

REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE PROFILINAS DE ORIGEN VEGETAL. UN ANÁLISIS IN SILICO

Cross-reactivity between profilins of plant origin. An in silico analysis

Emiliani Y^{1,3}, Cortina E¹, Múnera M¹, Sánchez A^{1,2}, Sánchez J², Aparicio D¹

RESUMEN

Antecedentes. Las profilinas son proteínas del citoesqueleto de las células eucariotas que se encargan de la proliferación y diferenciación celular. Se han caracterizado como alérgenos de alimentos vegetales, con capacidad de inducir síndromes alérgicos. Su amplia distribución hace importante su estudio en la reactividad cruzada.

Objetivo. Identificar in silico, potenciales regiones antigénicas involucradas en la reactividad cruzada de profilinas en alimentos.

Materiales y métodos. Seleccionamos 32 secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos Allergome. Se determinó su grado de identidad con la herramienta IBIVU PRALINE. Mediante el software MEGA se exploró la relación filogenética. Los modelos 3D se obtuvieron por modelamiento basado en homología. La predicción de epítopes con la herramienta Ellipro o en la base de datos IEDB. Los epítopes de reactividad cruzada se localizaron en los modelos 3D con el software PyMOL.

Resultados. El análisis filogenético mostró que las 32 profilinas fueron posicionadas en seis clados monofiléticos (A, B, C, D, E y F). El clado A comparte un nivel de identidad del 87% en sus secuencias de aminoácidos; el clado B, 86%; el clado C, 82%; el clado D, 86%; el clado E, 83%; y el clado F, 75%. Siete proteínas fueron modeladas. Se predijeron un total de 25 epítopes. En los clados A y B se encontraron tres epítopes; en el C, siete; y en los D, E y F, cuatro epítopes por cada clado.

Conclusión. Las profilinas son un grupo de proteínas altamente conservadas en estructura y aminoácidos, lo cual sugiere que el mimetismo molecular y los epítopes predichos en este estudio indican un alto potencial de reactividad cruzada.

Palabras clave: alimentos, alergia, profilinas, bioinformática, epítopes, reactividad cruzada.

ABSTRACT

Background: Profilins are proteins of the cytoskeleton of eukaryotic cells, they are responsible for cell proliferation and differentiation. They have been characterized as plant food allergens, with the ability to induce allergic syndromes. Its wide distribution makes its study in cross-reactivity important.

Objective: To identify in silico potential antigenic regions involved in the cross-reactivity of profilins in food.

Materials and Methods: We selected thirty-two amino acid sequences reported in the Allergome database. Their degree of identity was determined with the IBIVU PRALINE tool. Using the MEGA software, the phylogenetic relationship was explored. The 3D models were obtained by homology-based modeling. The prediction of epitopes with the Ellipro tool or in the IEDB database. Cross-reactivity epitopes were in 3D models with PyMOL software.

Results: Phylogenetic analysis showed that the thirty-two profilins were positioned in six monophyletic clades (A, B, C, D, E, and F). Clade A shares an identity level of 87% in its amino acid sequences, clade B 86%, clade C 82%, clade D 86%, clade E 83%, clade F 75%. Seven proteins were modeled. A total of twenty-five epitopes were predicted. Clades A and B were found three epitopes, the C seven and D, E, F four epitopes for each clade.

Conclusion: They are a group of proteins highly conserved in structure and amino acids, which suggests that the molecular mimicry and epitopes predicted in this study indicate a high potential for cross-reactivity.

Keywords: food, allergy, prophylins, bioinformatics, epitopes, cross-reactivity

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2023;54(1):15-26

INTRODUCCIÓN

La respuesta alérgica se considera una activación del sistema inmune de manera exacerbada ante la exposición a

alérgenos mediante anticuerpos IgE, principalmente, y células tales como mastocitos, basófilos y linfocitos Th2. Los alérgenos se encuentran en distintas fuentes biológicas como: mascotas, ácaros, polen y alimentos, entre otras. Si bien los alérgenos de alimentos son resistentes a la digestión enzimática por pepsina, son lábiles ante la desnaturalización por calor. Estas propiedades modifican la capacidad de sensibilización a través del tracto gastrointestinal¹.

Las reacciones alérgicas a alimentos tienen una prevalencia a nivel mundial del 2-8% en la población infantil y del 1-3% en la población adulta². Aunque se asocia más a la población infantil, se cree que en la medida en la que estos niños se vuelven adultos aumenta la tendencia a presentar padecimientos de este tipo. De acuerdo con datos de la WAO en el 2013, para América del Sur (Colombia) el 10% de los niños de 1 a 8 años y el 12% de 9 a 16 años presentan alergia alimentaria; otros estudios reportan que aproximadamente el 40-60% de los casos de alergia al pes-

1. Facultad de Salud, Grupo de Investigación Médica (GINU-MED), Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena, Colombia.
2. Grupo de Alergia Clínica y Experimental (GACE), Universidad IPS, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
3. Grupo de Investigación Infectología Pediátrica (GIINPED), Universidad de Cartagena, Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja, Cartagena, Colombia.

Correspondencia: Yuliana Emiliani Navarro. Médico general, Corporación Universitaria Rafael Núñez. Tel.: +57 301 594 9089. yemilianin10@cumvvirtual.edu.co

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 17/09/2022 | Aceptado: 07/11/2022

cado o al marisco comienzan en la edad adulta^{3,4}. Las alergias alimentarias desencadenan manifestaciones clínicas variables como problemas digestivos, urticaria e inflamación de las vías respiratorias. Los síntomas más comunes incluyen dolor abdominal, diarrea, flatulencias, náuseas, vómitos, erupciones cutáneas, hormigueo, picazón o rubor en labios, boca y garganta y algunas veces llegan a ser mortales como la anafilaxia, la cual puede presentarse en un 46,2% de los casos⁵.

En la alergia alimentaria existe algo llamado la lista de los Ocho Primeros Alérgenos, que incluye alimentos responsables de más del 90% de alergias alimentarias a nivel mundial⁶. Aunque no estén incluidos las frutas y los vegetales, tienen la capacidad de generar en individuos predispuestos reacciones alérgicas a los alimentos por la absorción de una variedad de productos de origen vegetal. En Colombia, las alergias alimentarias presentan una prevalencia general del 14,9%. Las frutas/verduras (41,8%), mariscos (26,6%) y carnes (20,8%) fueron las fuentes alérgicas más comunes y los síntomas mencionados con mayor frecuencia fueron en piel (61,4%), gastrointestinales (29,1%) y reacciones respiratorias (8,6%)⁷.

Los alimentos de origen vegetal son parte de una dieta saludable y su consumo se recomienda para la prevención de trastornos cardiovasculares y metabólicos. En estos alimentos encontraremos diferentes proteínas que son indispensable para nuestro cuerpo pero que se comportan como alérgenos; por ejemplo, las profilinas constituyen una familia de proteínas altamente conservadas, que están presentes en todas las células eucariotas, incluidas las plantas, hongos, protozoos, así como virus, y juegan un papel crucial en la regulación de la actividad en el sistema de microfilamentos y los niveles de calcio intracelular. Son pequeñas proteínas de 12-19 kDa caracterizadas por poseer siete hojas beta y cuatro hélices alfa⁸. Participan en la polimerización de actina, y son claves como reguladores de la dinámica de la F-actina⁹. Son de gran importancia dado que permiten el desarrollo normal de funciones como la proliferación y diferenciación celular normal, el crecimiento, la motilidad y la citocinesis¹⁰.

El papel de las profilinas como alérgenos ha sido cuestionado durante mucho tiempo. Estas proteínas juegan un papel limitado como alergia alimentaria debido a su baja estabilidad, son procesadas fácilmente por proteasas y desnaturalizadas en condiciones ácidas¹¹. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la capacidad de la profilina para inducir síntomas respiratorios y se ha confirmado su papel como un alérgeno importante en pacientes expuestos a grandes cantidades de pólenes de hierba. Además, demostró que más del 50% de los pacientes sensibilizados a la profilina experimentaron síntomas después de la

ingestión de alimentos derivados de plantas, lo que sugiere que debe considerarse como un alérgeno alimentario relevante¹².

Su distribución es amplia por lo que se les considera como panalérgenos, responsables de una gran cantidad de sensibilizaciones alérgicas claramente relacionadas con la reactividad cruzada y la sensibilización conjunta entre el inhalante, el látex y la planta¹³. Se han descrito alergias a las verduras como el apio, espárragos, aguacate, pimiento, repollo, zanahoria, hinojo, lechuga, papa, calabaza, nabo, calabacín y otras 15 especies, la mayoría de estas están disponibles en todo el mundo en los mercados y se ha reportado que existe reactividad cruzada entre ciertas profilinas como las del melón, sandía y zanahoria¹⁴. Gracias a esto han descubierto que las reacciones alérgicas a las frutas con frecuencia se asocian con el síndrome de alergia oral (OEA) junto con el síndrome de polen de frutas y verduras, desencadenado por el consumo de verduras crudas o frutas frescas.

Las profilinas pueden provocar respuestas de IgE en el 10-60% de los pacientes alérgicos al polen. Sin embargo, la prevalencia de sensibilización parece aumentar, debido a que cada vez hay más pacientes atendidos en los departamentos de alergología mostrando sensibilización a un gran número de plantas no relacionadas botánicamente¹⁵. Aun así, no se han abordado algunas profilinas que podrían ser potencialmente reactivas y tener una importancia clínica al desarrollar enfermedades alérgicas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es explorar el potencial de reactividad cruzada en profilinas poco caracterizadas, que expliquen el aumento progresivo de las enfermedades alérgicas por alimentos de origen vegetal.

METODOLOGÍA

1. SELECCIÓN DE PROFILINAS Y ALINEAMIENTO MÚLTIPLE.

Se seleccionaron 32 secuencias de aminoácidos de profilinas de diferentes tipos de vegetales y frutas. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos Allergome y Uniprot. Utilizamos las secuencias encontradas en el Subcomité de nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) / Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS)^{16,17}. Descartamos secuencias incompletas para el análisis. No se informaron las secuencias alérgicas del humano, sin embargo, se eligieron para estudiar las diferencias de identidad. El porcentaje de identidad de las profilinas se determinó utilizando el servidor web bibli.vu.nl/PRALINE¹⁸. Los parámetros para realizar la alineación fueron configurados para usar BLOSUM62 como matriz de intercambio. Las interacciones utilizadas fueron 3 con un valor E de 0,01. Posteriormente comparamos las regiones conservadas identificadas con las regio-

TABLA I. Bases de datos de los alérgenos estudiados. Se describe la fuente, el nombre del alérgeno, el peso molecular, la longitud de los aminoácidos y el código de Allergome y Uniprot. *Fragaria vesca* no reportó secuencia en la base de datos de Uniprot y se utilizó la reportada en NCBI.

FUENTE	NOMBRE	ALLERGENOS	PESO MOLECULAR (kDa)	LONGITUD (AA)	C O D Í G O ALLERGOME	CODÍGO UNIPROT
FRUTAS	<i>Ananas comosus</i>	Ana c 1	15 kDa	131	33	Q94JN2
	<i>Capsicum annuum</i>	Cap a 2	14 kDa	129	689	Q93YI9
	<i>Citrus sinensis</i>	Cit s 2	14 kDa	130	1173	P84177
	<i>Citrus clementina</i>	Citcl 2	14.5 kDa	130	9889	V4TVJ4
	<i>Cocos nucifera</i>	Coc n 5	15 kDa	131	3560	A1Z292
	<i>Cucumis melo</i>	Cuc m 2	14 kDa	130	981	Q84MM5
	<i>Fragaria vesca</i>	Fra v 4	14 kDa	131	9892	XP_004302848.1 CODÍGO NCBI
	<i>Malus domestica</i>	Mal d 4	14 kDa	131	796	Q9XF40
	<i>Mangifera indica</i>	Man i 3	14 kDa	131	2856	Q2XPH2
	<i>Musa acuminata</i>	Mus a 1	15 kDa	131	7632	Q94JN3
	<i>Prunus pérsica</i>	Pru p 4	14 kDa	130	736	Q8GT39
	<i>Prunus avium</i>	Pruav 4	15 kDa	130	600	Q9XF39
	<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 4	14 kDa	131	608	Q9XF38
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sola l 1	14 kDa	133	703	Q41344	
<i>Vitis vinifera</i>	Vit v 4	14 kDa	130	2768	A5BLM8	
SEMILLAS	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 5	15 kDa	130	54	Q9SQI9
	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 2	15 kDa	133	244	A4KA39
	<i>Juglans regia</i>	Jug r 7	13 kDa	130	1607	A0A2I4DNN6
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pha v 5	14.4 kDa	130	10228	P49231
POLEN	<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 4	14 kDa	133	60	Q8H2C8
	<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 2	15 kDa	133	127	P25816
	<i>Brassica napus</i>	Bra n 8	14.5 kDa	134	1073	Q9FUB8
	<i>Brassica rapa</i>	Bra r 8	14 kDa	134	10093	M4FD48
	<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 12	14.5 kDa	130	279	O04725
	<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 2	14.7 kDa	132	377	O81982
	<i>Zea mays</i>	Zea m 12	14 kDa	131	682	P35081
HOJAS	<i>Petroselinum crispum</i>	Pet c 2	14 kDa	131	1605	Q5EEP7
	<i>Brassica oleracea</i>	Bra o 8	14 kDa	134	10092	A0A0D3A3H9
RAÍZ	<i>Apium graveolens</i>	Api g 4	14 kDa	134	43	Q9XF37
	<i>Daucus carota</i>	Dau c 4	14 kDa	134	692	Q8SAE6
TUBÉRCULO	<i>Solanum tuberosum</i>	Sola t 8	14 kDa	130	1473	M1BLC8
HUMANO	<i>Homo sapiens (Human)</i>		15 kDa	377		P07737

nes antigénicas ya reportadas en *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) con el fin de encontrar similitud en los parches y en las que no fueron reportadas se realizaron de forma manual¹⁹.

2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El programa *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versión X se utilizó para obtener árboles filogenéticos, utilizando el método del árbol de unión de vecinos con el apoyo de *Bootstrap* con 1000 repeticiones como medida de fiabilidad y robustez bajo el supuesto de una evolución mínima²⁰. En la topología, este modelo utiliza una matriz comparativa para encontrar la similitud entre los aminoácidos de treinta y dos secuencias para establecer la proximidad evolutiva entre las diferentes especies. La matriz se construyó con las treinta y dos secuencias de aminoácidos de las profilinas recuperadas de la base de datos Allergome e informadas a (OMS) / (IUIS). Por lo tanto, cuanto más valores de identidad

positivos se encuentren entre las secuencias, mayor será su relación y se ubicarán en posiciones más cercanas en el árbol. Todos los espacios vacíos fueron eliminados. A partir de la comparación global y las homologías, se presenta la suma de la longitud de las ramas (SBL), que fue de 3,7766, y se determina el número de nodos y la posición de estos, incluidos los “grupos” de las secuencias evolutivamente más cercanas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de distancia p. Se realizaron subanálisis filogenéticos para identificar el grado de identidad de los grupos formados. La alineación para el análisis filogenético se realizó a través del programa CLUSTAL W.

3. MODELOS 3D

Las estructuras 3D de las profilinas no reportadas en el banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*) se obtuvieron por modelado basado en homología usando el servidor SWISS-MODEL²¹. La calidad de los mo-

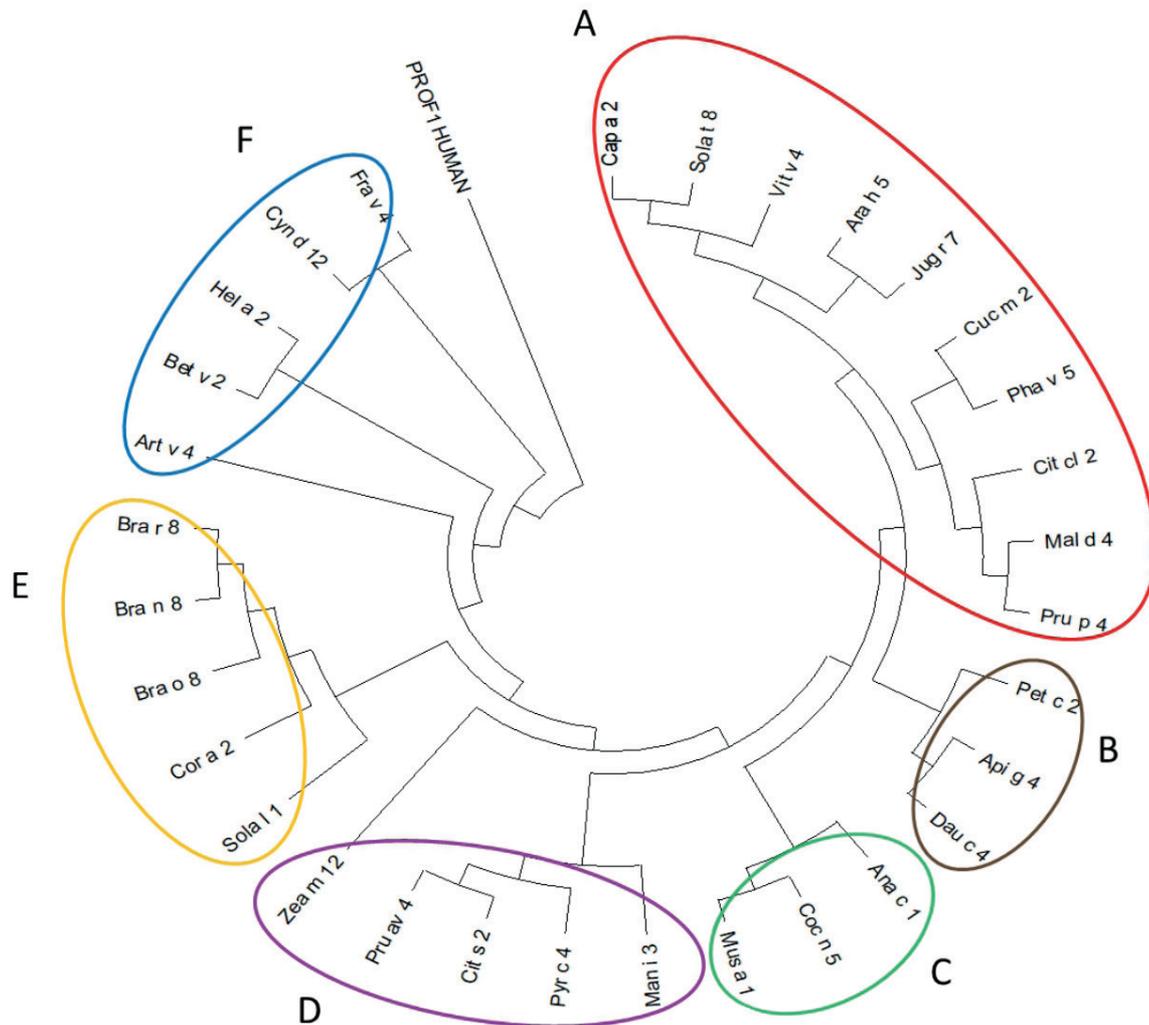


Figura 1. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de las profilinas estudiadas. Se observa la formación de seis clados (A-F) con el mayor grado de identidad (89%) para el clado B. La historia evolutiva se infirió usando el método de unión de vecinos. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 3,16946727.

delos fue analizada por ProSA-web. Su calidad fue evaluada por varias herramientas, incluidas las cartas de Ramachandran, WHATIF, el índice QMEAN4 y los valores de energía (campo de fuerza GROMOS96). Las secuencias se alinearon para identificar residuos conservados. Realizamos solapamientos de las estructuras por grupos para observar la homología estructural por medio del programa Chimera, el Algoritmo de alineamiento usado fue de Needleman-Wunsch, la Matriz de Blosum-62 y se incluyeron estructuras secundarias con un score del 30%.

La metodología *sin-silico* se ha utilizado en otros trabajos para informar la posible reactividad cruzada basada en proteínas en estudios de homología estructural o funcional, a través de herramientas bioinformáticas.

RESULTADOS

PROFILINAS ENCONTRADAS Y RESULTADOS FILOGENÉTICOS

Se incluyeron un total de 32 secuencias de aminoácidos de profilinas alergénicas de origen vegetal y una profilina humana no alergénica, la cual se usó de referencia para observar si pudiera existir identidad. Las secuencias se derivaron de varias fuentes vegetales: legumbres, tubérculos, granos y frutas (**Tabla 1**).

El árbol filogenético mostró una suma de la longitud de la rama = 3,77 y hubo un total de 150 puestos en el conjunto de datos final. Cuando se analizó la relación de profilinas, descubrimos que formaban seis nodos con la relación filogenética más alta entre ellos. Según los análisis, el grupo A arrojó 10 profilinas, incluyendo Cap a 2, Sola t 8,

Vit v 4, Ara h 5, Jug r 7, Cuc m 2, Pha v 5, Citcl 2, Mal d 4, Pru p 4; es el grupo con el mayor número de profilinas y presentó la mayor relación entre los grupos con la distancia más cercana entre las ramas. Mientras tanto, el grupo B contiene solo 3 profilinas relacionadas filogenéticamente, incluyendo Pet c 2, Api g 4, Dau c 4; y el grupo C, al igual que el grupo B, solo contiene 3 profilinas relacionadas: Ana c 1, Coc n 5, Mus a 1, siendo estos dos los grupos con la menor cantidad de profilinas, pero con una importancia reflejada en la cantidad de parches antigénicos encontrados. En el grupo D encontramos profilinas de frutas principalmente, que incluyen: Prua v 4, Cit s 2, Pyr c 4, Man i 3. El grupo E tiene 6 profilinas, sus proteínas son de frutas, granos y plantas, en donde encontramos a 3 proteínas que son de la misma familia, pero de diferentes especies: Bra r 8, Bra r 8, Bra o 8, Cor a 2, Sola l 1, Zea m 12. Y, por último, el grupo F, que está conformado por 5 proteínas que son: Fra v 4, Cyn d 12, Hel a 2, Bet v 2, Art v 4. Observamos que la profilina humana fue la proteína más con más distancia entre las ramas, por lo tanto tuvo una menor relación como se muestra en la **Figura 1**.

Se analizaron las distancias evolutivas de las profilinas (**Tabla 2**). Observamos que las puntuaciones estarán representadas por cuartiles, el color azul representa las distancias evolutivas más cortas, las de color oro muestran una puntuación intermedia y las de color anaranjado representan las distancias evolutivas más largas. Encontramos que la mayoría de las profilinas poseían una distancia evolutiva corta, lo que sugiere que estas proteínas se parecen entre sí; por ejemplo, las proteínas con menor distancia y mayor parentesco son: Citc l 2 y Ara h 5, Dau c 4 y Api g 4, Jug r 7 y Ara h 5, Prua v 4 con Cit s 2, Sola t 8 con Arar h 5, Sola t 8 con Cap a 2, Vit v 4 con Cap a 2 y por último Bra n 8, Bra o 8, Bra r 8, teniendo en cuenta que estas últimas son del mismo género. Las profilinas con mayor distancia evolutiva fueron la profilina humana, Hel a 2, Fra v 4, Cyn d 12 y Bet v 2, teniendo en cuenta que entre ellas la profilina humana fue la que mostró un menor parentesco con todas las proteínas, dado que su distancia fue la más larga.

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES SITIOS ANTIGÉNICOS CON REACCIÓN CRUZADA

Se realizaron alineamientos múltiples de las profilinas pertenecientes a los diferentes grupos obtenidos a partir de los análisis filogenéticos. Para comparar los resultados de Ellipro, se eligieron los principales parches antigénicos con una puntuación superior a 0,7 y más de 3 residuos, tomando como referencia epítopes de una profilina de cada grupo: grupo A, Cuc m 2; grupo B, Api g 4; grupo C, Mus a 1; Grupo D, Man i 3; Grupo E, Cor a 2; y Grupo F, Bet v 2 (**Tabla 3**). Los parches antigénicos constitucionales se muestran en las **Figuras 2 y 3**. Están organizados

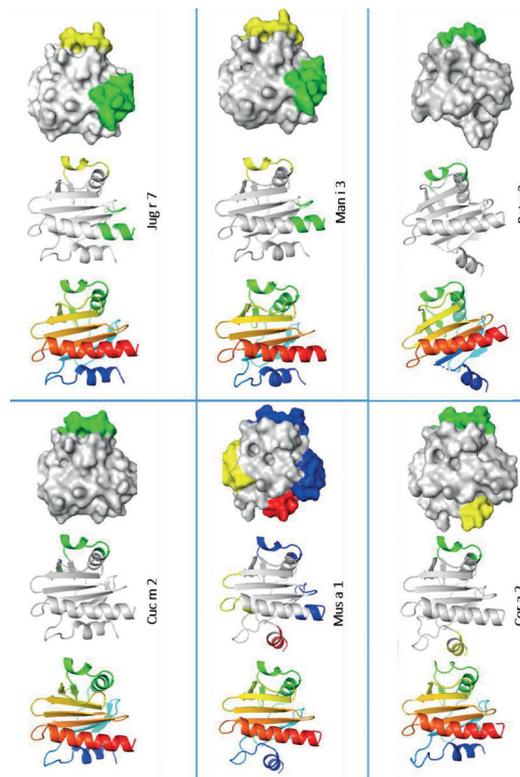


Figura 2. Parches antigénicos constitucionales. El score de los epítopes estará representado por cuartiles, el color rojo muestra la mayor puntuación (0.80-0.775), el color amarillo y verde muestran puntuaciones intermedias de (0.775-0.750) y (0.750-0.725), por último, el color azul representará la puntuación más baja (0.725-0.70).

según el *score* de los epítopes, los cuales son representados por cuartiles: el color rojo muestra la mayor puntuación (0,775-0,8), los colores amarillo y verde muestran puntuaciones intermedias de (0,750-0,775) y (0,750-0,725), y por último, el color azul representa la puntuación más baja (0,725-0,70).

Las profilinas del grupo A tenían una alta identidad, del 87%, entre sus secuencias de aminoácidos (**Figura 4**). Se identificaron y conservaron un total de 5146 residuos entre las profilinas analizadas, que forman dos parches antigénicos lineales comunes y solo un parche antigénico constitutivo Cuc m 2 con un puntaje superior a 0,7.

El grupo B comparte una identidad del 86% entre sus secuencias de aminoácidos, es el segundo más alto después del clado A. Se encontraron 341 residuos idénticos entre las secuencias. Se encontraron e incluyeron dos parches antigénicos lineales y un parche antigénico constitutivos en Api g 4 con una puntuación superior a 0,7 (**Figura 4**).

El grupo C mostró una identidad del 82% entre sus secuencias de aminoácidos y se encontraron 324 residuos. Al ser este grupo y el grupo B los que poseen el menor número de proteínas por grupo, realizamos un alineamiento entre sus secuencias, que reportó un gra-

TABLA 3. Epitopos lineales y discontinuos de profilinas

Grupos de profilinas		Empieza	Termina	Parches antigénicos	Número de residuos	Score
TABLA 3 a						
A (Cuc m 2 as reference)	Lineales	55	64	ADPGTLAPTG	10	0.751
		107	111	DEPMT	5	0.718
	Discontinuo	52	71	A:G52, A:A55, A:D56, A:P57, A:G58, A:T59, A:L60, A:A61, A:P62, A:T63, A:G64, A:K71	12	0.734
TABLA 3b						
B (Api g 4)	Lineales	127	134	DYLIDQLG	8	0.769
		13	23	CEVEGNPGQTL	11	0.701
	Discontinuo	2	11	A:S2, A:W3, A:Q4, A:A5, A:Y6, A:D9, A:H10, A:L11	8	0.771
TABLA 3c						
C (Mus a 1)	Lineales	124	131	DYLFQDQGF	8	0.792
		108	111	EPMT	4	0.777
		55	64	DEPGSLAPTG	10	0.732
	Discontinuos	2	11	A:S2, A:W3, A:Q4, A:A5, A:Y6, A:D9, A:H10, A:L11	8	0.787
		87	114	A:K87, A:G88, A:S89, A:E108, A:P109, A:M110, A:T111, A:Q114	8	0.754
		52	71	A:K52, A:D55, A:E56, A:P57, A:G58, A:S59, A:L60, A:A61, A:P62, A:T63, A:G64, A:K71	12	0.722
		28	131	A:H28, A:D29, A:G30, A:S31, A:T97, A:N98, A:L99, A:Y125, A:F127, A:D128, A:Q129, A:G130, A:F131	12	0.701
TABLA 3d						
D (Man i 3)	Lineales	55	64	DEPGSLAPTG	10	0.762
		107	111	DEPMT	5	0.723
	Discontinuos	55	71	A:D55, A:E56, A:P57, A:G58, A:S59, A:L60, A:A61, A:P62, A:T63, A:G64, A:K71,	11	0.752
		97	130	A:T97, A:N98, A:M99, A:D124, A:Y125, A:V127, A:E128, A:Q129, A:G130	9	0.74
TABLA 3e						
E (Cor a 2)	Lineales	126	133	DYLLEQGP	8	0.755
		57	66	DEPGHLAPTG	10	0.748
	Discontinuos	2	11	A:S2, A:W3, A:Q4, A:A5, A:Y6, A:E9, A:H10, A:L11	8	0.769
		54	73	A:K54, A:D57, A:E58, A:P59, A:G60, A:H61, A:L62, A:A63, A:P64, A:T65, A:G66, A:K73	12	0.739
TABLA 3f						
F (Bet v 2)	Lineales	126	133	DYLIDQGL	8	0.786
		57	66	EEPGLAPTG	10	0.745
		109	116	EEPVTPGQ	8	0.722
	Discontinuo	54	66	A:K54, A:E57, A:E58, A:P59, A:G60, A:H61, A:L62, A:A63, A:P64, A:T65, A:G66	11	0.74

do de conservación del 81% en estos dos grupos. Fue el grupo que tuvo más parches antigénicos: tres parches antigénicos lineales y cuatro parches antigénicos constitutivos de Mus a 1 con un puntaje superior a 0,7 (Figura 4).

Para el grupo D, 672 residuos presentaron una identidad entre las cuatro secuencias de alérgenos. Este grupo demostró una alta conservación del 86%, el tercero más alto después del clado B. Para la identificación de parches de antígenos en este grupo, utilizamos Man

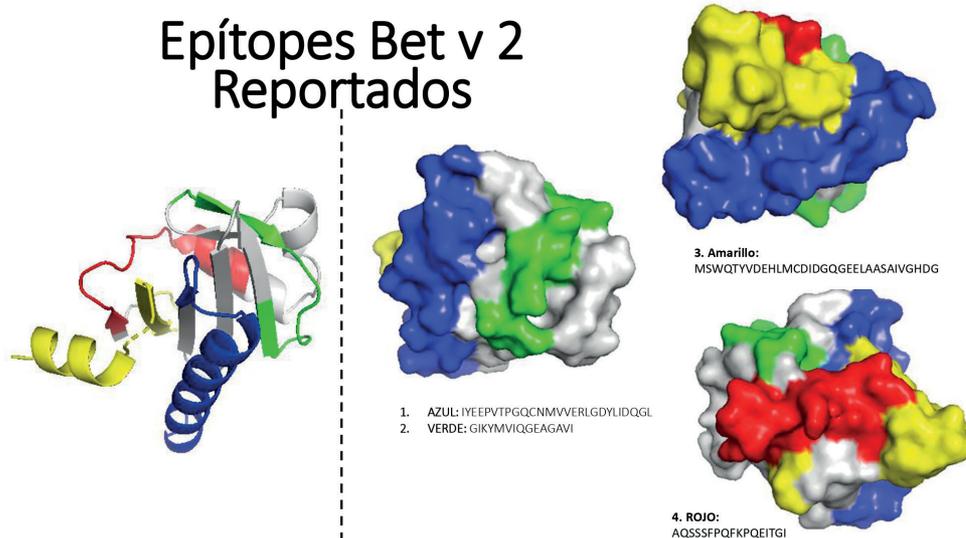


Figura 3. Epítopes de Bet v 2 reportados; se hallaron 20 estudios con descripción de epítopes, pero observamos que la secuencia de aminoácidos se repetía en muchos por lo que al final encontramos solo 4 epítopes.

i 3 para encontrar dos epítopes lineales y dos epítopes constitutivos con una puntuación válida (**Figura 4**).

El grupo E reportó una identidad del 83% entre sus secuencias, constituido por 1639 residuos que presentaban la identidad de seis proteínas (**Figura 4**). La profilina de referencia tomada para hallar los parches fue Cor a 2, mostrando dos epítopes lineales y dos epítopes constitutivos con puntuación superior a 0,7%.

Por último, en el grupo F se analizaron 5 secuencias de alérgenos que constituyeron 992 residuos. Observamos que este es el grupo con la menor identidad, con un 75%, y encontramos tres parches antigénicos lineales y solo un parche antigénico constitutivo con puntuaciones válidas, según Ellipro (**Figura 4**). Aun así, la base de datos de *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) muestra que esta profilina tenía descritos varios epítopes, se encontraron 20 estudios con descripción de los epítopes; sin embargo, en los diferentes estudios repetían los epítopes y al final descubrimos que solo se habían reportado 4 epítopes (**Figura 3**).

En el árbol filogenético se observa que la profilina humana es la más distante. A pesar de ello, realizamos un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de esta proteína con las secuencias de las profilinas pertenecientes al grupo F: se analizaron 1198 residuos mostrando una identidad del 62%, y es de considerar que, aunque es menor que las reportadas por los otros grupos, es superior al 50% del grado de conservación.

Al superponer las estructuras se observó un alto grado de coincidencia a nivel de las cintas o *ribbons*, lo cual nos indica que son muy similares a nivel apoproteico y que tienen un alto grado de cercanía evolutiva (**Figura 5**). En cada grupo se observaron porcentajes de identidad hasta del 96% y no menos del 50% incluyendo las profilinas humanas PROFH1, lo que indica un alto grado de regiones de aminoácidos homólogas conservadas.

Esto sugiere existe una alta probabilidad de que estas proteínas, a pesar de ser originarias de diferentes especies de frutas, verduras y semillas, sean fuentes importantes de sensibilización, y que se desencadenen respuestas de hipersensibilidad debido al mecanismo de reactividad cruzada.

DISCUSIÓN

Las profilinas son alérgenos de alimentos que se encuentran principalmente en frutas y vegetales, y proporcionan un beneficio diagnóstico para la diferenciación de la sensibilización genuina de reactividad cruzada en alimentos. Sin embargo, la reactividad cruzada de este grupo de alérgenos ha sido poco explorada. En este estudio, se logró predecir regiones antigénicas que explican la reactividad cruzada de las profilinas de alimentos de origen vegetal.

Se alinearon 32 secuencias de aminoácidos de los alérgenos y se llevó a cabo un análisis filogenético que produjo la formación de seis clados monofilogenéticos (A, B, C, D, E, F). El grupo A (Cap a 2, Sola t 8, Vit v 4, Ara h 5, Jug

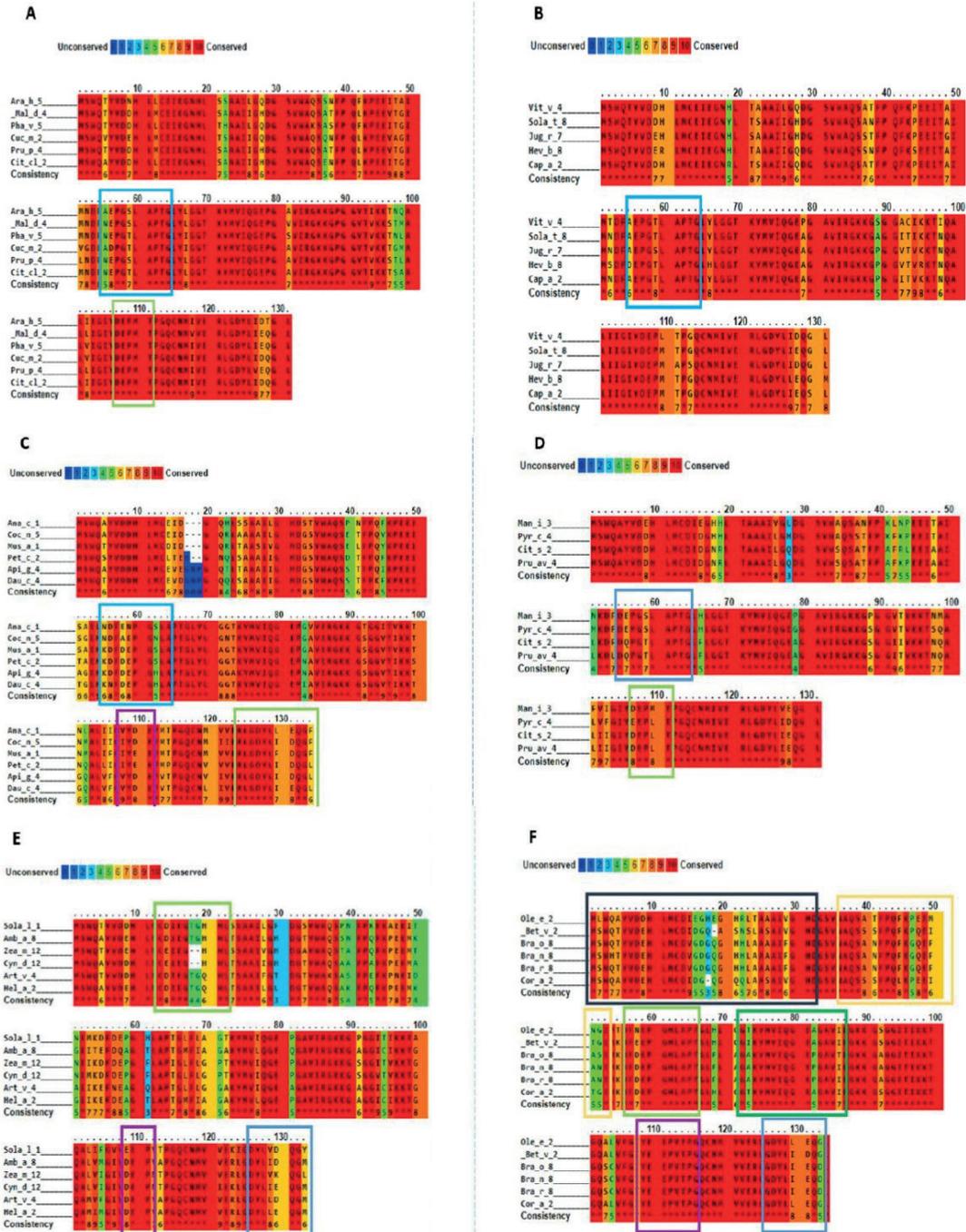


Figura 4. Análisis de profilinas de los grupos A, B, C, D, E, F. Las secuencias no conservadas se muestran con color azul y las secuencias altamente conservadas con color rojo. La secuencia de conservación media se muestra con color verde y naranja. Grupo A: se estudiaron 6 secuencias con un total de 786 residuos; la puntuación de alineación fue 34660 con un total de 1711 residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 87%. Grupo B: se estudiaron 5 secuencias con un total de 655 residuos; la puntuación de alineación fue 23024 con un total de 1167 residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 89%. Grupo C: se estudiaron 6 secuencias con un total de 793 residuos; la puntuación de alineación fue 33580 con un total de 1593 residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 81%. Grupo D: se estudiaron 4 secuencias con un total de 524 residuos; la puntuación de alineación fue 13526 con un total de 672 residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 86%. Grupo E: se estudiaron 6 secuencias con un total de 794 residuos; la puntuación de alineación fue 33190 con un total de 1557 de residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 79%. Grupo F: se estudiaron 6 secuencias con un total de 802 residuos; la puntuación de alineación fue de 34316 con un total de 1695 residuos de identidad; el porcentaje de identidad de secuencia fue del 85%.

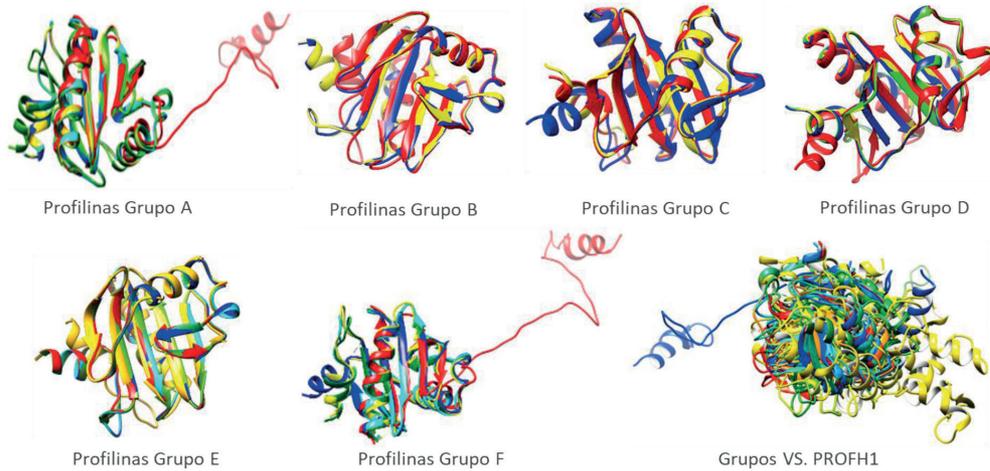


Figura 5. Solapamientos de las estructuras por grupo con el fin de hallar homología estructural, observamos porcentajes de identidad hasta del 96% y no menos del 50% incluyendo las profilina humana PROFH1.

r 7, Cuc m 2, Pha v 5, Citcl 2, Mal d 4, Pru p 4,) obtuvo el mayor grado de identidad entre sus secuencias de aminoácidos (87%). En el grupo B (Pet c 2, Api g 4, Dau c 4) encontramos un grado de identidad del 86%. El grupo C (Ana c1, Coc n 5, Mus a 1) muestra un grado de identidad del 82%; este grupo es destacado por tener la mayor cantidad de parches antigénicos predichos, para un total de 7 parches antigénicos. Además, se realizó un análisis de estos dos grupos B y C al considerar que solo se agruparon 3 profilinas por cada grupo, obteniendo una identidad del 81% y mostrándonos que, aunque en el árbol filogenético se encuentre en grupos diferentes, siguen manteniendo un alto grado de conservación. En el grupo D (Prua v 4, Cit s 2, Pyr c 4, Man i 3) encontramos una identidad del 86%. El grupo E (Bra r 8, Bra r 8, Bra o 8, Cor a 2, Sola l 1, Zea m 12) mostró un grado de identidad del 83% y, por último, el grupo F (Fra v 4, Cyn d 12, Hel a 2, Bet v 2, Art v 4) reportó una identidad del 75%, y es el grupo con menor identidad, pero sigue siendo superior al 50%. La profilina humana es una proteína con alta capacidad alergénica y varios epítopes reportados, decidimos realizar un alineamiento con el grupo F, el más cercano, mostrando un grado de identidad del 62%.

Las profilinas se conocen hoy en día como pan-alérgenos, proteínas responsables de la reactividad cruzada de IgE a una amplia variedad de fuentes alergénicas relacionadas y no relacionadas. La familia de estas proteínas compar-

te secuencias de aminoácidos altamente conservadas que, en algunos casos, tienen más del 75% de identidad, incluso entre fuentes lejanas. Las profilinas vegetales se pueden dividir en pólenes, alimentos y productos. Los pólenes incluyen árboles, pastos y malezas; los alimentos incluyen frutas, legumbres, nueces / semillas y vegetales, y la subclasificación de productos incluye látex^{22,23}.

Los síndromes alérgicos a los alimentos caracterizan la capacidad alergénica de muchas proteínas, y se han reportado aproximadamente ocho síndromes hasta el momento²⁴. Las profilinas son causantes de varios de estos síndromes y hasta el momento se han demostrado las asociaciones entre alimentos y prevalencias descritas en distintos países. Por ejemplo, las asociaciones polen-alimento son alergias alimentarias que afectan a personas sensibilizadas al polen, y se han convertido en los tipos de alergia alimentaria más prevalentes en adolescentes y adultos europeos, afectando a aproximadamente el 5% de la población de Europa central y en el Reino Unido. La prevalencia general del síndrome del polen-alimento es de aproximadamente el 2%, y en la práctica urbana del sudeste de Inglaterra es ligeramente superior al 4%³. Los síntomas de los síndromes de alergia polen-alimentos pueden cursar desde el síndrome de alergia oral hasta la anafilaxia severa, y los alimentos involucrados son de origen vegetal, en su mayoría frutas y verduras, consumidas crudas²⁵. Uno de los ejemplos más claros es el síndrome de abedul-fruta-verdura: aproxima-

damente el 70% de los pacientes alérgicos al polen de abedul desarrollan síntomas de alergia a los alimentos vegetales, frutas (principalmente manzana), nueces (especialmente avellana) y verduras de la familia Apiaceae (principalmente apio y zanahoria), que con mayor frecuencia implican del desarrollo de rosáceas²⁶.

Del grupo A tenemos a Cuc m 2 una profilina ampliamente estudiada, esta proteína tiene, respectivamente, 77,9%, 82,4% y 74,8% de identidad de secuencia con la profilina de melón, tomate y sandía. Los sueros de 11 de 17 (64%) pacientes mostraron un aumento de la reactividad de IgE a Cuc m 2 proteína recombinante. Por lo tanto, la profilina de melón, rCuc m 2, se identificó como un alérgeno principal. Las personas alérgicas al melón también mostraron características clínicas de reacción alérgica a frutas de varias familias botánicas como la uva (58%) y el tomate (35%). En el experimento también indicaron que la IgE humana solo reacciona con la profilina de melón completa, pero en nuestro estudio se observó que la profilina humana se aisló y mostró identidades inferiores al 70^{26,27}. Además, los presentes hallazgos evidenciaron que esta profilina fue segregada en el grupo con mayor número de proteínas mostrando identidades altas, pero en la literatura no se encontró asociación entre estas proteínas.

Aunque no se encontraron identidades en las proteínas en los mismos grupos, un estudio indicó que al realizar una alineación entre la proteína Citc l 2 y el alérgeno Cit s 2 de naranja dulce mostró 82% de identidad de aminoácidos²⁸. Otros estudios sugieren que la profilina de polen de Bermuda *Cynodon dactylon* (Cyn d 12) tiene una reactividad cruzada sustancial con profilinas de tomate *Solanum lycopersicum* (Sola l 1) y melón *Cucumis melo* (Cuc m 2) y en nuestro estudio cada una de estas profilinas se encuentra en grupos diferentes sin ninguna relación, lo que sugiere que casi todas las proteínas puedan guardar cierto parentesco²⁶.

Investigadores han logrado demostrar las reactividades cruzadas entre las profilinas Ole e 2, Pru p 4, Pyr c 4, Cuc m 2, Act d 9 y LTP Ole e 7, Pru p 3, Pyr c 3, Cuc m LTP, Act d 10, proponiendo que están involucradas en el síndrome del polen del olivo-fruto. En el grupo B no se obtuvo información sobre Pet c 2; sin embargo, encontramos que la reactividad cruzada entre profilinas de polen de artemisa (Art v 4) y Apiáceas, alimentos como el apio (Api g 4), la zanahoria (Dau c 4), y algunas especias, está implicada en la patogenia de este síndrome apio-artemisa-especia, demostrando que Api g 4 y Dau c 4 tienen una reactividad cruzada descrita con producción de sintomatología alérgica²⁶.

En el grupo C se tienen alérgenos poco relevantes, sin embargo se encuentra Coc n 5 que ha tomado importancia

debido a la descripción de síntomas orales reportados tras sus ingestión en pacientes alérgicos a los frutos secos²⁹. Los cocos no son frutos secos, pero guardan una relación lejana al ser plantas monocotiledóneas de la familia de las palmeras Arecaceae, debido a que los árboles que producen frutos secos son dicotiledóneas y solo están relacionados lejanamente con las especies de palmeras. En un estudio que trataba de identificar la asociación de sensibilización a nueces de árbol y coco, encontraron una tasa de co-sensibilización entre la avellana y el coco del 55%, demostrando una posible reactividad cruzada entre estos alérgenos³⁰. Sin embargo, en nuestro estudio se observa que no hay una asociación directa entre estas proteínas y no hay estudios que comenten reactividad cruzada.

En el grupo D tenemos a Man i 3, la profilina del mango reportando posible co-sensibilización con profilina de otras plantas, como frutas (Prua v 4 de cereza, Pyr c 4 de pera, Pru p 4 de melocotón y Mal d 4 de manzana), semillas (Ara h 5 de maní), hortalizas (Dau c 4 de zanahoria) y polen (Bet v 2 de abedul), y con identidades altas de profilinas cercanas como; pera (80%), melocotón (90%) y manzana (80%). También revelaron una alta reactividad cruzada de la profilina de mango con la profilina de polen de abedul Bet v 2 (78%)³¹ y 44% de los sueros de pacientes alérgicos a frutas de mango tuvieron unión de IgE al perfil de banano (44%) y al perfil de piña (42%)³². Algunos de estos datos coinciden con lo encontrado en nuestro estudio debido a que se halló conservación con Prua v 4, Pyr c 4. Aun así, vemos que esta profilina tiene reactividad cruzada con otras proteínas, lo que la convierte en una proteína con alta tasa de co-sensibilización.

CONCLUSIÓN

Se identificaron sitios antigénicos potenciales para la generación de reactividad cruzada entre las profilinas analizadas en este estudio. La identidad entre estas proteínas de diferentes especies es alta, lo que muestra que la reactividad cruzada entre ellas es muy probable, incrementando la frecuencia de sensibilización. Estos estudios respaldan las pruebas de diagnóstico mediante estudios de componentes para la alergia a alimentos y la multisensibilización a diversas fuentes del trópico.

Declaraciones

Financiamientos: Los autores declaran que no recibieron fondos financieros, subvenciones u otro tipo de apoyo durante la preparación de este manuscrito.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Crestani E, Harb H, Charbonnier L-M, Leirer J, Motsinger-Reif A, Rachid R, et al. Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2020 Mar;145(3):897-906.
- Gonzalez-Mancebo E, Gandolfo-Cano MM, Trujillo-Trujillo MJ, Mohedano-Vicente E, Calso A, Juarez R, et al. Analysis of the effectiveness of training school personnel in the management of food allergy and anaphylaxis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2019 Jan;47(1):60-3.
- Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of sea-food allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Allergy Clin Immunol* 2004 Jul;114(1):159-65.
- Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn JKH, Fiocchi A, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ J* 2013 Dec 4;6(1):21.
- Mahdavinia M. Food Allergy in Adults. *Med Clin North Am* 2020 Jan;104(1):145-55.
- Van der Poel LA, Chen J, Penagos MH. Food allergy epidemic – is it only a western phenomenon? *Current Allergy and Clinical Immunology* 2009;22(3):121-6.
- Marrugo J, Hernández L, Villalba V. Prevalence of self-reported food allergy in Cartagena (Colombia) population. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2008;36(6):320-4.
- Krishnan K, Moens PDJ. Structure and functions of profilins. *Biophys Rev* 2009;1(2):71-81.
- Carlsson L, Nyström L-E, 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;115(3):465-83.
- Slavin JL, Lloyd B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv Nutr* 2012 Jul;3(4):506-16.
- Valenta R, Duchene 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 Aug;253(5019):557-60.
- Blankestijn MA, Knulst AC, Knol EF, Le T-M, Rockmann H, Otten HG, et al. Sensitization to PR-10 proteins is indicative of distinctive sensitization patterns in adults with a suspected food allergy. *Clin Transl Allergy* 2017 Dec;7(1):42.
- Villalta D, Asero R. Sensitization to the Pollen Pan-Allergen Profilin. Is the Detection of Immunoglobulin E to Multiple Homologous Proteins From Different Sources Clinically Useful? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20(7):591-5.
- Enrique E, Cisteró-Bahima A. Specific immunotherapy for food allergy: basic principles and clinical aspects. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006 Dec;6(6):466-9.
- Cudowska B, Kapingidza AB, Pawłowicz M, Pampuch A, Hydeuk N, Pote S, et al. Production and Use of Recombinant Profilins Amb a 8, Art v 4, Bet v 2, and Pfl p 12 for Allergenic Sensitization Studies. *Molecules* 2020 Jan;25(2):369.
- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2005;33:154-9.
- Mari A, Rasi C, Palazzo P. Allergen Databases : 2009;(October).
- Simossis VA, Heringa J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucl Acids Res* 2005;33:289-94.
- Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res* 2015;43(D1):D405-12.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35(6):1547-9.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018;46(W1):W296-303.
- del Río PR, Díaz-Perales A, Sánchez-García S, Escudero C, Ibáñez MD, Méndez-Brea P, et al. Profilin, a change in the paradigm. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018;28(1):1-12.
- Landa-Pineda CM, Guidos-Fogelbach G, Marchat-Marchau L, López-Hidalgo M, Arroyo-Becerra A, Reyes-López CAS. Profilinas: Alérgenos con relevancia clínica. *Rev Alerg Mex* 2013;60(3):129-43.
- Calamelli E, Liotti L, Beghetti I, Piccinno V, Serra L, Bottau P. Component-Resolved Diagnosis in Food Allergies. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug; 55(8):498.2019;1-20.
- Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: An update from the molecular point of view. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2006;61(4):461-76.
- Popescu F-D. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol* 2015;5(2):31.
- Sankian M, Varasteh A, Pazouki N, Mahmoudi M. Sequence homology: A poor predictive value for profilins cross-reactivity. *Clin Mol Allergy* 2005;3:1-9.
- Serra IA, Bernardo L, Spadafora A, Faccioli P, Canton C, Mazzuca S. The Citrus clementina putative allergens: From proteomic analysis to structural features. *J Agric Food Chem* 2013;61(37):8949-58.
- Nguyen SA, More DR, Whisman BA, Hagan LL. Cross-reactivity between coconut and hazelnut proteins in a patient with coconut anaphylaxis. *Ann Allergy, Asthma Immunol [Internet]*. 2004;92(2):281-4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61562-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61562-1)
- Polk BI, Dinakarandian D, Nanda M, Barnes C, Dinakar C. Association of tree nut and coconut sensitizations. *Ann Allergy, Asthma Immunol [Internet]*. 2016;117(4):412-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaai.2016.07.023>
- Song J, Zhang H, Liu Z, Ran P. Mango profilin: Cloning, expression and cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Mol Biol Rep* 2008;35(2):231-7.
- Paschke A, Kinder H, Zunker K, Wigotzki M, Steinhart H, Weißbecher R, et al. Characterization of cross-reacting allergens in mango fruit. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2001;56(3):237-42.