification is present in *A. palmeri* pollen profilin isoforms, most likely, an acetylation of the N-terminal serine. Allergenic profilins with blocked N-terminal amino acid have also been reported in melon<sup>26</sup> and olive pollen.<sup>27</sup> This N-terminal modification has also been identified in other plant allergens, such as lipid transfer protein from peach<sup>28</sup> and isoflavone reductase from birch pollen.<sup>29</sup> Because it was not possible to obtain the N-terminal sequence of amino acids from isolated profilin

isoforms through Edman degradation method, we performed their identification by mass spectrometry. The detection of two peptides that showed highly conserved amino acid sequence found in profilins from allergenic pollen of a large number of plants, confirmed the identification of profilin isoforms in *A. palmeri*. Identified peptides are contained in a region that has been previously reported as part of a major IgE binding-site in profilins from *H. brasiliensis*, *Betula pendula*, and *A. thaliana*.<sup>30</sup> Preliminary results obtained by our group show that profilin isoforms identified in this work have a molecular mass of 13,950 Da for isoform present in F4 and of 13,958 Da for profilin in F5, as judged by MALDI-TOF mass spectrometry analysis (data not shown), which is consistent with the expected molecular mass for these proteins. This result reinforces earlier evidence that identified allergen belongs to profilin family.

On the other hand, ELISA analysis revealed that 60% of serum from patients with positive SPT to *A. palmeri* pollen showed specific IgE to pooled profilin isoforms. Similar sensitisation rates were observed in patients with positive SPT to *F. excelsior* pollen (53%). Slightly lower rates of sensitisation were observed in patients with positive SPT to *L. vulgare* and *A. stocksii* pollen (47%), suggesting a possible role of *A. palmeri* profilin in cross-reactivity among these pollens. Interestingly, patients with positive SPT to *C. album* pollen, a plant of *Amaranthaceae/Chenopodiaceae* family, only 33% showed IgE to *A. palmeri* profilin. In contrary to our finding, previous reports showed sensitisation rates of 55% to profilin from *C. album* pollen in Spanish patients.<sup>23</sup> It is to note that profilin has been found to be a minor but important allergen in pollen from birch (20%), timothy (20%),<sup>15</sup> mugwort (20–36%),<sup>15,31</sup> olive (24–47%)<sup>27,32</sup> and sunflower (30%).<sup>33</sup> Nonetheless, it has been found to be a major allergen in other pollens, such as annual mercury (51%),<sup>34</sup> saffron (53%),<sup>35</sup> lambsquarters (55%),<sup>23</sup> date palm (56–64%),<sup>36</sup> and soybean (69%).<sup>37</sup> Similar observations have been reported for profilin of some plant food extract such as muskmelon (71–100%),<sup>26,38</sup> orange (78–87%)<sup>39</sup> or watermelon, with a rate of profilin-sensitized patients of 56%.<sup>40</sup>

In conclusion, we have demonstrated that profilin from *A. palmeri* pollen is an important allergen for Mexican allergic subjects, which suggests that it can be considered as a panallergen allergen in this allergenic source. Further studies are required to determine whether profilin isoforms represent interesting candidates to be included in desensitisation protocols for people allergic to *A. palmeri* pollen.

## Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## Ethical disclosures

**Patients' data protection. Confidentiality of Data.** The authors declare that they have followed the protocols of their work centre on the publication of patient data and that all the patients included in the study have received sufficient information and have given their informed consent in writing to participate in that study.

**Right to privacy and informed consent.** The authors have obtained the informed consent of the patients and/or subjects mentioned in the article. The author for correspondence is in possession of this document.

**Protection of human subjects and animals in research.** The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the responsible Clinical Research Ethics Committee and in accordance with those of the World Medical Association and the Helsinki Declaration.

## Acknowledgments

We thank the Instituto Politécnico Nacional (grant SIP-2010-0232), SECITI-DF and CONACyT (grants 54626 and 106839) for support. César Manuel Landa Pineda was supported with fellowships from CONACyT.

## References

1. Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RW, Pickup J. Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:402–25.
2. Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009;31:425–37.
3. Weber RW. Cross-reactivity of pollen allergens: recommendations for immunotherapy vaccines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:563–9.
4. Linhart B, Valenta R. Molecular design of allergy vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:646–55.
5. Weber RW. Cross-reactivity of pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004;4:401–8.
6. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6:1–14.
7. Schutt CE, Rozycki MD, Chik JK, Lindberg U. Structural studies on the ribbon-to-helix transition in profilin: actin crystals. *Biophys J*. 1995;68:125–75.
8. Mahoney NM, Rozwarski DA, Fedorov E, Fedorov AA, Almo SC. Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat Struct Biol*. 1999;6:666–71.
9. Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*. 1985;314:472–4.
10. Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 1991;253:557–60.
11. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhammer J, Ferreira F, et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:920–9.
12. Stern DA, Lohman IC, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD, Halonen M. Dynamic changes in sensitization to specific aeroallergens in children raised in a desert environment. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1563–669.
13. Bunjean K, Sukkasem K, Noppacroh N, Yamkaew N, Jantayananont D, Theerapancharern W, Chokkanchitchai S, Mounghong G. Prevalence of allergic rhinitis and types of sensitized allergen in adult at Wat Intaram community, Hua Raeu, Phra Nakhon Si Ayutthaya District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province, Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2012;95 Suppl. 5:S63–8.

14. Becerril AM, Vázquez MCL, Ángeles GU, Alvarado MLE, Vilchis GE. Prevalence of sensitization to the most common allergens in elderly patients from the Western of Mexico. *Rev Alerg Mex*. 2008;55:85–91.
15. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med*. 1992;175:377–85.
16. Wopfner N, Gruber P, Wallner M, Briza P, Ebner C, Mari A, et al. Molecular and immunological characterization of novel weed pollen pan-allergens. *Allergy*. 2008;63:872–81.
17. Mari A, Rasi C, Palazzo P, Scala E. Allergen databases: current status and perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;9:376–83.
18. Santos A, Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155:191–204.
19. Mas S, Barderas R, Colás C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform – molecular and immunological characterization. *FEBS J*. 2012;279:4338–49.
20. Jiménez A, Moreno C, Martínez J, Martínez A, Bartolomé B, Guerra F, et al. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;105:297–307.
21. Martínez A, Asturias JA, Monteseirín J, Moreno V, García-Cubillana A, Hernández M, et al. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy Suppl*. 2002;57:71:17–23.
22. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez J, Martínez A, Palacios R. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:365–72.
23. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1192–8.
24. Wellner D, Panneerselvam C, Horecker BL. Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:1947–9.
25. Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecies] cross-reactivity. *J Immunol*. 2004;172:3644–51.
26. López-Torrejón G, Crespo JF, Sánchez-Monge R, Sánchez-Jiménez M, Alvarez J, Rodriguez J, et al. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1065–72.
27. Ledesma A, Rodríguez R, Villalba M. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy*. 1998;53:520–6.
28. Pastorello EA, Ortolani C, Baroglio C, Pravettoni V, Ispano M, Giuffrida MG, et al. Complete amino acid sequence determination of the major allergen of peach (*Prunus persica*) Pru p 1. *Biol Chem*. 1999;380:1315–20.
29. Vieths S, Frank E, Scheurer S, Meyer HE, Hrazdina G, Hausteiner D. Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods. *Scand J Immunol*. 1998;47:263–72.
30. Jimenez-Lopez JC, Rodríguez-García MI, Alché JD. Analysis of the effects of polymorphism on pollen profilin structural functionality and the generation of conformational, T- and B-cell epitopes. *PLOS ONE*. 2013;8:e76066.
31. Wopfner N, Willeroidee M, Hebenstreit D, van Ree R, Aalbers M, Briza P, et al. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biol Chem*. 2002;383:1779–89.
32. Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:797–802.
33. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Aguirre M, Martínez A, Palacios R, et al. Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Mol Immunol*. 1998;35:469–78.
34. Vallverdú A, García-Ortega P, Martínez J, Martínez A, Esteban MI, de Molina M, et al. *Mercurialis annua*: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;112:356–64.
35. Feo F, Martínez J, Martínez A, Galindo PA, Cruz A, García R, et al. Occupational allergy in saffron workers. *Allergy*. 1997;52:633–41.
36. Asturias JA, Ibarrola I, Fernández J, Arilla MC, González-Rioja R, Martínez A. Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:374–81.
37. Rihs HP, Chen Z, Ruëff F, Petersen A, Rozynek P, Heimann H, et al. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1293–301.
38. Rodriguez-Perez R, Crespo JF, Rodríguez J, Salcedo G. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:634–9.
39. López-Torrejón G, Ibáñez MD, Ahrazem O, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, et al. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy*. 2005;60:1424–9.
40. Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Pérez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M, et al. Identification of major allergens in watermelon. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149:291–8.

POSTER PRESENTATION

Open Access

# Poster 2001: Generation a hypoallergenic profilin from *amaranthus palmeri* pollen

Cesar Manuel Landa\*, César Augusto Sandino Reyes

From 2013 WAO Symposium on Immunotherapy and Biologics  
Chicago, IL, USA. 13-14 December 2014

## Background

*Amaranthus* pollen grains are known to be highly allergenic and a potential cause of respiratory allergic diseases in many countries. *Amaranthus palmeri* pollen is an important allergenic source in Mexico; however in our country, there is not reported data about the prevalence of these pollens. The first allergenic profilin was identified from birch pollen allergen (Bet v 2) in 1991. Many studies have been described that patients who developed allergies against profilin from pollen commonly presented cross-reactivity against to vegetable food profilin, in particular to different fruits as nuts, melon, orange, and peach, or to vegetables as zucchini, celery, tomatoes and carrots or also latex.

The aim of the study is to clone the profilin from *A. palmeri* pollen and obtain hypoallergenic profilin variant, this variant could be used as a therapeutic.

## Methods

cDNA from *A. palmeri* pollen profilins were amplified and cloned into the pJET1.2/blunting vector and sub-cloned into over expression vector. Profilins were purified by affinity chromatography using as ligand poly-L-proline coupled to sepharose. Profilins purified for natural source from *A. palmeri* pollen were named as natural profilin (nAmpa) and recombinant proteins were named as rAmpa. In addition, we obtained the circular dichroism spectrum of four different isoforms. Profilins were analyzed by ELISA using serum allergic patients from two groups. The first group was formed by patients with

positive Skin prick tests (SPT) for *A. palmeri* pollen and second group was formed by allergic volunteers without SPT.

## Results

Eight profilins were cloned and cDNA sequencing revealed that seven of these are 393 bp encoding for 131 amino acid residues and the other cDNA is 399 bp encoding for 133 amino acid residues. These isoforms were named rAmpa ISO-1 to -8. rAmpa ISO-1, -4, -7 and -8 were expressed in *E. coli* as a soluble protein and purified at one step for affinity chromatographic in similar conditions that natural profilin (nAmpa). The spectrums obtained from *A. palmeri* profilin (rAmpa) are similar to *Phleum pratense* natural profilin previously reported. One of the eight profilins was less recognized than others by serum from allergic patients, this profilin could be used as a vaccine for allergic patients to profilin.

## Conclusions

Profilin from *Amaranthus palmeri* pollen could be used as a treatment.

Published: 3 February 2014

doi:10.1186/1939-4551-7-S1-P18

**Cite this article as:** Landa and Reyes: Poster 2001: Generation a hypoallergenic profilin from *amaranthus palmeri* pollen. *World Allergy Organization Journal* 2014 **7**(Suppl 1):P18.





## Profilinas: alergenos con relevancia clínica

César Manuel Landa-Pineda,<sup>1</sup> Guillermo Guidos-Fogelbach,<sup>1</sup> Laurence Marchat-Marchau,<sup>1</sup> Marisol López-Hidalgo,<sup>2</sup> Analilia Arroyo-Becerra,<sup>2</sup> César Augusto Sandino Reyes-López<sup>1</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** las profilinas son proteínas ubicuas y pequeñas de entre 12-19 kDa que participan en el dinamismo de la actina. Estas proteínas se han encontrado en todos los organismos eucariotes estudiados hasta la fecha. Las profilinas tienen secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional altamente conservada. Los pacientes alérgicos a pólenes frecuentemente tienen síntomas de alergia cuando ingieren alimentos derivados de plantas como frutas, vegetales, semillas, entre otros. Este fenómeno es conocido como alergia látex-polen-fruta y es la principal causa del síndrome de alergia oral (SAO) que es atribuido a la reactividad cruzada. Los alergenos que son compartidos entre diferentes fuentes son llamados panalergenos, un ejemplo son las profilinas, que representa al menos el 20% de los pacientes alérgicos al polen. Esta reactividad cruzada es el resultado de la alta identidad en la secuencia de aminoácidos de las profilinas de plantas que está entre el 70% y 85%, lo cual puede explicar la exacerbación de los síntomas en pacientes alérgicos a profilinas de plantas.

**Objetivo:** describir algunas características y la importancia de las profilinas principalmente en la sensibilización a plantas, frutas y pólenes.

**Métodos:** realizamos la búsqueda de las secuencias de aminoácidos de todas las profilinas alergénicas reportadas hasta la fecha. Reportamos el análisis de las secuencias de las profilinas analizadas.

**Conclusiones:** las profilinas son alergenos importantes que están subestimados en la práctica clínica, y que contribuyen a la reactividad cruzada en individuos sensibilizados por profilinas de otras fuentes.

**Palabras clave:** alergeno, panalergenos, reactividad cruzada, síndrome de alergia oral, profilina.

### ABSTRACT

**Introduction:** Profilins are small ubiquitous proteins of 12–19 kDa involved in actin dynamics. These proteins are found in all eukaryotic organisms studied to date. Profilins have amino acid sequences and tridimensional structure highly conserved. Allergic patients to pollen frequently have symptoms of allergy when ingestion of plant-derived foods like fruits, vegetables, seeds, among others. This phenomenon is known as latex-pollen-fruit allergy and it's the main cause of oral allergy syndrome (OAS) which is attributed to the cross-reactivity. Allergens shared between different sources these are called panallergens for example are profilins which representing at least 20% of all pollen allergic patients. This cross-reactivity is results from the high amino acid sequence identity of profilin from plants, which is between 70% and 85%, this may explain the exacerbation symptoms of allergic patients to profilins from plants.

**Objectives:** We described some characteristics which show us the important participation of the profilins in the sensitization of people allergic, especially to plants, fruits and pollen.

**Methods:** We looked research amino acid sequences of all allergenic profilins reported to date and these were analyzed.

**Conclusions:** Profilins are important allergens that are underrated in clinical practice and contribute to cross-reactivity in sensitized individuals by profilins from other sources.

**Key words:** allergen, panallergen, cross-reactivity, oral allergy syndrome, profilin.

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación Bioquímica-ENMyH-IPN.

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Correspondencia: César Augusto Sandino Reyes López. Correo electrónico: careyes@ipn.mx, clandap1000@alumno.ipn.mx.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con esta investigación.

Recibido: 3 de julio 2013.

Aceptado: 20 de agosto, 2013.

Este artículo debe citarse como: Landa-Pineda CM, Guidos-Fogelbach G, Marchat-Marchau L, López-Hidalgo M y col. Profilinas: alergenos con relevancia clínica. Revista Alergia 2013;60:129-143.

**L**as profilinas son pequeñas proteínas de entre 12-19 kDa presentes en todos los organismos eucariontes,<sup>1-3</sup> incluyendo plantas.<sup>4</sup> Se ha descrito la participación de la profilina en diversos procesos biológicos<sup>5</sup> entre los cuales el más estudiado es su intervención en el re-arreglo del citoesqueleto de las células eucariontes,<sup>6</sup> específicamente, regulando la polimerización-despolimerización de la actina, involucrándose así de forma importante en la estructura y movilidad celular.<sup>7</sup> Se ha demostrado que esta participación es trascendente en diversos procesos biológicos como son la división celular,<sup>8</sup> la embriogénesis<sup>9</sup> y la citocinesis.<sup>10</sup>

Alrededor del mundo, diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en describir la contribución de la profilina en algunas enfermedades como el cáncer,<sup>11-15</sup> enfermedad de Parkinson<sup>16</sup> y alergias<sup>4,17,18</sup> entre otras. En las últimas tres décadas los investigadores han mostrado interés en estudiar la participación de la profilina como un alérgeno de importancia clínica presente en diversas fuentes. En esta revisión nos enfocamos principalmente a la descripción de las profilinas alérgicas presentes en plantas, frutos y pólenes.

Estudios realizados alrededor del mundo nos muestran la importante contribución de las profilinas como alérgenos de interés clínico, y una de sus características relevantes es el fenómeno de reactividad cruzada con profilinas de otras fuentes,<sup>19</sup> como en el síndrome de alergia polen-alimentos, al cual se atribuye la reactividad cruzada de inmunoglobulina-E (IgE) a distintos epítopes que comparten algunos alérgenos presentes en el polen y en algunos alimentos, principalmente de origen vegetal.<sup>20-21</sup> Se ha propuesto que estos alérgenos que ocasionan la reactividad cruzada son principalmente proteínas con funciones biológicas de gran importancia, por lo cual su secuencia de aminoácidos y/o estructura tridimensional son relativamente conservadas e inducen anticuerpos IgE que reconocen epítopes similares presentes en las proteínas de diferente fuente. De todos los pacientes que presentan el fenómeno de reactividad cruzada por el síndrome polen-alimento, la profilina contribuye con la sensibilización de al menos 20% de estos pacientes.<sup>18</sup>

Recientemente en nuestro grupo de trabajo hemos descrito la importancia de las profilinas del polen de

*Amaranthus palmeri* en la sensibilización de personas alérgicas. Teniendo como resultado la posible participación de estas profilinas en la reactividad cruzada con proteínas homólogas de otras especies.

El objetivo de este trabajo es presentar una revisión de las profilinas de distintas fuentes como alérgenos con relevancia clínica, que deben considerarse en la atención de pacientes alérgicos, principalmente a alérgenos que contienen profilinas.

### Generalidades

La primer profilina descrita hace un poco más de tres décadas, fue una proteína pequeña de 15 kDa que se unía a los monómeros de actina e inhibía su polimerización. Estas proteínas deben su nombre a su propiedad y función descrita en esa fecha, que es la de mantener a la actina en pro-filamentos de actina (**PRO-FILamentous actIN**).<sup>1,22</sup> A pesar de su descubrimiento en células eucariontes y su función importante, principalmente en el dinamismo de la actina, se han reportado profilinas provenientes de virus, y se propone que su función es similar a la reportada en los vertebrados, sugiriéndose que los virus pueden utilizar esta proteína como ligando del fosfatidil inositol (PIP2) para tener contacto con las células de mamíferos.<sup>23-27</sup> Las profilinas juegan un papel crucial en la formación de tejidos de mamíferos y en algunos organismos, como animales y plantas superiores, pueden expresarse de manera tejido-específica.<sup>28</sup> Se ha demostrado que al suprimir el gen que codifica para este polipéptido, se pueden tener consecuencias desfavorables, por ejemplo el cigoto de ratón después de ser fecundado muere si no está presente el gen de la profilina, lo cual demuestra su importancia en la división celular y por consecuencia en la embriogénesis.<sup>9</sup>

### Familia de genes y expresión de la profilina

El número de genes por organismo que codifican para profilinas correlaciona ampliamente con su complejidad. Los eucariontes inferiores contienen uno o dos genes y ocasionalmente tres,<sup>29-30</sup> mientras que en eucariontes superiores, como las plantas, el número de genes que codifican para profilinas es amplio, además pueden ser generadas nuevas variantes de RNAm por splicing alternativo.<sup>3,31-35</sup> Por otra parte, también se han reportado, en

algunos virus, la presencia de genes que codifican para profilinas<sup>36</sup> lo cual es todo un paradigma.

En algunos mamíferos, como el humano, se han descrito solo cuatro genes que codifican para profilinas, dándoles el nombre de *Pfn1* al *Pfn4*.<sup>37</sup> El gen *Pfn1* codifica para la isoforma I la cual es ubicua. El gen *Pfn2* produce por splicing alternativo dos variantes, la profilina II expresada principalmente en células neuronales y una forma menor, profilina IIb, expresada principalmente en riñón.<sup>32</sup> Los genes *Pnf3* y *Pnf4* codifican para variantes que son tejido-específicas localizadas en testículo y riñón.<sup>38,39</sup> La expresión de estas proteínas específicas de espermatozoides regulan el desarrollo de la célula y del tejido, lo cual se puede correlacionar con la expresión también específica de proteínas relacionadas con la actina (T-actina 1 y T-actina 2) presentes en células germinales masculinas<sup>40</sup> y de igual manera se ha visto su participación en la reacción acrosomal del espermatozoide de equinodermo.<sup>41</sup>

Dentro del reino plantae, se han descrito genes putativos que codifican para profilina de diversas especies. Las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas contienen aproximadamente diez diferentes genes, entre ellos algunos pseudogenes no codificantes, mientras que las secuencias de ADN codificantes permiten la producción de estos polipéptidos y algunas isoformas del mismo.<sup>42</sup> En la Tabla 1 se muestra el número de genes descrito para diversas especies incluyendo un miembro del reino protista, la alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Las secuencias de ADN genómico que codifican para estos polipéptidos generalmente están formadas por tres exones y dos intrones de diversos tamaños 42-43. Figura 1.

*Arabidopsis thaliana* es la especie más estudiada dentro del reino viridiplantae. En esta especie se han descrito cinco genes que codifican para diferentes profilinas. Estos genes se han logrado clasificar en dos grupos, el primer grupo está constituido por los genes PRF1, PRF2 y PRF3 expresados en todos los órganos de la planta. Este patrón de expresión es atribuido al primer intrón de los genes PRF1 y PRF2. El grupo dos está formado por los genes (PRF4 y PRF5) y se expresan principalmente en tejidos florales u órganos reproductivos como el polen.<sup>42,44-45</sup>

El gen PRF1 (AT2G19760.1), es el primer miembro de la familia de multigenes de *Arabidopsis thaliana*

y codifica para la profilina 1. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 2 en el locus AT2G19760. Este gen es expresado en todos los órganos de la planta, durante diferentes etapas de crecimiento y desarrollo como etapa de cotiledón expandido, etapa de dos, cuatro, seis, ocho, diez y doce hojas visibles, en estadio de polen germinado, la diferenciación de pétalos y la etapa de expansión así como en la etapa de plántulas en desarrollo solo por mencionar algunas. Además, se han descrito en diferentes componentes celulares como, citoesqueleto, pared celular, citoplasma, citosol, nucléolo, núcleo, membrana plasmática y plasmodesma.<sup>42-43,46-49</sup>

El gen PRF2 (AT4G29350.1), codifica para la profilina 2, se localiza en el cromosoma 4 en el locus AT4G29350. Este gen al igual que el PRF1 se encuentra expresado en casi todos los componentes celulares y participa en las mismas etapas de desarrollo y crecimiento. Se ha descrito en componentes celulares como citoesqueleto, cloroplastos, citoplasma y membrana plasmática.<sup>49-52</sup> Y a diferencia del gen PRF1 no se ha detectado en el citosol.<sup>53</sup>

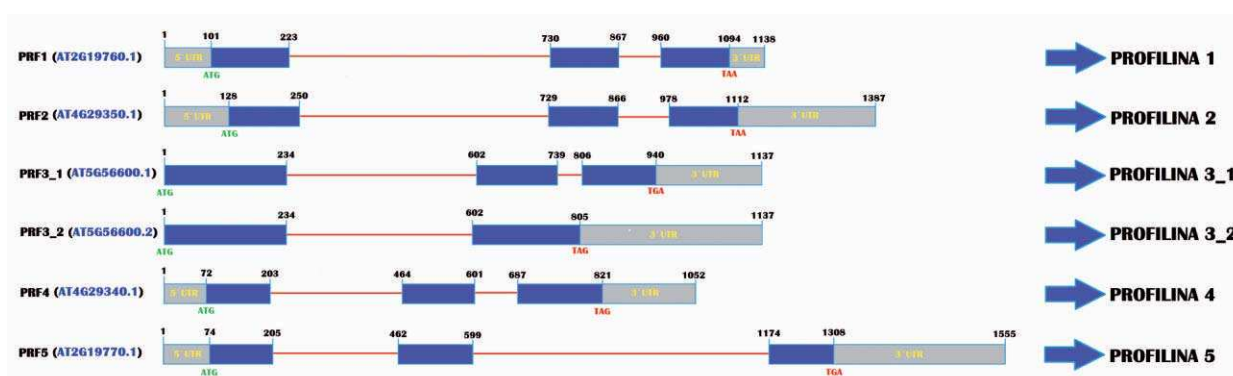
El gen PRF3 está localizado en el cromosoma 5 en el locus AT5G56600 y posee dos variantes generadas por splicing (AT5G56600.1 y AT5G56600.2) generando así dos isoformas de diferente tamaño un mismo gen. La isoforma generada por AT5G56600.1 está formada por 168 residuos de aminoácidos mientras que la isoforma codificada por AT5G56600.2 es de 145 aminoácidos. Su expresión y localización es similar a las dos anteriores encontrándose en componentes celulares como citoesqueleto, citoplasma y núcleo. Hasta el momento no se ha descrito alguna diferencia de expresión o ubicación tejido específica para cada isoforma producto de este gen.<sup>42-43,54</sup>

Al igual que el gen PRF2, el PRF4 (AT4G29340.1) está localizado en el cromosoma 4 y se alberga en el locus AT4G29340 y codifica para la profilina 4. El producto de este gen se considera específico de polen, sin embargo se ha detectado principalmente en estructuras relacionadas con la reproducción como flores, células del tubo polínico y estambre además en otros tejidos como carpelo, pedicelo, pétalo, raíz y sépalo. Su expresión se observa en etapas de desarrollo y crecimiento como anthesis, fase L del polen maduro, etapa M del polen germinado, diferenciación de pétalos y en la etapa de

**Tabla 1.** Genes putativos reportados en Phytozome que codifican para profilina

Especie	Genes	Especie	Genes
<i>Eucalyptus grandis</i>	8	<i>Vitis vinifera</i>	4
<i>Glycine max</i>	8	<i>Citrus clementeina</i>	3
<i>Zea mays</i>	8	<i>Citrus sinensis</i>	3
<i>Manihot esculenta</i>	7	<i>Medicago truncatula</i>	3
<i>Arabidopsis lyrata</i>	5	<i>Oryza sativa</i>	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	<i>Sorghum bicolor</i>	3
<i>Mimulus guttatus</i>	5	<i>Aquilegia coerulea</i>	2
<i>Brachypodium distachyon</i>	4	<i>Carica papaya</i>	2
<i>Physcomitrella patens subs patens</i>	4	<i>Cucumis sativus</i>	2
<i>Populus trichocarpa</i>	4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1
<i>Prunus persica</i>	4	<i>Selaginella moellendorffii</i>	1
<i>Ricinus communis</i>	4	<i>Volvox carteri</i>	1
<i>Setaria italic</i>	4		

Se muestra la especie y el número de genes putativos reportados para la especie. Estos datos son obtenidos del servidor de Phytozome al cual realiza búsquedas en los 25 genomas de plantas verdes secuenciados hasta la fecha. (<http://www.phytozome.net/results.php?method=0&search=1&sbut=Submit+keyword+search&searchText=peptidename:AT2G19760.1>)



**Figura 1.** Genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para profilina. En esta figura se representan los modelos de los genes que codifican para las profilinas de *Arabidopsis thaliana* que están estructurados principalmente por tres exones (cajas azul y gris) y uno o dos intrones (líneas rojas). La variante PRF3\_2 del gen PRF3, se genera por splicing, dando origen a dos exones y un intrón. En color azul se resalta la región codificante de cada gen.

expansión. Se ha detectado en organelos como el núcleo y al igual que PRF1, PRF2 y PRF3 la profilina 4 es abundante en citoplasma.<sup>43,52,55-58</sup>

El gen PRF5 (AT2G19770.1) se localiza en el cromosoma 2 en el locus AT2G19770 y codifica para la profilina 5. Esta isoforma también se considera específica de polen y se ha localizado en procesos como

maduración de polen, crecimiento de tubos polínicos, antesis, diferenciación de pétalos y en la etapa de expansión al igual que PRF4.<sup>48,56-57,59-61</sup> Se ha propuesto que las profilinas presentes en el polen de *Alnus glutinosa*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense*, *Secale cereale* y *Artemisia vulgaris* participan en el proceso de fertilización de las plantas.<sup>62</sup>



### Características estructurales y moleculares

Las profilinas son proteínas pequeñas globulares, cuya estructura y composición de aminoácidos está altamente conservada. Tienen una masa molecular entre 12 y 19 kDa, su estructura primaria está formada por alrededor de 124 a 174 residuos de aminoácidos en cuatro hélices alfa y siete hebras beta antiparalelas, dependiendo del organismo del cual proviene.<sup>3,63-65</sup> La estructura secundaria y terciaria de las profilinas que se han podido definir tridimensionalmente nos muestra su alta similitud. La conformación estructural de las profilinas provenientes del género *Acanthamoeba*, algunos mamíferos y de *Betula verrucosa* muestran un centro compacto formado por siete hebras beta rodeadas de cuatro hélices alfa. Las regiones amino y carboxilo terminal inician en parte las hélices alfa y son adyacentes una de la otra.<sup>66,67</sup> Sin embargo pueden presentar entre tres a cuatro hélices alfa<sup>68</sup> (PDB: 1G5U) (Figura 2).

### Función y distribución

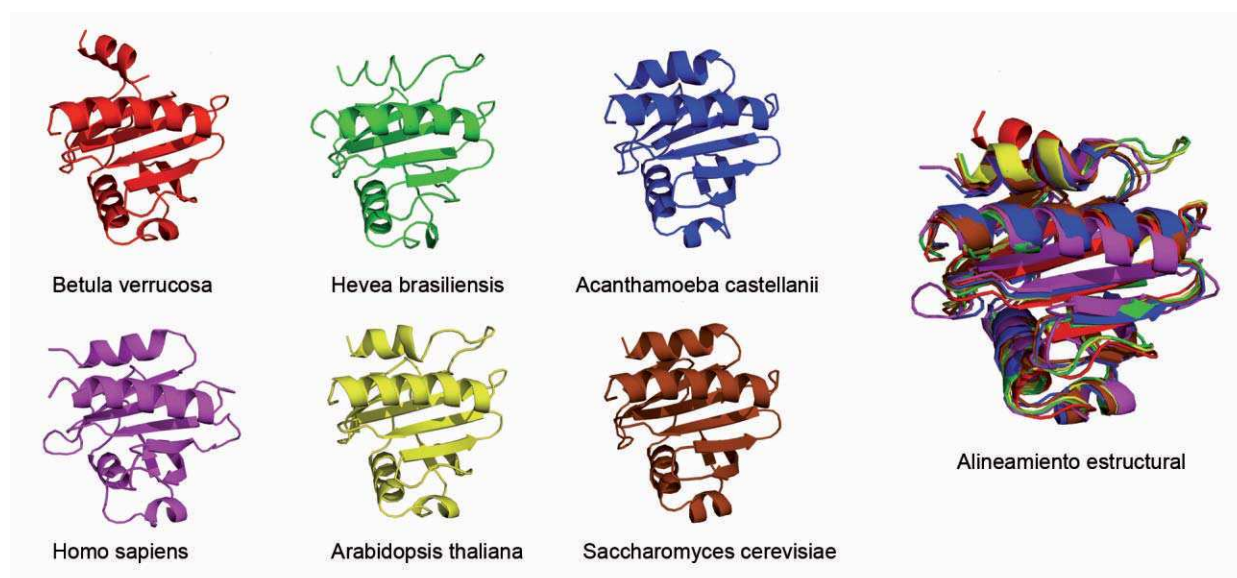
Las profilinas se pueden clasificar en dos grupos basados en su secuencia y propiedades bioquímicas. En el grupo I se encuentran las profilinas ubicuas que se expresan constitutivamente en todos los tejidos, por

ejemplo, las profilinas expresadas a partir de los genes PRF1, PRF2, PRF3\_1 y PRF3\_2 de *Arabidopsis thaliana*. En el grupo II se encuentran las profilinas tejido específicas, un ejemplo son las profilinas 4 y 5 del polen de *Arabidopsis thaliana* producto de los genes PRF4 y PRF5 para la misma especie,<sup>44</sup> así como las expresadas en células germinales de plantas y animales, estando presentes exclusivamente durante el desarrollo celular y embrionario.<sup>42</sup>

La función de las profilinas está dada por la interacción que tiene con diferentes ligandos, con diferente función según sea el ligando y la isoforma de profilina que intervengan.<sup>69-73</sup>

De estos sitios de interacción que se han caracterizado, se conocen al detalle los motivos estructurales involucrados, se destaca que las secuencias de aminoácidos que forman estos motivos estructurales son relativamente conservadas en los diferentes organismos.<sup>42</sup> En general, su conformación les permite interactuar adecuadamente con diversos ligandos, ya que dichos motivos estructurales están espacialmente separados y expuestos al solvente.<sup>74</sup>

En la actualidad existen diversas herramientas que nos permiten simplificar las búsquedas de interaccio-

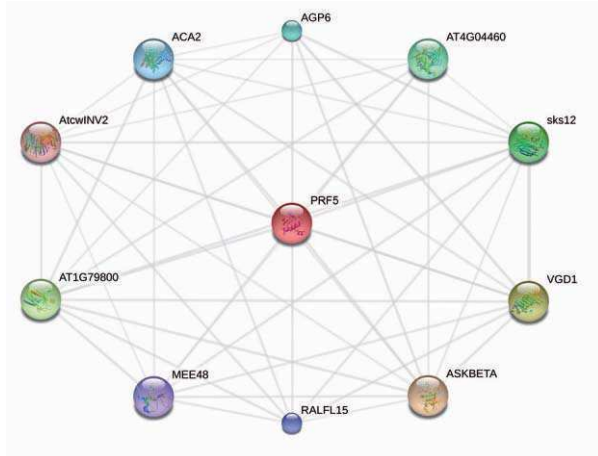


**Figura 2.** Estructura tridimensional y alineamiento estructural. Se muestra la alta homología estructural entre las profilinas de *Betula pendula* (PDB: 1CQA)<sup>122</sup>, *Hevea brasiliensis* (PDB: 1G5U) (no publicado), *Acanthamoeba castellanii* (1PRQ)<sup>123</sup>, *Homo sapiens* (PDB: 1D1J)<sup>124</sup>, *Arabidopsis thaliana* (PDB: 1A0K)<sup>125</sup> y *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 1YPR)<sup>126</sup>. Así mismo, el alineamiento estructural muestra los ligeros cambios presentes entre estas mismas estructuras.

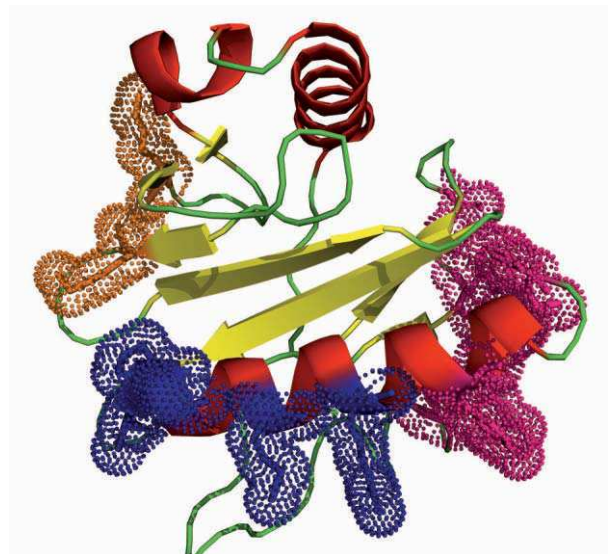
nes reportadas y/o predecir estas mismas interacciones proteína-ligando. Utilizando la herramienta STRING del servidor de ExPASy se puede obtener información sobre otros ligandos con los cuales se unen la profilina en este caso específicamente la profilina 5 de *Arabidopsis thaliana* (PRF5). La mayoría de estos ligandos son enzimas que participan en la embriogénesis y en diversos procesos del polen resaltando así la importancia de la profilina desde el inicio de la vida. Figura 3.

Por otra parte, las interacciones más estudiadas son con, G-actina,<sup>75-77</sup> fosfatidil inositol (PIP2),<sup>78</sup> la subunidad  $\alpha$  de la cinasa p85 (p85 $\alpha$ )<sup>78</sup> y además unión a proteínas ricas en secuencias repetidas de L-prolina (pLp),<sup>37,80</sup> como son la dinamina I,<sup>81</sup> clatrina,<sup>82</sup> sinapsina<sup>83</sup> entre otras.<sup>70, 84</sup> Figura 4.

Se ha evidenciado que las mutaciones en algunos aminoácidos modifica la interacción con ciertos ligando por ejemplo en *S. pombe* al realizar la mutante Y5A esta disminuye considerablemente su afinidad a los ligandos ricos en poli-L- prolina<sup>85</sup> así como la mutación Y6F en



**Figura 3.** Ligandos que se unen a la profilina 5 de *Arabidopsis thaliana* (PRF5). Esta proteína presente en polen de dicha especie se une a ligando como: Calcium ATPase 2 (ACA2), Arabino-galactan proteins 6 (AGP6), shaggy-related protein kinase beta (ASKBETA), aspartyl protease family protein (AT4G04460), *Arabidopsis thaliana* cell wall invertase 2 (AtcwINV2), plastocyanin-like domain-containing protein (AT1G79800), Maternal Effect Embryo arrest 48 (MEE48), RALF-LIKE 15 (Rapid Alkalinization Factor (RALFL15)), SKU5 Similar 12 (sks12), VANGUARD1 (enzyme inhibitor/ pectinesterase VGD1).



**Figura 4.** Sitios de interacción de profilina de *Hevea brasiliensis* (PDB: 1G5U). En esta imagen se representan en puntos de diversos colores los sitios de interacción de la profilina con diferentes ligandos. En puntos de color naranja se representa el sitio de interacción putativo con PIP2, de color azul se muestra el sitio de interacción con actina y de color rosa se muestra el sitio de interacción a polímeros de poli-L-prolina. Como se puede observar los sitios están espacialmente separados.

una profilina de humano disminuye la afinidad al mismo ligando;<sup>87</sup> sin embargo al realizar esta misma mutante Y6F en la profilina 4 de maíz (ZmPRO4) se ve el efecto contrario, se aumenta la afinidad a poli-L-prolina sin afectar la afinidad a la actina.<sup>87</sup>

En ratones ocurre un caso muy particular, en donde el ARNm que codifica para esta proteína sufre una forma de splicing dando como resultado una profilina que no puede unirse a la G-actina.<sup>32</sup> Otro caso reportado es la profilina del virus Vaccinia la cual no se une a polímeros de L-prolina (pLp).<sup>36</sup> Como podemos ver, las profilinas son proteínas de gran importancia en muchos procesos celulares. Lo cual puede explicar un poco la alta conservación de estas proteínas y además la presencia de más de una isoforma en diversas especies. Además también se les han atribuido propiedades alérgicas.

#### Profilina como alérgeno

Las enfermedades alérgicas son un problema de salud pública a nivel mundial, afectando alrededor del 15% de la población principalmente en países industrializados.

Los alérgenos pueden provenir de diversas fuentes como son ácaros, caspa y pelo de animales, medicamentos, alimentos y de plantas principalmente de su polen, entre otros.

Las profilinas provenientes de plantas son consideradas como potentes alérgenos en pacientes con alergia al polen y/o alimentos, con un alto porcentaje de unión de anticuerpos IgE del suero de pacientes a profilinas de distintas fuentes.<sup>4,21,62,63,68</sup>

Durante las últimas tres décadas, los investigadores se han dado a la tarea de secuenciar el marco de lectura abierto que codifica para las profilinas, así como la secuencia de aminoácidos en organismos unicelulares y animales. Actualmente muchos grupos de investigación enfocan sus estudios en las profilinas de plantas debido a su importante participación como alérgeno. La primera identificación de la profilina como alérgeno, fue en el polen del árbol del abedul, *Betula verrucosa*,<sup>4,17</sup> posteriormente algunos investigadores han centrado sus estudios en la búsqueda de profilinas alérgicas presentes en otros pólenes con importancia etiológica notable, como: *Phleum pratense*,<sup>18,88</sup> *Lolium perenne*,<sup>89</sup>

*Artemisia vulgaris*,<sup>90,91</sup> *Zea mays*,<sup>92</sup> *Triticum aestivum*, *Ambrosia elatior*, *Olea europaea*, *Corylus avellana*, *Alnus glutinosa*, *Castanea sativa*. Y con menor capacidad sensibilizante, o de más reciente descripción, tenemos: *Mercurialis annua*, *Crocus sativus*, *Zygophyllum fabago*, *Ricinus communis*, *Brassica napus*, entre otros.<sup>17,18,62,88,93-98</sup> Identificándose hasta ahora profilinas en una gran variedad de alimentos de origen vegetal incluyendo las frutas rosáceas, siendo reportadas hasta el momento más de 800 secuencias de profilina y sus isoformas de diferentes organismos (<http://www.uniprot.org/>) de las cuales 73 están reportadas como alérgenos en la página de <http://www.allergome.org/> debido a que se tienen experimentos que demuestran la alérgenicidad de estas proteínas presentes en 43 especies diferentes (Tabla 2). Además se han resuelto tridimensionalmente más de 40 profilinas de las 800 reportadas (<http://www.pdb.org>).

Las profilinas de abedul, gramíneas y Artemisa presentan alta identidad en su secuencia de aminoácidos, cercana al 80%, y tienen una antígenicidad y alérgenicidad similares.<sup>99-101</sup>

**Tabla 2.** Profilinas de distintas fuentes reportadas como alérgicas, de acuerdo a la base de datos de Allergome.org. (<http://www.allergome.org>) (Continúa en la siguiente página)

Nomenclatura	Nombre común de la fuente	Código allergome
Act d 9.0101	<i>Actinidia deliciosa</i> , <i>Actinidiaceae</i> , Chinese Gooseberry, Green Kiwi, Plants, Yangtao	5741
Ama r 2.0101	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , Careless Weed, Plants, Redroot Amaranth, Redroot Pigweed, Spiny Amaranth	8184
Ama v 2.0101	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , Plants, Slender Amaranth	9449
Ama v 2.0201	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , Plants, Slender Amaranth	9450
Amb a 8.0101	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , <i>Ambrosia elatior</i> , <i>Asteraceae</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Short Ragweed	2536
Amb a 8.0102	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , <i>Ambrosia elatior</i> , <i>Asteraceae</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Short Ragweed	2537
Ana c 1.0101	<i>Ananas comosus</i> , <i>Bromeliaceae</i> , Pineapple, Plants	3075
Api g 4.0101	<i>Apiaceae</i> , <i>Apium graveolens</i> , Celeriac, Celery, Plants	5996
Ara h 5.0101	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Fabaceae</i> , Groundnut, Legumes, Peanut, Plants	3097
Art v 4.0101	<i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Asteraceae</i> , English Mugwort, Mugwort/Ragweed-related Species, Plants	1652
Art v 4.0201	<i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Asteraceae</i> , English Mugwort, Mugwort/Ragweed-related Species, Plants	1653
Bet v 2.0101	<i>Betula pendula</i> , <i>Betula verrucosa</i> , <i>Betulaceae</i> , Birch, Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Fagales</i> , Plants, Silver Birch	3136
Beta v 2.0101	<i>Amaranthaceae</i> , Beetroot, <i>Beta vulgaris</i> , Common Beet, Plants	5815
Cap a 2.0101	Bellpepper, <i>Capsicum annuum</i> , Paprika, Plants, <i>Solanaceae</i>	3177
Che a 2.0101	<i>Amaranthaceae</i> , <i>Chenopodium album</i> , Goosefoot, Lamb's-quarters, Plants	3189

**Tabla 2.** Profilinas de distintas fuentes reportadas como alergénicas, de acuerdo a la base de datos de Allergome.org. (<http://www.allergome.org>) (Continúa en la siguiente página)

Nomenclatura	Nombre común de la fuente	Código allergome
Cit s 2.0101	<i>Citrus sinensis</i> , Plants, <i>Rutaceae</i> , Sweet Orange	3200
Cor a 2.0101	Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Corylaceae</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i> , Hazelnut, Plants	3217
Cor a 2.0102	Birch/Hazel/Oak-related Species, <i>Corylaceae</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i> , Hazelnut, Plants	3218
Cro s 2.0101	<i>Crocus sativus</i> , <i>Iridaceae</i> , Plants, Saffron, Saffron Crocus	3222
Cuc m 2.0101	Cantaloupe, <i>Cucumis melo</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , Muskmelon, Plants	3230
Cyn d 12.0101	Bermuda grass, <i>Cynodon dactylon</i> , Grasses, <i>Panicum dactylon</i> , Plants, <i>Poaceae</i>	3233
Dau c 4.0101	<i>Apiaceae</i> , Carrot, Carrots, <i>Daucus carota</i> , Plants	3245
Fra a 4.0101	<i>Fragaria ananassa</i> , Plants, <i>Rosaceae</i> , Strawberry	3287
Gly m 3.0101	<i>Fabaceae</i> , <i>Glycine hispida</i> , <i>Glycine max</i> , Legumes, Plants, Soy, Soyabean	373
Gly m 3.0102	<i>Fabaceae</i> , <i>Glycine hispida</i> , <i>Glycine max</i> , Legumes, Plants, Soy, Soyabean	374
Hel a 2.0101	<i>Asteraceae</i> , <i>Helianthus annuus</i> , Mugwort/Ragweed-related Species, Plants, Sunflower	3307
Hev b 8.0101	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	398
Hev b 8.0102	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	399
Hev b 8.0201	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	400
Hev b 8.0202	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	401
Hev b 8.0203	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	402
Hev b 8.0204	<i>Euphorbiaceae</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , Latex, Plants, Rubber Tree, <i>Siphonia brasiliensis</i>	403
Hor v 12.0101	Barley, Grasses, <i>Hordeum sativum</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , Plants, <i>Poaceae</i>	3327
Hum j 2	<i>Cannabaceae</i> , <i>Humulus japonicus</i> , <i>Humulus scandens</i> , Japanese Hop, Plants	1693
Lit c 1.0101	Lichee, Litchi, <i>Litchi chinensis</i> , Lychee, <i>Nephelium litchi</i> , Plants, <i>Sapindaceae</i>	3353
Mal d 4.0101	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2414
Mal d 4.0102	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2415
Mal d 4.0201	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2416
Mal d 4.0202	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2417
Mal d 4.0301	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2418
Mal d 4.0302	Apple, <i>Malus domestica</i> , Plants, <i>Rosaceae</i>	2419
Man i 3.01	<i>Anacardiaceae</i> , <i>Mangifera indica</i> , Mango, Plants	3782
Man i 3.02	<i>Anacardiaceae</i> , <i>Mangifera indica</i> , Mango, Plants	3783
Mer a 1.0101	Annual Mercury, <i>Euphorbiaceae</i> , <i>Mercurialis annua</i> , Plants	3375
Mus a 1.0101	Banana, <i>Musa acuminata</i> , <i>Musa cavendishii</i> , <i>Musaceae</i> , Plants, Wild Banana	7633
Ole e 2.0101	<i>Olea europaea</i> , <i>Oleaceae</i> , Olive Tree, Olive-related Species, Plants	3383
Ory s 12.0101	Grasses, <i>Oryza sativa</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Rice	3395
Par j 3.0101	<i>Parietaria</i> , <i>Parietaria diffusa</i> , <i>Parietaria judaica</i> , Pellitory, Plants, <i>Urticaceae</i>	511
Par j 3.0102	<i>Parietaria</i> , <i>Parietaria diffusa</i> , <i>Parietaria judaica</i> , Pellitory, Plants, <i>Urticaceae</i>	512
Phl p 12.0101	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3416
Phl p 12.0102	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3490
Phl p 12.0103	Grasses, <i>Phleum pratense</i> , Plants, <i>Poaceae</i> , Timothy Grass	3417
Pho d 2.0101	<i>Arecaceae</i> , Date Palm, <i>Phoenix dactylifera</i> , Plants	3423
Pru av 4.0101	Cherry, Plants, <i>Prunus avium</i> , <i>Rosaceae</i> , Sweet Cherry	3450
Pru du 4.0101	Almond, Almond Tree, <i>Amygdalus communis</i> , Plants, <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Rosaceae</i>	3452
Pru du 4.0102	Almond, Almond Tree, <i>Amygdalus communis</i> , Plants, <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Rosaceae</i>	3453



**Tabla 2.** Profilinas de distintas fuentes reportadas como alérgicas, de acuerdo a la base de datos de Allergome.org. (<http://www.allergome.org>) (Continuación)

Nomenclatura	Nombre común de la fuente	Código allergome
Pru p 4.0101	<i>Amygdalus persica</i> , Nectarine, Peach, <i>Persica vulgaris</i> , Plants, <i>Prunus persica</i> , <i>Rosaceae</i>	737
Pru p 4.0201	<i>Amygdalus persica</i> , Nectarine, Peach, <i>Persica vulgaris</i> , Plants, <i>Prunus persica</i> , <i>Rosaceae</i>	738
Pyr c 4.0101	Pear, Plants, <i>Pyrus communis</i> , <i>Rosaceae</i>	3459
Sal k 4.0101	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	8171
Sal k 4.0201	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	8201
Sal k 4.0301	<i>Amaranthaceae</i> , Plants, Russian-thistle, <i>Salsola kali</i> , <i>Salsola pestifer</i>	10365
Sin a 4.0101	Bird Rape, <i>Brassica alba</i> , <i>Brassicaceae</i> , Plants, <i>Sinapis alba</i> , Turnip, White Mustard	7637
Sola l 1.0101	<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Lycopersicon lycopersicum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , Plants, <i>Solanaceae</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> , Tomato	3358
Tri a 12.0101	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3498
Tri a 12.0102	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3499
Tri a 12.0103	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	3500
Tri a 12.0104	Grasses, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Triticum aestivum</i> , Wheat	5901
Zea m 12.0101	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3530
Zea m 12.0102	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3531
Zea m 12.0103	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3532
Zea m 12.0104	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3538
Zea m 12.0105	Corn, Grasses, Maize, Plants, <i>Poaceae</i> , <i>Zea mays</i>	3533

Las profilinas alérgicas de plantas tienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Mientras que las profilinas no alérgicas provenientes de otros eucariontes presentan una menor identidad, cercana al 30%.<sup>102-103</sup> Un dato interesante es que la secuencia de los extremos amino y carboxilo terminal de las profilinas de animales inferiores, plantas y hongos están altamente conservadas, mientras que entre los vertebrados son altamente divergentes.<sup>42</sup> Se puede observar el alto grado de conservación de estas secuencias. Esta característica es la responsable de la actividad cruzada que se presenta en esta familia de panalérgenos. Figura 5

En el norte y el centro de Europa se ha reportado que las profilinas están dentro de los cuatro principales alérgenos en importancia, debido a que los pacientes alérgicos a rosáceas presentan reacción cruzada por polinosis de abedul y/o gramíneas, con reconocimiento de anticuerpos IgE a la profilina en menos de 20% de los casos.<sup>104-106</sup> Esta reactividad cruzada, se debe en gran parte a la alta conservación de la secuencia de aminoácidos y a su amplia homología de estructura terciaria.

Como se ha descrito las profilinas son importantes alérgenos, provenientes del polen de árboles, malezas, hierbas y algunos alimentos. Otros estudios han descrito que la profilina proveniente del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), también conocida como Hev b 8, es reconocida por anticuerpos IgE en 100% de pacientes con espina bífida y en 95% en personas alérgicas al látex que trabajan para el sector salud.<sup>107,108</sup> En niños con espina bífida y adultos alérgicos al látex la profilina es un alérgeno relevante desde el punto de vista de frecuencia de reconocimiento *in vivo* para ambos grupos, pero es escasa la presencia en extractos de látex natural y posee baja afinidad de fijación de IgE.<sup>109-110</sup>

Se han determinado anticuerpos IgE específicos de profilinas de *Amaranthus* en pacientes alérgicos. En la India, se realizó un estudio en donde determinaron el reconocimiento de IgE de sueros de pacientes alérgicos al polen del *Amaranthus spinosus* observando la presencia de IgE que reconocían una proteína de aproximadamente 14 kDa de masa molecular<sup>111</sup> la cual se puede proponer que sea una profilina. Estudios similares realizados por

diferentes grupos de investigación han observado la importante alergenicidad de la profilina de otras especies de *Amaranthus* como son *Amaranthus viridis*<sup>112</sup> y *Amaranthus retroflexus*<sup>113</sup> teniendo como resultado la completa identificación de las profilinas como alérgenos y la secuenciación de tres profilinas, dos de *Amaranthus viridis* y una de *Amaranthus retroflexus* así como su clonación.

Recientemente demostramos la participación importante de profilinas del polen de *Amaranthus palmeri* en la sensibilización de personas alérgicas. Encontramos cuatro isoformas de profilina en el polen de esta fuente. Además, proponemos que dos de estas isoformas de profilina comparten epítopes de reconocimiento por IgE con otras profilinas, como la profilina de látex (Hev

b8). En base a esto proponemos que existen epítopes compartidos responsable de la alergenicidad y el reconocimiento cruzado que se observa en el estudio de pacientes alérgicos.

### Impacto socioeconómico de las enfermedades alérgicas

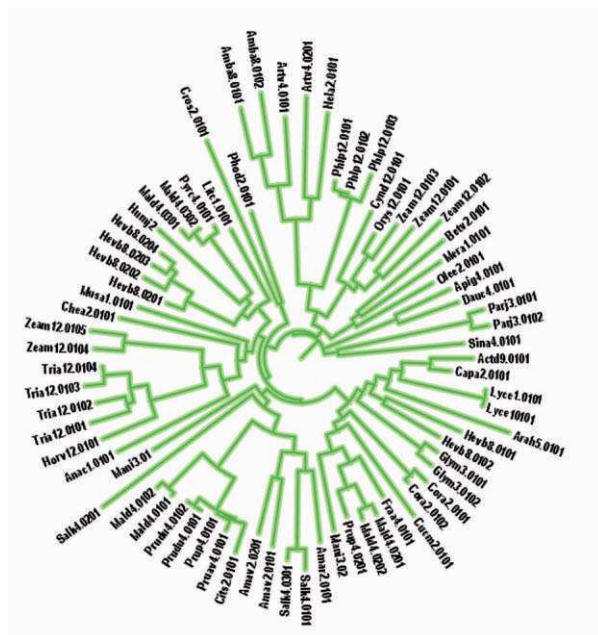
En las últimas décadas se ha observado un incremento global en la prevalencia de enfermedades alérgicas, principalmente en los países desarrollados. Esto representa un gasto importante en los cuidados de salud. Por ejemplo, en EEUU el costo anual para tratar el asma alérgica es cercano a 6 billones de dólares.<sup>114,115</sup> Se estima que entre el 15 y 30% de la población mundial es afectada por enfermedades alérgicas, siendo el asma, la rinitis y la dermatitis atópica las más frecuentes. Se ha reportado que 21.6% de los adultos españoles tienen síntomas de alergia, principalmente de rinoconjuntivitis; las tres principales fuentes alérgicas fueron, en primer lugar pólenes (31.5%), en segundo lugar medicamentos (29.4%) y en tercer lugar los ácaros de polvo doméstico (25.3%), con los aeroalérgenos como la primera y tercera causa alérgica.<sup>116</sup>

Aunque los alérgenos ambientales y alimentarios están ampliamente distribuidos, se ha observado que menos de un tercio de la población, desarrolla enfermedad alérgica por el mecanismo de hipersensibilidad de tipo I.<sup>117</sup> En Venezuela, trabajos recientes reportan que el asma, la rinitis y la dermatitis atópica afectan a casi dos tercios de la población de riesgo.<sup>118</sup>

En México hay pocos estudios de la prevalencia de las enfermedades alérgicas en la población abierta. En la Ciudad de México un estudio de 2009 reportó que 42.6% de la población presenta algún tipo de alergia, predominantemente rinitis alérgica en la infancia, como ocurre en los países de habla inglesa y algunos de América Latina. Ahí también se comunica que hay ausentismo escolar y laboral en 3.37 y 6.2 días/año, que causa un gasto de 10 a 20% del ingreso mensual familiar, sin considerar la falta de ingresos derivada del ausentismo.<sup>119-121</sup>

### CONCLUSIONES

Las profilinas son alérgenos importantes, presentes en muchas especies de diferente reino, principalmente el reino



**Figura 5.** Arbol filogenético de profilinas alérgicas. Se utilizaron las mismas 73 secuencias de 43 especies diferentes para hacer el árbol filogenético utilizando el programa Fig Tree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Se puede observar la formación de al menos cuatro grupos principales algunos bien definidos por las características de la fuente de donde proviene la profilina y otros grupos en donde se observa isoformas de profilinas divergentes a su especie, un ejemplo es (izquierda) se agrupan las profilinas de *Zea mays* (cereal) con las profilinas de *Triticum aestivum* (cereal), sin embargo podemos observar otras profilinas de *Zea mays* (cereal) agrupadas con *Phleum pratense* (pasto), *Cynodon dactylon* (pasto), *Betula verrucosa* (árbol), esto nos permite sugerir que estos agrupamientos pueden ser otro indicio de la reactividad cruzada que presentan los pacientes alérgico.

Plantae. Las profilinas participan frecuentemente en la actividad cruzada en pacientes sensibilizados con alérgenos de diferentes fuentes, lo cual aumenta el interés para el estudio clínico y básico de estas proteínas. Nuestro trabajo experimental, acerca de la identificación de profilinas en pólenes y su vínculo clínico en pacientes alérgicos, es pionero en México. Nuestras figuras muestran una alta homología en la secuencia de aminoácidos y en la estructura tridimensional de las profilinas, que sugiere similitud de epitopes con importancia clínica. La homología antigénica de las profilinas favorece la oportunidad de sintetizar proteínas recombinantes, que pueden utilizarse como una modalidad de inmunoterapia óptima a futuro.

### Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el programa de becas de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de convenio 54626, por COFAA-IPN y SIP-IPN proyecto registrado como SIP-20080691 y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF).

De la misma manera se le agradece a CONACyT y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional por las becas de manutención otorgadas al M. en C. César Manuel Landa Pineda.

### REFERENCIAS

- Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 1977 Sep 25; 115(3):465-83. PMID: 563468.
- Reichstein E, Korn ED. Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation. *J Biol Chem.* 1979 Jul 10; 254(13):6174-9. PMID: 447705.
- Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M. The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2007; 159:131-49. Review. PMID: 17682948.
- Valenta R, Duchêne M, Breitenbach M, Pettenburger K, Koller L, Rumpold H, Scheiner O, Kraft D. A low molecular weight allergen of white birch (*Betula verrucosa*) is highly homologous to human profilin. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; 94(1-4):368-70. PMID: 1937902.
- Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 2004 Aug;14(8):461-9. Review. PMID: 15308213.
- Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 2004 Jul;14(7):386-94. Review. PMID: 15246432.
- Haarer BK, Brown SS. Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1990; 17(2):71-4. PMID: 2257632.
- Valster AH, Vidali L, Hepler PK. Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. *Protoplasma.* 2003 Sep;222(1-2):85-95. PMID: 14513314.
- Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):3832-6. Epub 2001 Mar 13. PMID: 11274401.
- Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M. Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell.* 1994 Oct 21;79(2):303-14. PMID: 7954798.
- Janke J, Schlüter K, Jandrig B, Theile M, Köble K, Arnold W, Grinstein E, Schwartz A, Estevéz-Schwarz L, Schlag PM, Jockusch BM, Scherneck S. Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med.* 2000 May 15;191(10):1675-86. PMID: 10811861.
- Roy P, Jacobson K. Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004 Feb;57(2):84-95. PMID: 14691948.
- Zou L, Jaramillo M, Whaley D, Wells A, Panchapaksa V, Das T, Roy P. Profilin-1 is a negative regulator of mammary carcinoma aggressiveness. *Br J Cancer.* 2007 Nov 19;97(10):1361-71. Epub 2007 Oct 16. PMID: 17940506.
- Zou L, Hazan R, Roy P. Profilin-1 overexpression restores adherens junctions in MDA-MB-231 breast cancer cells in R-cadherin-dependent manner. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009 Dec;66(12):1048-56. doi: 10.1002/cm.20407. PMID: 19593789.
- Wittenmayer N, Jandrig B, Rothkegel M, Schlüter K, Arnold W, Haensch W, Scherneck S, Jockusch BM. Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol Biol Cell.* 2004 Apr;15(4):1600-8. Epub 2004 Feb 6. PMID: 14767055.
- Kondo T, Shirasawa T, Itoyama Y, Mori H. Embryonic genes expressed in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett.* 1996 May 17;209(3):157-60. PMID: 8736634.
- Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science.* 1991 Aug 2;253(5019):557-60. PMID: 1857985.
- Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med.* 1992 Feb 1;175(2):377-85. PMID: 1370681.
- Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wüthrich B, Hausteiner D, Vieths S. Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (*Pyr c 4*), cherry (*Pru av 4*) and celery (*Api g 4*) with birch pollen profilin *Bet v 2*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 May 25;756(1-2):315-25. PMID: 11419723.

20. Fernández Rivas M. [Cross-reactivity between fruit and vegetables]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2003 May-Jun;31(3):141-6. Review. Spanish. PMID: 12783764.
21. Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Díaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G, Rodríguez R. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 May;106(5):429-35. doi: 10.1016/j.anai.2011.01.001. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21530876.
22. Carlsson L, Nyström L, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. Profilin, a low-molecular weight protein controlling actin polymerisability. In: Perry SV, Marzella A, Adelstein RS (eds) *Contractile systems in non muscle tissues*. North Holland Publishing, Amsterdam, 1976; pp 39–49
23. Blasco R, Cole NB, Moss B. Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J Virol*. 1991 Sep; 65(9):4598-608. PMID: 1870190.
24. Bitko V, Oldenburg A, Garmon NE, Barik S. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiol*. 2003 May 9; 3:9. PMID: 12740026.
25. Burke E, Mahoney NM, Almo SC, Barik S. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol*. 2000 Jan; 74(2):669-75. PMID: 10623728.
26. Zeile WL, Condit RC, Lewis JI, Purich DL, Southwick FS. Vaccinia locomotion in host cells: evidence for the universal involvement of actin-based motility sequences ABM-1 and ABM-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10; 95(23):13917-22. PMID: 9811901.
27. Polet D, Lambrechts A, Vandepoele K, Vandekerckhove J, Ampe C. On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins. *FEBS Lett*. 2007 Jan 23;581(2):211-7. Epub 2006 Dec 14. PMID: 17187785.
28. Braun A, Aszódi A, Hellebrand H, Berna A, Fässler R, Brandau O. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene*. 2002 Jan 23; 283(1-2):219-25. PMID: 11867228.
29. Arasada R, Gloss A, Tunggal B, Joseph JM, Rieger D, Mondal S, Faix J, Schleicher M, Noegel AA. Profilin isoforms in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*. 2007 May; 1773(5):631-41. Epub 2007 Mar 24. PMID: 17467078.
30. Polet D, Lambrechts A, Ono K, Mah A, Peelman F, Vandekerckhove J, Baillie DL, Ampe C, Ono S. *Caenorhabditis elegans* expresses three functional profilins in a tissue-specific manner. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2006 Jan; 63(1):14-28. PMID: 16317718.
31. Lambrechts A, Braun A, Jonckheere V, Aszodi A, Lanier LM, Robbins J, Van Colen I, Vandekerckhove J, Fässler R, Ampe C. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol*. 2000 Nov; 20(21):8209-19. PMID: 11027290.
32. Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci*. 2000 Nov; 113 Pt 21:3795-803. PMID: 11034907.
33. Cooley L, Verheyen E, Ayers K. Chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell*. 1992 Apr 3; 69(1):173-84. PMID: 1339308.
34. Honoré B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett*. 1993 Sep 13; 330(2):151-5. PMID: 8365484.
35. Somboonwivat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol*. 2006 Jan 31; 39(1):26-36. PMID: 16466635.
36. Machesky LM, Cole NB, Moss B, Pollard TD. Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*. 1994 Sep 6; 33(35):10815-24. PMID: 1085084.
37. Schlüter K, Jockusch BM, Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Nov 27; 1359(2):97-109. Review. PMID: 9409807.
38. Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y. Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol*. 2001; 9(4):265-74. PMID: 11423726.
39. Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C. Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol Hum Reprod*. 2005 Jan; 11(1):53-64. Epub 2004 Dec 10. PMID: 15591451.
40. Tanaka H, Iguchi N, Egydio de Carvalho C, Tadokoro Y, Yomogida K, Nishimune Y. Novel actin-like proteins T-ACTIN 1 and T-ACTIN 2 are differentially expressed in the cytoplasm and nucleus of mouse haploid germ cells. *Biol Reprod*. 2003 Aug; 69(2):475-82. Epub 2003 Apr 2. PMID: 12672658.
41. Tilney LG, Bonder EM, Coluccio LM, Mooseker MS. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol*. 1983 Jul; 97(1):112-24. PMID: 6863386.
42. Huang S, McDowell JM, Weise MJ, Meagher RB. The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol*. 1996 May; 111(1):115-26. PMID: 8685262.
43. Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB. Plant profilin isovariants are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2002 May; 52(1):22-32. PMID: 11977080.
44. Jeong YM, Mun JH, Lee I, Woo JC, Hong CB, Kim SG. Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profilin gene family members. *Plant Physiol*. 2006 Jan;140(1):196-209. Epub 2005 Dec 16. PMID: 16361517.
45. Christensen HE, Ramachandran S, Tan CT, Surana U, Dong CH, Chua NH. Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J*. 1996 Aug;10(2):269-79. PMID: 8771785.
46. McKinney EC, Kandasamy MK, Meagher RB. Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isovariant, PRF1, alter seedling development. *Plant Cell*. 2001 May;13(5):1179-91. PMID: 11340190.



47. Wang Z, Guo CQ, Ren HY. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao. [Profilins in plant cells]. . 2006 Jun;32(3):261-70. Review. Chinese. PMID: 16775392.
48. Van Damme D, Bouget FY, Van Poucke K, Inzé D, Geelen D. Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J*. 2004 Nov;40(3):386-98. PMID: 15469496.
49. Marmagne A, Ferro M, Meinel T, Bruley C, Kuhn L, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G. A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Nov;6(11):1980-96. Epub 2007 Jul 20. PMID: 17644812.
50. Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One*. 2008 Apr 23;3(4):e1994. doi: 10.1371/journal.pone.0001994. PMID: 18431481.
51. Davis AJ, Im YJ, Dubin JS, Tomer KB, Boss WF. Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 binds F-actin and recruits phosphatidylinositol 4-kinase beta1 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):14121-31. Epub 2007 Mar 21. PMID: 17379598.
52. Deeks MJ, Cvrcková F, Machesky LM, Mikitová V, Ketelaar T, Zársky V, Davies B, Hussey PJ. Arabidopsis group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *New Phytol*. 2005 Dec;168(3):529-40. PMID: 16313636.
53. Ito J, Bath TS, Petzold CJ, Redding-Johanson AM, Mukhopadhyay A, Verboom R, Meyer EH, Millar AH, Heazlewood JL. Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1571-82. doi: 10.1021/pr1009433. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21166475.
54. Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E. DNA array analyses of Arabidopsis thaliana lacking a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J*. 2004 Dec;40(5):752-71. PMID: 15546358.
55. Kandasamy MK, Burgos-Rivera B, McKinney EC, Ruzicka DR, Meagher RB. Class-specific interaction of profilin and ADF isovariants with actin in the regulation of plant development. *Plant Cell*. 2007 Oct;19(10):3111-26. Epub 2007 Oct 12. PMID: 17933902.
56. Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S. Proteome mapping of mature pollen of Arabidopsis thaliana. *Proteomics*. 2005 Dec;5(18):4864-84. PMID: 16247729.
57. Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2008 Nov;148(3):1201-11. doi: 10.1104/pp.108.126375. Epub 2008 Sep 5. PMID: 18775970.
58. Noir S, Bräutigam A, Colby T, Schmidt J, Panstruga R. A reference map of the Arabidopsis thaliana mature pollen proteome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 2;337(4):1257-66. Epub 2005 Oct 7. PMID: 16242667.
59. Becker JD, Boavida LC, Carneiro J, Haury M, Feijó JA. Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol*. 2003 Oct;133(2):713-25. Epub 2003 Sep 18. PMID: 14500793.
60. Wellmer F, Riechmann JL, Alves-Ferreira M, Meyerowitz EM. Genome-wide analysis of spatial gene expression in Arabidopsis flowers. *Plant Cell*. 2004 May;16(5):1314-26. Epub 2004 Apr 20. PMID: 15100403.
61. Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):501-6. Epub 2005 Apr 3. PMID: 15806101.
62. Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(4):287-94. PMID: 1597349.
63. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May; 964:47-68. Review. PMID: 12023194.
64. Wiedemann P, Giehl K, Almo SC, Fedorov AA, Girvin M, Steinberger P, Rüdiger M, Ortner M, Sippl M, Dolecek C, Kraft D, Jockusch B, Valenta R. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 1996 Nov 22; 271(47):29915-21. PMID: 8939935.
65. Kursula I, Kursula P, Ganter M, Panjikar S, Matuschewski K, Schüler H. Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure*. 2008 Nov 12;16(11):1638-48. doi: 10.1016/j.str.2008.09.008. PMID: 19000816.
66. Domke T, Federau T, Schlüter K, Giehl K, Valenta R, Schomburg D, Jockusch BM. Birch pollen profilin: structural organization and interaction with poly-(L-proline) peptides as revealed by NMR. *FEBS Lett*. 1997 Jul 14; 411(2-3):291-5. PMID: 9271223.
67. Metzler WJ, Farmer BT 2nd, Constantine KL, Friedrichs MS, Lavoie T, Mueller L. Refined solution structure of human profilin I. *Protein Sci*. 1995 Mar;4(3):450-9. PMID: 7795529.
68. Verdino P, Barderas R, Villalba M, Westritschnig K, Valenta R, Rodriguez R, Keller W. Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2313-21. PMID: 18250440.
69. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 1996 Oct 18; 87(2):227-39. PMID: 8861907.
70. Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J*. 1995 Apr 18; 14(8):1583-9. PMID: 7737110
71. Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J*. 1998 Feb 16; 17(4):967-76. PMID: 9463375

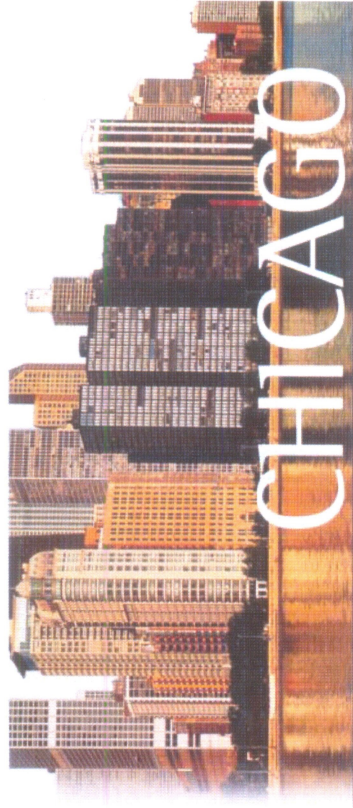
72. Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y. Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Feb 4; 243(1):86-9. PMID: 9473484
73. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with SMN in nuclear gems. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31; 274(53):37908-14. PMID: 10608857.
74. Skare P, Karlsson R. Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett*. 2002 Jul 3;522(1-3):119-24. PMID: 12095630.
75. Chik JK, Lindberg U, Schutt CE. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *J Mol Biol*. 1996 Nov 8; 263(4):607-23. PMID: 8918942.
76. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*. 1993 Oct 28; 365(6449):810-6. PMID: 8413665.
77. Schutt CE, Rozycki MD, Chik JK, Lindberg U. Structural studies on the ribbon-to-helix transition in profilin: actin crystals. *Biophys J*. 1995 Apr; 68(4 Suppl):12S-17S; discussion 17S-18S. Review. PMID: 7787053.
78. Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*. 1985 Apr 4-10; 314(6010):472-4. PMID: 2984579.
79. Bhargavi V, Chari VB, Singh SS. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochem Mol Biol Int*. 1998 Oct;46(2):241-8. PMID: 9801792.
80. Mahoney NM, Rozwarski DA, Fedorov E, Fedorov AA, Almo SC. Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat Struct Biol*. 1999 Jul;6(7):666-71. PMID: 10404225.
81. Gareus R, Di Nardo A, Rybin V, Witke W. Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2803-11. Epub 2005 Nov 29. PMID: 16319076.
82. Mondin M, Carta M, Normand E, Mülle C, Coussen F. Profilin II regulates the exocytosis of kainate glutamate receptors. *J Biol Chem*. 2010 Dec 17;285(51):40060-71. doi: 10.1074/jbc.M110.140442. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937818.
83. McCaffery CA, DeGennaro LJ. Determination and analysis of the primary structure of the nerve terminal specific phosphoprotein, synapsin I. *EMBO J*. 1986 Dec 1;5(12):3167-73. PMID: 3028773.
84. Wear MA, Schafer DA, Cooper JA. Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol*. 2000 Dec 14-28;10(24):R891-5. Review. PMID: 11137023.
85. Lu J, Pollard TD. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2001 Apr;12(4):1161-75. PMID: 11294914.
86. Sohn RH, Chen J, Koblan KS, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8;270(36):21114-20. PMID: 7673143.
87. Gibbon BC, Zonia LE, Kovar DR, Hussey PJ, Staiger CJ. Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell*. 1998 Jun;10(6):981-93. Erratum in: *Plant Cell* 1999 Aug;11(8):1603. PMID: 9634586.
88. Laffer S, Vrtala S, Duchêne M, van Ree R, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. IgE-binding capacity of recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Jul;94(1):88-94. PMID: 8027502.
89. De Canio M, D'Aguanno S, Sacchetti C, Petrucci F, Cavagni G, Nuccetelli M, Federici G, Urbani A, Bernardini S. Novel IgE recognized components of *Lolium perenne* pollen extract: comparative proteomics evaluation of allergic patients sensitization profiles. *J Proteome Res*. 2009 Sep;8(9):4383-91. PMID: 19585971
90. Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, Berger U, Horak F, Jäger S, Kraft D, Valenta R. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Feb;101(2 Pt 1):196-206. PMID: 9500752.
91. Wopfner N, Gadermaier G, Egger M, Asero R, Ebner C, Jahn-Schmid B, Ferreira F. The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Dec; 138(4):337-46. Epub 2005 Oct 24. Review. PMID: 16254437.
92. Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, Scibilia J, Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Pastorello EA, Cramer R. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*. 2006 Jan; 61(1):128-35. PMID: 16364168.
93. Vallverdú A, Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J, Palacios R. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Mar;101(3):363-70. PMID: 9525453.
94. Vallverdú A, García-Ortega P, Martínez J, Martínez A, Esteban MI, de Molina M, Fernández-Távora L, Fernandez J, Bartolomé B, Palacios R. *Mercurialis annua*: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 Apr; 112(4):356-64. PMID: 9104791.
95. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Aguirre M, Martínez A, Palacios R, Martínez J. Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Mol Immunol*. 1998 Jun; 35(8):469-78. PMID: 9798651.
96. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R. Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Exp Allergy*. 1997 Nov; 27(11):1307-13. PMID: 9420135.
97. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez J, Martínez A, Palacios R. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Sep; 100(3):365-72. PMID: 9314349.
98. Berrens L. What is a 'major' allergen? *Clin Exp Allergy*. 1994 Jul; 24(7):606-9; discussion 610-1. Review. PMID: 7953941.
99. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities

- with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (bich profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:962-9. PMID: 7751517.
100. Fritsch R, Ebner C, Kraft D. Allergenic crossreactivities: Pollens and vegetable foods. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15: 397-404. PMID: 9484577.
  101. Van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98: 97-104. PMID: 1643445.
  102. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jul;36(7):920-9. PMID: 16839408.
  103. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jan;117(1):141-7. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16387597.
  104. Fernández Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1239-47. PMID: 10469033.
  105. Fernández Rivas M, Van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 728-33. PMID: 9438478.
  106. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Pernas M, Fernández-Rivas M, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy*. 2000 Oct; 30(10):1403-10. PMID: 10998016.
  107. Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998 Jun; 116(2):83-92. PMID: 9652300.
  108. Reyes L. C. A. S, Rodríguez R. A, Características bioquímicas y moleculares de alérgenos de látex de Hevea brasiliensis. *Alerg Asma Inmunol Pediatr* 2002; 11 (3): 92-100.
  109. Mazón A, Nieto A, Linana JJ, Montoro J, Estornell F, García-Ibarra F. Latex sensitization in children with spina bifida: follow-up comparative study after two years. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000 Feb; 84(2):207-10. PMID: 10719778.
  110. Nieto A., Mazón A., Pamies R. et al. Espina bífida y alergia al látex. En: Blanco Cervera C, Quirce Gancedo S (ed). *Alergia al látex 2002*. Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica. Barcelona: MRA Editions, 2002.
  111. Singh AB, Dahiya P. Antigenic and allergenic properties of Amaranthus Spinosus pollen—a commonly growing weed in India. *Ann Agric Environ Med*. 2002; 9(2):147-51. PMID: 12498581
  112. Song JJ, Zhang HY and Liu ZG. Cloning of panallergen profilin from pollen and leaves of Amaranthus viridis L. Unpublished. Submitted (28-SEP-2007) College of Life Science, Institute of Allergy and Immunology, 3688 Nanhai Road, Shenzhen, Guangdong 518060, China.
  113. Tehrani M, Sankian M, Assarehzadegan MA, Jabbari F and Varasteh A. Cloning, Expression and Purification of Amaranthus retroflexus Pollen Allergen, Amaranthus r 2. Unpublished. Submitted (07-APR-2009) Immunobiochemistry, Avicenna Research Institute, Immunology Research Center, Bu-Ali Sq, Ferdosi Sq, Mashhad, Khurasan Razavi 9196773117, Iran
  114. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Jan 4; 344(1):30-7. PMID: 11136958.
  115. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Jan 11; 344(2):109-13. PMID: 11150362.
  116. Gaig P, et. al, Prevalencia de alergia en la población adulta española. *Alergología e inmunología clínica*. Vol. 19, Nº. 2, 2004, Págs. 68-74.
  117. Ponce P D. Historia clínica como factor de discriminación de sensibilización alérgica. Tesis doctoral UCV 2003.
  118. Aldrey O. El estudio ISAAC en Venezuela. Aceptado para publicación. *Rev Soc Ven Asma Alergia e Inmunol* Tesis doctoral UCV 2003.
  119. López PG, Morfín MBM, Huerta. LJ, Mejía CF y col. Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México. *Rev Alerg Mex* 2009;56(3):72-79.
  120. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C; and the ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007 Sep; 62(9):758-66. Epub 2007 May 15. PMID: 17504817
  121. ISAAC. Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998 Aug; 12(2):315-35. PMID: 9727780.
  122. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*. 1997 Jan 15;5(1):33-45. PMID: 901671.
  123. Liu S, Fedorov AA, Pollard TD, Lattman EE, Almo SC, Magnus KA. Crystal packing induces a conformational change in profilin-I from Acanthamoeba castellanii. *J Struct Biol*. 1998 Sep;123(1):22-9. PMID: 9774541.
  124. Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt CE. X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol*. 1999 Dec 17;294(5):1271-85. PMID: 10600384.
  125. Thorn KS, Christensen HE, Shigeta R, Huddler D, Shalaby L, Lindberg U, Chua NH, Schutt CE. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*. 1997 Jan 15;5(1):19-32. PMID: 9016723.
  126. Eads JC, Mahoney NM, Vorobiev S, Bresnick AR, Wen KK, Rubenstein PA, Haarer BK, Almo SC. Structure determination and characterization of Saccharomyces cerevisiae profilin. *Biochemistry*. 1998 Aug 11;37(32):11171-81. PMID: 9698363.

**WAO Symposium on  
Immunotherapy and Biologics**  
Chicago, IL, United States – 13-14 December 2013



A MEETING OF THE WORLD ALLERGY ORGANIZATION



## WAO TOP ABSTRACT AWARD

Presented to

**Cesar Manuel Landa**

For the Abstract Entitled

*Generation a hypoallergenic profilin from Amaranthus palmeri pollen*

at the 2013 WAO Symposium on Immunotherapy and Biologics,  
held in Chicago, IL, United States, 13-14 December 2013

Ruby Pawankar  
President, WAO  
Symposium Chair

Lanny J. Rosenwasser  
President – Elect, WAO  
Symposium Chair





**CMICA**

Colegio Mexicano de Inmunología  
Clínica y Alergia A.C.

**El Colegio Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia, A.C.**

Otorga el Presente

# DIPLOMA

A

**César Manuel Landa Pineda, Alejandro Rosas Alvarado, María de la Luz Hortensia García Cruz, Luis Manuel Terán Juárez, Guillermo Arturo Guidos Fogelbach, Adriana Martínez Martínez, Gabriela Juan Vallejo, Ileana Peña Gomar, Marisol López Hidalgo, Laurence**

**Annie Marchat, Aanalilia Arroyo Becerra, César Augusto Sandino Reyes López.**

**POR HABER OBTENIDO EL PRIMER LUGAR EN EL CONCURSO DE INVESTIGACIÓN "CMICA 2013", EN LA CATEGORÍA DE INMUNOLOGÍA BÁSICA, CON SU TRABAJO TITULADO:**

**Caracterización parcial de las profilinas alergénicas presentes en el polen de *Amaranthus palmeri***

Acapulco, Guerrero, a 10 de Agosto de 2013.

**Dr. Raúl Humberto Barnica Alvarado**  
Presidente

**Dr. Alfredo Arias Cruz**  
Secretario