



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**Análisis *in silico* de los receptores de Histamina y el receptor del
Factor Activador de Plaquetas para el diseño de biosensores
para personas con riesgo de anafilaxia grave**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Víctor Hugo Flores Rojas

Director de tesis:

Dra. ALIA MENDEZ ALBORES

Codirector de tesis:

Dra. ALTAGRACIA CASTILLO MELCHOR

Marzo 2023



DEDICATORIA

A mis abuelos, mis padres y mi hermana, siempre lo han dado todo por mí.

Le dotan sentido a todo lo que hago y en lo que creo.

Epígrafe

Prefiero saber la verdad que tener la razón.

Agradecimientos

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por todos los recursos y el espacio para realizar mis estudios y fortalecer mis interacciones sociales, a mis mentores y profesores que dieron forma a mi educación, por el apoyo brindado y equiparme de conocimiento para este proyecto, a mis sinodales, el Dr. Luis Antonio Ortiz Frade y un reconocimiento especial al Dr. Alan Carrasco Carballo por brindar soporte, con conocimiento y proporcionar recursos para el desarrollo de esta tesis. A mi amigo Aín Guerrero por su apoyo en la animación 3D de la propuesta del diseño del biosensor. A mi co-directora de tesis la Dra. Altagracia Castillo Melchor por inspirarme con su trabajo a pensar esta tesis para el bien de un grupo de personas con condiciones alérgicas como yo, y finalmente agradezco a mi directora de tesis la Dra. Alia Mendez Albores por su profundo apoyo y enseñanzas a través de los años, sin ella esta tesis no sería posible, ha soportado, impulsado y estimulado mis ideas científicas, le agradezco por abrirme las puertas en el laboratorio de Bioinorgánica Aplicada del Instituto de Ciencias, aceptarme como aprendiz desde mis primeros años de la licenciatura permitiéndome realizar experimentos que fortalecieron mi formación.

Índice

Símbolos y abreviaturas	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES.....	16
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	18
2.1.1. Factores de Riesgo	19
2.1.3. Recurrencia y persistencia de la anafilaxia.....	20
2.2 FISIOPATOLOGÍA	22
2.3. DIAGNÓSTICO	25
2.4 DISEÑO <i>IN SILICO</i>	27
2.5 HISTAMINA, PAF, Y SUS RECEPTORES HXR Y PAFR	29
2.5.1 Histamina y PAF.....	30
2.5.1 Receptores de Histamina (H1R, H2R, H3R y H4R).....	31
2.5.2. Receptor del Factor activador de plaquetas (PAFR).....	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
3.1 Hipótesis.....	35
3.2 Objetivo general	35
METODOLOGÍA	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
5.1 Análisis, preparación y modelado de receptores.....	40
5.1.1 Receptor de Histamina tipo 1 (H1R)	41
5.1.2 Receptor de Histamina tipo 2 (H2R)	45
5.1.3 Receptor de Histamina tipo 3 (H3R)	52
5.1.4 Receptor de Histamina tipo 4 (H4R)	59
5.1.5 Receptor de PAF (PAFR)	65
5.2 Análisis de interacción con ligandos endógenos.....	70
5.2.1 Interacción de Histamina con H1R.....	71
5.2.2 Interacción de Histamina con H2R.....	73
5.2.3 Interacción de Histamina con H3R.....	74
5.2.4 Interacción de Histamina con H4R.....	76

5.2.1 Interacción de PAF con PAFR.....	79
5.3 Diseño del biosensor.	87
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA.....	91

Símbolos y abreviaturas

- PAF:** Factor activador de plaquetas
- PAFR:** Receptor del factor activador de plaquetas
- HxR:** Receptores de histamina
- H1R:** Receptor de histamina tipo 1
- H2R:** Receptor de histamina tipo 2
- H3R:** Receptor de histamina tipo 3
- H4R:** Receptor de histamina tipo 4
- FcγRIII:** CD16 (del inglés cluster of differentiation 16), receptor Fc gamma tipo III
- FcγRIV:** receptor Fc gamma tipo IV
- IgE:** Inmunoglobulina E
- IgG1:** Inmunoglobulina G tipo 1
- IgG2:** Inmunoglobulina G tipo 2
- DPPI:** Dipeptidil peptidasa I
- RAE:** Real Academia Española
- Th:** Células colaboradoras a las células encargadas de coordinar la respuesta inicial frente a los patógenos
- Th1:** Linfocitos Th1
- TH2:** Linfocitos Th2
- IFN-γ:** Interferón γ , también llamado interferón inmunitario o de tipo II
- pKi:** log de constante de afinidad
- LTB4:** Leucotrieno B4
- ECF-A:** Factor quimiotáctico anafiláctico eosinófilo
- NCF-A:** Factor quimiotáctico anafiláctico neutrófilo
- PMN:** Leucocitos polimorfonucleares humanos
- RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- UNIPROT:** Repositorio central de datos gratuito sobre proteínas.
- PDB:** Protein Data Bank
- pdb ID:** códigos del protein data bank
- HIP:** Histidina en forma básica
- HIE:** Histidina en forma ácida
- HIS:** Histidina en forma neutra
- IA:** Inteligencia artificial

ADRB1: Protein del Receptor adrenérgico $\beta 1$ acoplado con epinefrina

7BTS: Proteína del Receptor $\beta 1$ adrenérgico humano

5ZKP: Estructura cristalina del receptor de PAF humano

M3: Receptor muscarínico de acetilcolina

4U15: Receptor Muscarínico de acetilcolina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

kcal/mol: kilocalorías por mol

Flip: libre giro

SR 27417: N,N-dimetil-N'-(3-piridinilmetil)-N'-[4-[2,4,6-tris(1-metiletil)fenil]-2-tiazolil]-1,2-etanodiamina

ABT-491: (4-etinil-N, N-dimetil-3-[3-fluoro-4-[(2-metil-1H-imidazo-[4,5-c]piridin-1-il)metil]benzoil]-1H - clorhidrato de indol-1-carboxamida)

π - π : Interacción pi-pi

RESUMEN

La anafilaxia es un cuadro clínico grave cuya aparición tiene dos subtipos reacciones anafilactoides y shock anafiláctico, este último es shock distributivo producido por la pérdida inicial de fluidos intravasculares secundario al aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y depresión. Dichas reacciones pueden comprometer la vida del paciente que la presenta. Dentro de la diversidad de mediadores involucrados en la respuesta de la anafilaxia, pocos de estos pueden ser utilizados para categorizar su nivel de gravedad. La Histamina y el Factor Activador de Plaquetas (PAF, por sus siglas en Inglés) presentan una correlación entre su concentración y la gravedad del padecimiento; considerando esta información, en este trabajo se llevó a cabo un análisis *in silico* de la interacción de histamina y PAF con sus respectivos receptores (H1R, H2R, H3R y H4R) y el receptor del factor activador de plaquetas (PAFR, por sus siglas en Inglés), a fin de evaluar la pertinencia de su empleo como elemento de reconocimiento. El estudio incluyó el modelado por homología de los receptores que no se encuentran en bases de datos (H2R, H3R y H4R). Al comparar las energías de estabilidad para los receptores de histamina (HxR, por sus siglas en Inglés) evidenciaron que H4R mostró la mayor valor negativo con -1089.32 kcal/mol y para PAFR fue de -978.31 (kcal/mol). De los HxR, H4R y H3R fueron los modelos más estables seguidos de PAFR. H2R fue exhibido como el modelo menos estable, lo cual predice un menor acoplamiento con las simulaciones de interacción, posteriormente fue confirmado pues dicho receptor mostró nula interacción con la histamina. Las simulaciones de interacción de los demás receptores modelados con los ligandos histamina y los agonistas de PAF (mcPAF, PAF-C16-d4 y C18-PAF) mostraron las energías de acoplamiento (EA) de cada complejo ligando-receptor: H3R=-6.253, H4R=-6.023, H1R -5.178. Respecto al complejo PAFR-PAF, los agonistas de PAF usados en este trabajo mostraron un buen acoplamiento, obteniendo EA de C18-PAF=-8.284, PAF-C16-d4 =-8.061 y mcPAF=-6.497, lo anterior reveló la afinidad del receptor por C18-PAF y PAF-C16-d4. Por lo tanto H3R, H4R, PAFR y H1R respectivamente fueron seleccionados para el diseño del biosensor para determinar el riesgo de anafilaxia grave. Finalmente, considerando los resultados obtenidos, se propone un diseño de biosensor utilizando la estrategia de flujo lateral (FIA, por sus siglas en Inglés), con obtención de información cualitativa (cromatográfica) y cuantitativa al acoplar dicho dispositivo a un lector UV-vis. Un dispositivo que determine el riesgo de anafilaxia ofrece una atención temprana y oportuna mediante esta información pronóstica.

1

INTRODUCCIÓN

La anafilaxia es una respuesta fisiológica exacerbada por la exposición a diferentes factores, entre los que se encuentran: alimentos, exposición al aire frío, ejercicio físico, algunos venenos de origen animal, fármacos o vacunas, anti inflamatorios no esteroideos, opioides, entre otros. La anafilaxia puede ser el resultado de reacciones alérgicas agudas, las cuales son mediadas por IgE (vía inmunológica) que resulta en la liberación sistémica repentina de mastocitos y mediadores inmunológicos [1–3]. Así mismo, puede estar asociada con mecanismos inmunológicos dependientes de IgG1 e IgG2 que activan la cascada de señalización hacia basófilos y neutrófilos, resultando igualmente, en la liberación de mediadores inmunológicos [4]. No obstante, la anafilaxia puede darse por otras vías no inmunológicas las cuales no han sido totalmente esclarecida, sin embargo se conocen la activación directa por mastocitos y basófilos, por trastornos de las células mástiles primarias causadas por mastocitosis sistémica, síndrome de activación de mastocitos [5]

Por otra parte, la anafilaxia presenta en el cuerpo humano dos subtipos de reacciones: anafilactoides y shock anafiláctico. Las reacciones anafilactoides no están mediadas por inmunoglobulina E, que es la ruta que realiza el sistema inmune frente a la hipersensibilidad tipo 1 asociada a procesos alérgicos, no obstante, conducen a una sintomatología clínica similar a esta condición. Según el consenso de la Organización Mundial de Alergia (WAO, por sus siglas en Inglés), las reacciones anafilactoides se les denomina anafilaxia no inmune[6]. El shock anafiláctico por su parte, se presenta cuando el cuerpo no está recibiendo un flujo de sangre suficiente; es considerado de tipo distributivo, producido por la pérdida inicial de fluidos intravasculares, secundario al aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y depresión de los vasos sanguíneos que desencadenan síntomas que incluyen: eritema difuso, prurito, urticaria y/o angioedema; broncoespasmo; edema laríngeo; hiperperistaltismo; hipotensión y / o arritmias cardíacas [7,8]. Así mismo, pueden presentarse otros síntomas, como náuseas, vómitos, aturdimiento, dolor de cabeza, sensación de muerte inminente y pérdida del conocimiento y puede ocasionar paro cardíaco; por lo que dependiendo de sus presentaciones clínicas y niveles de gravedad es considerada potencialmente mortal [3,8].

Actualmente no existe una prueba para determinar la susceptibilidad de los pacientes que podrían presentar anafilaxia tanto del tipo anafilactoides como shock anafiláctico debido a

que los casos de anafilaxia se avalúan una vez el paciente ingresa en un entorno hospitalario y sus síntomas se identifican por medio de parámetros se miden según la Guía para el Diagnóstico y Manejo de la Anafilaxia de la WAO [9,10]. Aunado a esto, la ocurrencia de esta condición es generalmente fuera del entorno hospitalario, y para los pacientes hospitalizados las metodologías y los medios para identificar y clasificar los casos de anafilaxia son escasos, inexactos, costosos y presentan tiempos prolongados para la emisión de resultados [10,11].

Dentro de los biomarcadores pioneros en la determinación de anafilaxia están los mediadores preformados y neoformados, dentro de los mediadores preformados se encuentran los de la familia de las proteasas y los proteoglicanos: histamina, triptasa, quinasa, carboxipeptidasa. Sobre los mediadores neoformados, se produce fundamentalmente la estimulación de la síntesis de metabolitos lipídicos tales como prostaglandinas y leucotrienos por el ácido araquidónico. Otro tipo de mediadores implicados en la anafilaxia son la serotonina, la bradiquinina, la calcitonina y el óxido nítrico [4,12–14]. Sin embargo, a pesar de la variedad de biomarcadores utilizados, no existe un biomarcador de oro para pronosticar o determinar procesos anafilácticos, debido a que estos pueden presentar, una vida media corta, no son específicos y no pueden utilizarse para pronóstico, monitoreo o diagnóstico oportuno [15,16].

Por esta razón, otros biomarcadores se han descubierto, dentro de los que destacan quimasa, carboxipeptidasa A3, dipeptidil peptidasa I (DPPI), basogranulina y el factor activador de plaquetas (PAF) [17,18]. PAF está implicada en la agregación y activación plaquetaria que comúnmente ocurre en los procesos anafilácticos, como resultado de la interacción con su receptor (receptor del factor activador plaquetario, PAFR) que resulta en un aumento de la permeabilidad vascular, colapso circulatorio y disminución del gasto cardíaco [3,19–21]. Por su parte, la histamina al ser un mediador involucrado en procesos inflamatorios, se considera el indicador por excelencia de procesos alérgicos y anafilácticos [4,13,20,22]. Dichos biomarcadores durante un proceso alérgico o anafiláctico se liberan al torrente sanguíneo simultáneamente y provocan la respectiva cascada de señalización. No obstante, PAF presenta un antagonista, el PAF acetilhidrolasa, PAF-HA (por sus siglas en Inglés) cuya función es degradar el PAF producido por las células; el valor neto de PAF será la cantidad

no hidrolizada por la enzima y un valor alto permite discriminar procesos anafilácticos de procesos alérgicos. Se ha demostrado que, los valores de concentración normales de PAF están entre valores normales de 127 ± 104 pg/mL pero en en pacientes con anafilaxia severa, los niveles de PAF se estiman entre 805 ± 595 pg/mL, lo que no ocurre con la histamina, cuyos valores únicamente incrementan en los procesos alérgicos y no se diferencian con la aparición de anafilaxia severa y por sí misma no es posible identificar valores de concentración que permitan estratificar los procesos de anafilaxia [17,23]. En este trabajo se buscó desarrollar un análisis *in silico* de los receptores de histamina (HxR, por sus siglas en Inglés) y el factor activador de plaquetas (PAFR) y sus interacciones con los ligandos (histamina y PAF) y así evaluar la viabilidad de utilizar los receptores involucrados en el proceso de anafilaxia mediado como elementos de bioreconocimiento en el diseño del biosensor. Este diseño a proponer combina las bondades de los biomarcadores, pues histamina es el indicador por excelencia de procesos inflamatorios y PAF por su correlación en las concentraciones con la gravedad de la anafilaxia. De esta forma se presenta el diseño de un biosensor que permitirá diagnosticar pacientes con predisposición a presentar anafilaxia frente a la exposición de ciertas sustancias de las que ya se les ha generado una respuesta de hipersensibilidad con anterioridad, y pronosticar a personas que nunca antes se hayan expuesto a alguna sustancia e identificar si dicho individuo podría tener un riesgo a presentar una respuesta de activación de diversos mecanismos moleculares y posteriormente fisiológicos que en conjunto conducen a la anafilaxia, y en sus casos más graves, al shock anafiláctico.

2

ANTECEDENTES

La primera reacción anafiláctica que se tiene registrada históricamente data del año 2641 a.e.c. (antes de la era común) y corresponde a la muerte del faraón Menes, de Menfis, el cual tuvo una reacción por causa de una picadura de avispa provocando la muerte[24]. La primera descripción de una reacción inusual a las picaduras de abejas fue en 1699 y se encuentra en un artículo en latín de Udalricus Staudigelius (Ulrich Staudigl), descrita por un monje benedictino del monasterio de Andechs en Baviera [1]. En 1765 el Dr. Debreist registró la muerte de un paciente tras la picadura de una abeja. Posteriormente, en 1839 François Magendie realizó los primeros experimentos del efecto de la exposición ovoalbúmina (proteína de la clara del huevo que pertenece a la superfamilia proteínica de las serpinas), dicha proteína fue inyectada en conejos y provocaba la muerte de algunos de ellos. Los resultados se atribuyeron directamente al veneno de los animales, pero se desconocía el proceso de selección [7] .

Hasta ese momento no se le había designado algún término o explicación concisa a dicho fenómeno, pero en 1902 se decidió usar la palabra anafilaxia; su etimología deriva de los vocablos griegos Phylax (protección) y Ana (atrás). El término fue introducido en la literatura médica por dos investigadores franceses: Paul Portier y Charles Richet en 1902, para designar la reacción provocada por la inyección de una proteína heteróloga, previamente tolerada, por el organismo[25]. Por este descubrimiento se les otorgó el Premio Nobel de Medicina en 1913 [26,27]. La definición actual de anafilaxia según la RAE es: "Sensibilidad exagerada del organismo debida a la acción de ciertas sustancias orgánicas, cuando después de algún tiempo de haber estado en contacto con él, vuelven a hacerlo aun en pequeñísima cantidad, lo que produce desórdenes fisiológicos y a veces graves"[28]. De acuerdo con el documento de consenso del simposio sobre la definición y el manejo de la anafilaxia del año 2005 y 2014, se describe como "una reacción alérgica de inicio rápido que puede producir la muerte[6,9,29].

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

2.1.1. Factores de Riesgo

Se observan similitudes en muchos de los factores que aumentan el riesgo de episodios anafilácticos graves o mortales en pacientes de todo el mundo. La edad del paciente, las enfermedades concomitantes y los medicamentos que se toman al mismo tiempo pueden contribuir al desarrollo de una anafilaxia grave o mortal. Los cofactores pueden también amplificar los efectos de la anafilaxia[9]. Además, los episodios graves o mortales de anafilaxia pueden estar relacionados con defectos en las vías de degradación de los mediadores, lo que puede dar lugar a niveles elevados de triptasa, histamina, bradicinina (debido a la baja actividad de la enzima convertidora de angiotensina sérica) y factor de activación de plaquetas (PAF) (debido a la baja actividad de la fosfolipasa A2 sérica) [5,9].

Se sabe que los principales causantes de anafilaxia en niños están relacionados por ingerir algún tipo de alimentos, fármacos y en menor porcentaje las picaduras por himenópteros [30]. Comenzando con la población más sensible a esta fisiopatología un estudio mostró que la incidencia de la anafilaxia en niños de todo el mundo varió ampliamente, oscilando entre 1 y 761 por cada 100 000 personas-año para la anafilaxia total y 1 a 77 por 100 000 personas-año para la anafilaxia inducida por alimentos [10], Para datos de población en general de acuerdo a estadísticas desde el 2002-2004 se estima que aproximadamente la anafilaxia se presenta entre 50 a 2000 episodios por cada 100.000 personas por año. El número de muertes asociada a esta condición se estima entre 0,33 y 3 muertes por 1.000.000 de personas al año [11] Sin embargo, puede ser mayor en pacientes asmáticos, adolescentes y ancianos con comorbilidades [31]. El pobre reconocimiento de la anafilaxia y la baja frecuencia de prescripción de autoinyectores de adrenalina sugieren que las reacciones no se manejan de manera óptima [32].

2.1.2. Etiología

La mayoría de los niños pierden la sensibilidad a la mayoría de los alimentos alergénicos durante los primeros cinco años de vida [33]. En 1989 un estudio mostró que 85% de los niños con alergia a la leche de vaca en los primeros dos años de vida son tolerantes a la leche a la edad de 3 años [34]. La mayoría de los niños pierden la sensibilidad a la mayoría de los alimentos alergénicos durante los primeros cinco años de vida [33] Un estudio presentado en

1998, realizado por Rohrer y colaboradores, en el Instituto para la Inmunología y la Alergología (Inselspital, Berna) donde 5689 sujetos fueron remitidos desde mayo de 1994 hasta octubre de 1996, a la clínica ambulatoria de inmunología alérgica de la Universidad de Berna identificaron agentes causales en el 93,2% de estos ataques; incluyeron medicamentos (33,9%), picaduras de insectos (23,7%), alimentos (18,6%), ejercicio (8,5%), látex (7,6%) e inmunoterapia (0,9%) con extractos de polen. No se pudo determinar una causa sospechosa en 8 sujetos. Concluyendo que la causa de la anafilaxia podría determinarse en la mayoría de los pacientes con anafilaxia. Sin embargo, las exposiciones inesperadas son frecuentes [35].

2.1.3. Recurrencia y persistencia de la anafilaxia

Las reacciones anafilactoides son el resultado de respuestas no mediadas por IgE, como las que producen algunos agentes químicos que de una manera inespecífica degranulan los mastocitos; la sintomatología que generan puede ser indistinguible de la que aparece en el curso de un shock anafiláctico [36]. La intensidad de la reacción no solo está influenciada por el grado de sensibilización, sino también por otros factores que actúan en conjunto como la edad, la exposición simultánea frente diferentes alérgenos, la infección subyacente, la actividad física o el estrés psicológico o la administración de múltiples medicamentos [24].

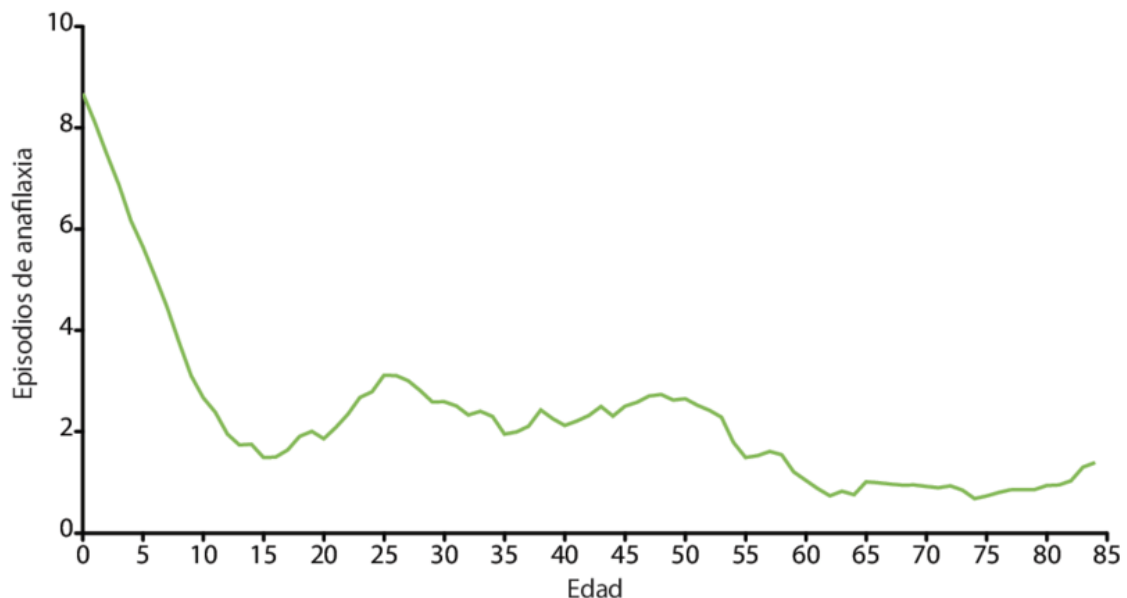


Figura 1. Los casos de anafilaxia se enumeran por edad respecto al número de episodios de acuerdo al grupo de estudio de Alvarez-Perea [37].

Alvarez Perea y colaboradores mostraron que la diferencia entre la incidencia hallada en adultos la incidencia fue de 80 casos por cada 100.000 pacientes admitidos y en niños la incidencia acumulada de 12 casos por cada 10.000 pacientes admitidos lo cual es altamente significativa (ver figura 1) [29,37]. Lo anterior permitió esclarecer los episodios de anafilaxia tanto en poblaciones adultas como infantiles.

La anafilaxia puede ser recurrente o bifásica y esta se vuelve a presentar entre 8 a 12 horas después del ataque inicial en hasta el 20% de los sujetos que experimentan anafilaxia. Los investigadores han observado que los sujetos con episodios bifásicos no difirieron clínicamente en la presentación inicial, pero requirieron significativamente más epinefrina para mejorar sus síntomas iniciales en comparación con aquellos con reacciones [38]. Comprender los posibles desencadenantes, mecanismos y factores de riesgo específicos del paciente para la gravedad y la mortalidad es la clave para realizar una evaluación de riesgo adecuada en aquellos que previamente han experimentado un episodio anafiláctico agudo [39].

2.2 FISIOPATOLOGÍA

2.2.1 Anafilaxia inmunológica

➤ Anafilaxia y Alergias

Las reacciones alérgicas pueden ser leves, moderadas o graves. El primero está relacionado a los típicos síntomas que afectan un área específica del cuerpo y se caracteriza por sarpullido con picazón, urticaria, lagrimeo de los ojos y congestión nasal, un ejemplo es el síndrome de alergia oral, las reacciones moderadas están relacionadas a la propagación de dicha sintomatología dirigida a otras partes del cuerpo y pueden incluir dificultad para respirar, por último una reacción severa es conocida como anafilaxia con compromiso cardiorrespiratorio acompañante, pero una anafilaxia no siempre se presenta por la ingesta de algunos alimentos [40]. Los factores de riesgo que pueden rectificarse incluyen la insuficiencia de vitamina D, el consumo de grasa no saludable que afecta la dieta, la obesidad, el aumento de la higiene y la exposición a los alimentos, este último es el que tiene más incidencia, pero otros problemas de estilo de vida que conllevan a factores epigenéticos también juegan un papel [41]. En la última década existen artículos relacionados a la seguridad alimentaria con respecto a los alérgenos presentes en alimentos. Esta fisiopatología tiene como nombre AA (Alergias Alimentarias) que en casos más graves pueden conducir a una anafilaxia o incluso al shock anafiláctico [30].

➤ Anafilaxia mediada por IgE

La hipersensibilidad ocurre cuando una exposición subsecuente al mismo antígeno induce la producción de IgE a gran escala, las que se unen a los receptores Fcε presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos. La interacción de la IgE unida a mastocitos y basófilos con su antígeno induce degranulación y liberación de mediadores inflamatorios, que ocasionan alteración en la permeabilidad capilar (urticaria, edema), vasodilatación, broncoconstricción, hipotensión con taquicardia y otros signos y síntomas observados en la anafilaxia [12]. Los mastocitos se marginan posteriormente en el tejido conjuntivo, mientras que los basófilos circulan en la sangre pasando a los tejidos como parte de la respuesta inflamatoria. Ambos se caracterizan por tener gránulos citoplasmáticos que contienen histamina preformada. Se produce entonces una degranulación de los mastocitos y basófilos, que liberan más de 30 sustancias inmunoactivas, inmunomoduladoras e inflamatorias. La unión de un antígeno con

dos anticuerpos en la membrana del mastocito genera la activación inmunológica de ésta, induciendo la movilización de sus gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular y liberación de su contenido, compuesto por histamina (uno de los principales mediadores preformados liberados en una anafilaxia[16,32,42–44]).

➤ Anafilaxia no mediada por IgE

Después de la exposición a alérgenos, se producen anticuerpos IgE e IgG, (ver figura 2) la IgE se une a FcεR en mastocitos, para posteriormente dar una respuesta secundaria mediante la degranulación del mastocito y liberación de mediadores preformados, neoformados, histamina y PAF. Algo diferente ocurre con los basófilos y neutrófilos forman complejos inmunológicos con los antígenos gracias a los FcγRIII y FcγRIV que son activadores de IgG1 e IgG2 respectivamente, lo que conduce a la liberación de PAF. Los neutrófilos también expresan FcγRIII, y también responden a los complejos IgG1/alérgenos [4].

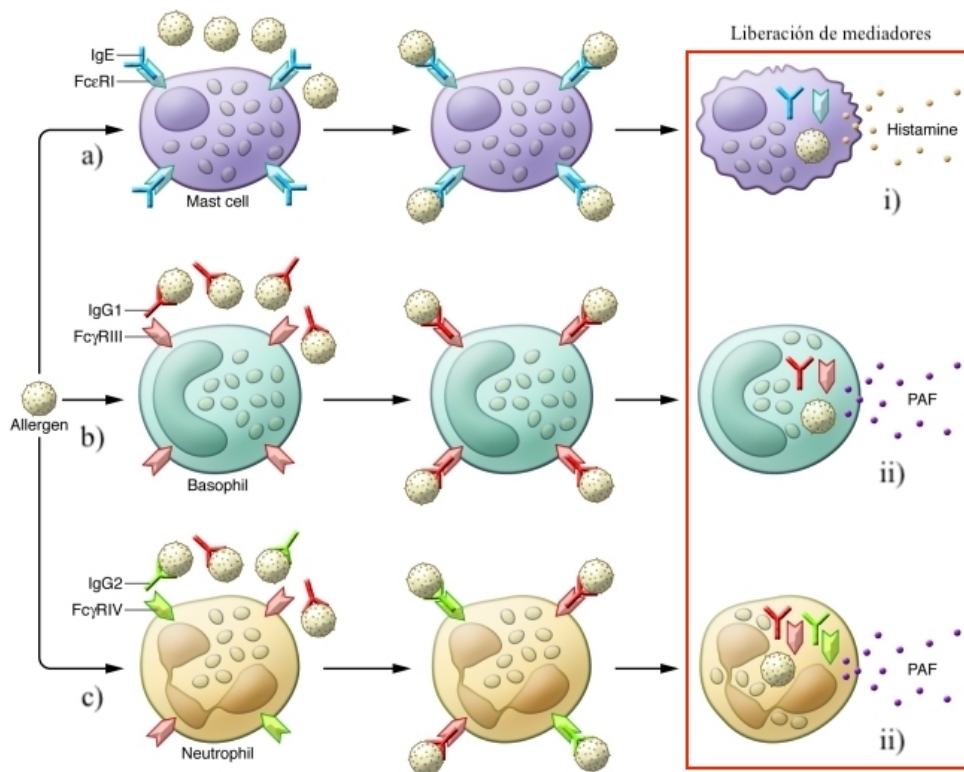


Figura 2. Esquema del reconocimiento de un alérgeno por IgE para mastocitos, IgG1 para Basófilos e IgG2 para Neutrófilos, para posteriormente llevar a cabo la liberación de mediadores involucrado en la anafilaxia [4].

2.3. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de una causa específica de anafilaxia puede estar respaldado por los resultados de pruebas cutáneas, pruebas de IgE *in vitro* y/o pruebas de provocación (en particular, pruebas de provocación doble ciego controladas por placebo) [45]. Pero las nuevas tecnologías desarrolladas en los últimos años permiten obtener resultados cada vez más efectivos y menos comprometedores con la seguridad del paciente además de evitar la incomodidad que causaban las técnicas de diagnóstico convencionales. Las pruebas cutáneas o pruebas *in vitro* que determinan la presencia de anticuerpos IgE específicos pueden identificar la causa específica de una reacción alérgica. Las causas de las reacciones alérgicas que se pueden definir de esta manera incluyen alimentos, medicamentos (como la penicilina y la insulina) y picaduras de insectos. Las pruebas estandarizadas por métodos *in vivo* o *in vitro* no están disponibles para la mayoría de los medicamentos. Estas pruebas solo son válidas si la reacción se debe a un verdadero evento alérgico (reacción mediada por IgE) en lugar de una reacción anafiláctica no mediada por IgE [45].

La aplicación y desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro* están diseñadas para permitir el diagnóstico sin riesgo para el paciente, lo que es especialmente ideal en el caso de reacciones graves como la anafilaxia. El diagnóstico *in vitro* de anafilaxia implica, entre otras cosas, mediciones en serie de mediadores liberados durante la anafilaxia, como triptasa, histamina, quimasa, carboxipeptidasa A3, factor activador de plaquetas y otros productos de mastocitos. Los desencadenantes de las reacciones alérgicas se pueden detectar mediante métodos serológicos: IgE sérica específica o mediante pruebas celulares que miden la liberación de mediadores basófilos como leucotrienos e histamina, otro método es el análisis de la expresión de marcadores basófilos, denominada técnica probada para la activación de basófilos. Estas técnicas ofrecen interesantes alternativas para el diagnóstico de las reacciones alérgicas [13]. En 2008 se mostró que los niveles séricos de PAF se han correlacionado directamente con la anafilaxia y la actividad sérica de PAF acetilhidrolasa se correlacionó inversamente con la gravedad de la anafilaxia [23]. El mismo grupo de investigadores reportó que la actividad de la acetilhidrolasa de la PAF fue significativamente menor en pacientes con reacciones anafilácticas mortales a los cacahuates que en pacientes en cualquiera de los grupos de control lo que concluye en que el fracaso de la PAF acetilhidrolasa para inactivar la PAF puede contribuir a la gravedad de la anafilaxia [20,21].

2.4 DISEÑO *IN SILICO*

Las simulaciones han demostrado ser valiosas para descifrar los mecanismos funcionales de las proteínas y otras biomoléculas, descubrir la base estructural de la enfermedad y diseñar y optimizar moléculas pequeñas, péptidos y proteínas [46]. Han surgido diseños creativos de biosensores de proteínas fluorescentes que se han utilizado para medir la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos y iones [47]. El impacto de las simulaciones de dinámica molecular (MD) en la biología molecular ha aumentado drásticamente en los últimos años. Las mejoras significativas en la velocidad, precisión y accesibilidad de la simulación, junto con la proliferación de datos estructurales experimentales, hacen que la simulación biomolecular sea atractiva para los experimentadores, una tendencia particularmente notable [48]. Los biosensores son herramientas analíticas con una gran aplicación en salud, control de calidad de alimentos y monitoreo ambiental. El diseño de biosensores con funcionalidad mejorada o aplicación en la detección de nuevos objetivos se ha convertido en un campo de rápido crecimiento de las ramas de la biomedicina y la biotecnología [48]. Las simulaciones de dinámica molecular se han convertido en una herramienta estándar para la investigación biomolecular. Las simulaciones de sistemas cada vez más grandes se realizan utilizando condiciones de contorno más realistas y un mejor muestreo debido a tiempos de muestreo más prolongados [47]. El diseño computacional de biosensores se presenta como una clave prometedora para eliminar la brecha. Se requiere un conjunto de predicción de estructura confiable de los segmentos del biosensor, su estabilidad y descriptores precisos de las interacciones moleculares para diseñar biosensores computacionalmente [46].

Para realizar el estudio y diseño de la interacción ligando-receptor de manera *in silico*, se requiere contar con el modelo tridimensional de la matriz en donde se inmovilizará los receptores y el modelo tridimensional de las proteínas, así como los ligandos endógenos. Hacer un modelado de las proteínas resulta un tanto complejo por dos motivos principales, el primero es que se requiere de la existencia de un modelo ya sea, obtenido por cristalografía, impacto electrónico o RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y el segundo es que los datos de referencia estén disponibles en bases de datos para llevar a cabo el procesamiento de la información en softwares especializados.

2.5 HISTAMINA, PAF, Y SUS RECEPTORES HXR Y PAFR

2.5.1 Histamina y PAF

➤ Histamina

La Histamina es el principal mediador de la cascada inflamatoria en el shock anafiláctico[42]. La histamina se produce a partir de la L-histidina mediante la L-histidina descarboxilasa, que utiliza piridoxal-5'-fosfato como cofactor, se trata de una amina biogénica que se sintetiza exclusivamente de esta manera[49]. La histidina descarboxilasa se encuentra en varias células del cuerpo, incluyendo la mucosa gástrica, las neuronas, las células parietales, los mastocitos y los basófilos. Su expresión es amplia en estas células [42,49]. La capacidad de producir y almacenar grandes cantidades de histamina en gránulos está presente solamente en los basófilos y mastocitos. En estos gránulos, la histamina se asocia con condroitina-4-sulfato en los basófilos y con proteoglicanos aniónicos heparina en los mastocitos [50]. Un estudio demostró que las recurrencias de alergia alimentaria y la duración de estas incrementa en pacientes que presentan mayores niveles de histamina y triptasa, ambos biomarcadores aumentaron sus niveles en algunos pacientes que no tenían signos de las vías respiratorias, cardiovasculares o abdominales; los niveles de histamina se correlacionan más que la triptasa con los signos clínicos pero el aumento de ambos biomarcadores no está forzosamente asociados a la sintomatología característica del cuadro alérgico [22].

➤ Factor Activador de Plaquetas (PAF)

PAF es un mediador fisiopatológico en múltiples trastornos inflamatorios, químicamente es un fosfolípido (1-0-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosforilcolina). La PAF se hidroliza rápidamente y se degrada a un metabolito inactivo, el liso PAF, por la enzima PAF acetilhidrolasa, cuya actividad ha demostrado correlacionarse inversamente con los niveles de PAF y predispone a una anafilaxia grave [17,23]. Además de su papel en la anafilaxia, la PAF también ha estado implicada como mediadora en enfermedades inflamatorias alérgicas y no alérgicas, incluyendo rinitis alérgica, sepsis, enfermedad aterosclerótica y malignidad, en las que la señalización PAF tiene un papel establecido [17]. El mecanismo molecular subyacente a su función proinflamatoria aún no se ha aclarado completamente sin embargo se conoce por ejemplo que puede participar en activación del inflammasoma por PAF pero requiere flujo de potasio y afluencia de calcio, pero no catepsina lisosómica o especies de oxígeno reactivo mitocondrial [51] Vadas y colaboradores publicaron en 2013 que los niveles

de PAF se elevan significativamente en proporción a la gravedad de las reacciones alérgicas agudas. Ni la histamina ni la triptasa mostraron correlaciones tan buenas con las puntuaciones de gravedad como lo hizo el PAF. Lo anterior confirma el papel fundamental del PAF como mediador de la anafilaxia [20,21]. PAF está implicada en la agregación y activación plaquetaria a través de la liberación de aminas vasoactivas en la respuesta inflamatoria, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad vascular, colapso circulatorio, disminución del gasto cardíaco [19]. Por lo que Histamina por su variedad de receptores en diferentes sitios del cuerpo humano y PAF por su correlación con la gravedad de la anafilaxia son los biomarcadores que pueden ser medidos y relacionados con la predisposición de una persona con riesgo a shock anafiláctico.

A continuación, se describen las características más importantes de los receptores de Histamina y el receptor de PAF, a fin de identificar los candidatos más viables que garanticen el mejor acoplamiento a los biomarcadores seleccionados:

2.5.1 Receptores de Histamina (H1R, H2R, H3R y H4R)

Los receptores de histamina son proteínas que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G[43]. Existen cuatro tipos de receptores principalmente: H1R, H2R, H3R y H4R (por sus siglas en Inglés) los cuales se agrupan como HxR para el conjunto de receptores y hHxR para los subtipos [44]. La estimulación del receptor de histamina tipo 1 (H1R) causa el efecto H1 que es la contracción del músculo liso de las vías respiratorias, dolor abdominal y dificultad para respirar; el H1R conduce a un aumento de la permeabilidad vascular, media la señalización neurosensorial y la dilatación. Se le ha involucrado en rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis, urticaria, asma y anafilaxia [21]. A través del H1R, la histamina aumenta la capacidad de las células presentadoras de antígenos, aumenta la liberación de histamina y otros mediadores de los mastocitos y basófilos, regula la inmunidad humoral y el cebado de Th, la proliferación de Th1, la producción de IFN-g y la expresión de moléculas de adhesión celular. y quimiotaxis de eosinófilos y neutrófilos [14]. La estimulación del receptor de histamina tipo 2 (H2R) en el corazón induce una reacción inotrópica y cronotrópica positiva y dilata los vasos coronarios. La estimulación simultánea de H1R y H2R provoca síntomas como enrojecimiento de la piel, dolor de cabeza,

disminución de la presión arterial, los efectos de la activación del H2R. Los receptores de histamina tipo 3 (H3R) se encuentran en el hipotálamo y su estimulación dificulta la liberación de norepinefrina, esto luego contribuye al shock [21]. La afinidad del receptor tipo 4 (H4R) por la histamina es mucho mayor que la del receptor H1. El papel del H4R en la anafilaxia radica en la intensificación de la quimiotaxis de eosinófilos y mastocitos y la expresión de moléculas de adhesión, la movilización y diferenciación de monocitos, linfocitos TH1 / TH2 y la estimulación de la producción de citocinas y quimiocinas por células dendríticas y linfocitos T [52]. Dicho receptor puede ser regulado para terapia dirigida en el tratamiento de diversos trastornos gastrointestinales. En 2015, Deiteren et al. mostraron que comparación con los receptores H1R y H2R, la histamina muestra una alta afinidad por el receptor de histamina tipo 4 en humanos, que al unirse a la histamina presenta un pKi de 7.8, y para H1R su pKi es de 7.4.2 y para H2R de 4.3 [53].

2.5.2. Receptor del Factor activador de plaquetas (PAFR)

El receptor PAF muestra características estructurales de la familia de genes rodopsina (MIM 180380) y se une al factor activador plaquetario (PAF) [51]. Se ha descubierto que el PAF regula negativamente sus propios receptores en las plaquetas y en las células de Kupffer cultivadas además de que el pretratamiento de plaquetas humanas con PAF condujo a una disminución en la unión específica de PAF [54]. El factor de activación plaquetario promueve la liberación por parte de las plaquetas de factores quimiotácticos para eosinófilos, y el de los factores quimiotácticos como LTB₄, ECF-A (Factor quimiotáctico anafiláctico eosinófilo) y NCF-A (Factor quimiotáctico anafiláctico neutrófilo) [3]. El receptor del factor activador plaquetario está acoplado a la proteína G, esta misma modula el proceso de transducción de señales inducido por PAF que se une al factor activador de plaquetas. Receptor de siete transmembranas acoplado a la proteína G (PAFR), tanto en conejos como en plaquetas humanas y también en leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN), aunque el receptor PAF en los PMN humanos también puede ser diferente del de los eosinófilos humanos [55].

La especificidad del parátipo del PAFR es aguda impidiendo la activación del receptor por fosfatidilcolinas. Generalmente, cualquier factor que afecte el proceso de unión de PAF a su

receptor o la subsiguiente transducción de señales mediada por el receptor de PAF es igualmente candidato como regulador de receptores de PAF específicos [54]. PAF activa las células, incluidos los monocitos, a través de un único receptor caracterizado molecularmente, el receptor PAF (PAFR), a concentraciones extremadamente bajas. El PAFR reconoce el residuo corto, un residuo de acetato, en la posición 2 del fosfolípido. Esta especificidad aguda impide la activación del receptor por otras fosfatidilcolinas relacionadas [51].

Tomando en consideración las características de los receptores antes descritas, se seleccionaron *a priori* los receptores H1R, H2R, H3R, H4R y PAFR para comparar mediante un estudio *in silico* el nivel de interacción que cada uno de estos presenta con sus respectivos ligandos endógenos, Histamina y PAF. Los mejores candidatos serán seleccionados para desarrollar una propuesta de un biosensor que permita dar un pronóstico/diagnóstico de riesgo de presentar una anafilaxia o en sus casos más graves un shock anafiláctico. Es importante destacar que hasta el momento no se encuentra descrito en literatura un dispositivo que aborde el uso de Histamina y PAF de manera conjunta para la determinación de riesgo anafiláctico[16,20,23,43,52,56].

3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Debido a que la respuesta de la anafilaxia se presenta cuando hay un reconocimiento de mediadores involucrados en la respuesta fisiológica del individuo frente a la exposición del agente causal como alimentos, fármacos y vacunas, se propone que un análisis *in silico* de la interacción de los receptores de histamina (H1R, H2R, H3R y H4R) y PAF permitirán identificar la viabilidad de sus usos como elemento de reconocimiento para el diseño de un biosensor para pacientes con riesgo de anafilaxia grave.

3.2 Objetivo general

Realizar el diseño de un biosensor que permita pronosticar a personas con riesgo a Anafilaxia grave, a partir del análisis *in silico* de los receptores de histamina y el receptor del factor activador de plaquetas (PAF).

3.3 Objetivos particulares

- Hacer un modelado molecular de los receptores de histamina y el factor activador de plaquetas, para conocer la naturaleza y composición química, comparar sus estructuras, identificar inconvenientes para su inmovilización y conocer su energía de estabilidad.
- Realizar un docking molecular de los receptores de histamina y el receptor de PAF con sus respectivos ligandos (histamina y PAF: mcPAF, PAF-C16-d4 y PAF-C18) para identificar aquellos complejos que muestra mayor energías de acoplamiento y así seleccionarlos en el diseño del biosensor.
- Analizar las interacciones en el sitio activo de Histamina y PAF para identificar los enlaces químicos que determinan las diferencias de energías de acoplamiento.

4

METODOLOGÍA

El presente trabajo bioinformático se dividió en tres etapas, la primera que consta del modelado por homología de los receptores HR2, HR3 y HR4, dado que HR1 y PAFR se encuentran reportados en la literatura con los códigos PDB ID: 3RZE y ID: 5ZKP [57,58]. respectivamente. La segunda fase constó en la preparación de las proteínas a condiciones fisiológicas. La tercera fase se desarrolló un análisis de acoplamiento proteína ligando para determinar la energía y modo de acoplamiento de cada uno de los ligandos endógenos respectivamente.

4.1 Modelado por Homología.

Se utilizó el módulo de modelado por homología de la Suite Schrodinger con el Módulo Prime en la plataforma Bioluminate [59,60]; utilizando para HR2 de plantilla la proteína ADRB1 que corresponde a la estructura del receptor adrenérgico β 1 acoplado con epinefrina con código PDB ID: 7BTS para HR3 y H4R se encontró de plantilla la estructura del receptor muscarínico de acetilcolina M3 con código PDB 4U15 [61,62].

4.2 Preparación de las proteínas.

Las proteínas obtenidas de Cristal HR1 y PAFR, así como las proteínas modeladas HR2, HR3 y HR4, se prepararon a condiciones fisiológicas con el módulo Protein Preparation Wizard con la suite Piper-Prime, de acuerdo con el protocolo previamente reportado [60,63].

4.3 Docking Molecular.

Los sitios activos de las proteínas fueron asignados de acuerdo a la literatura y al cocrystal en el caso de los obtenidos del protein data bank, para el estudio de acoplamiento molecular se utilizó un nivel de alta precisión con flexibilidad en el sitio activo de acuerdo al protocolo previamente reportado [63].

5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El diseño de biosensores es un campo complejo, que involucra desde la elección del receptor a fijar dependiente del elemento de reconocimiento, el tipo de matriz de soporte, el tipo de respuesta fisicoquímica y el lector de la misma. Un biosensor debe presentar la mayoría si no es que todas las características sobresalientes como: sensibilidad, selectividad, confiabilidad, tiempo de vida, operación y mantenimiento, no pretratamiento de la muestra y tiempo de análisis. Para el diseño de este se consideran los siguientes componentes: analito, biorreceptor, transductor electrónico (transforman la señal análoga a una digital) y el display que es el sistema de interpretación y presentación de los resultados obtenidos [48]. Dado la búsqueda de considerar el posible elevado costo, tiempo y complejidad de algunos de los procesos del diseño de un biosensor es necesario el uso de otras herramientas, particularmente, las herramientas bioinformáticas que han revolucionado este tipo de diseños, debido a que permiten analizar las interacciones tanto con el ligando como con la matriz de soporte del sensor.



Figura 3. Etapas del análisis *in silico* para el diseño del biosensor para la detección de anafilaxia grave.

En la figura 3, se puede observar las etapas desarrolladas para el análisis *in silico*, lo cual permitirá la elección de los receptores de histamina y PAF adecuados como elementos de bioreconocimiento para el prediseño de un biosensor que permita una elevada interacción ligando-receptor.

5.1 Análisis, preparación y modelado de receptores.

De las 5 proteínas seleccionadas para este trabajo (H1R, H2R, H3R, H4R y PAFR) únicamente dos se encuentran en su forma cristalizada: H1R y PAFR (ver figura 4). Lo anterior es una limitante y el estudio *in silico* quedaría reducido a estas dos proteínas disponibles, pero dado que las isoformas H2R, H3R y H4R también se encuentran asociadas a esta enfermedad, se procedió a modelar las estructuras de los receptores no reportados para conocer su interacción con la histamina. Una alternativa para esto es el uso de la homología molecular, proceso en el cual se puede obtener un modelo tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, siendo la limitante, que se conozca dicha secuencia para las 3 faltantes, de las cuales, afortunadamente se encuentran reportadas en UNIPROT (repositorio central de datos gratuito sobre proteínas).

El nivel idóneo del pH en la sangre debe oscilar entre 7.35 y 7.45[64]. Debido a que los modelados se hicieron en condiciones fisiológicas se trabajó a un pH de 7.4, el tipo de campo de fuerza usada para los modelados fue OPLS4. En la figura 4 se puede observar a los modelos cristalizados de H1R y PAFR en los cuales tienen señalados el sitio activo en círculos (azul para H1R y en rojo para PAFR) esta región corresponde a la región transmembranal. En ambos casos (H1R y PAFR) las hélices verde y naranja mostradas en la figura 4 unen al sitio transmembranal con la región redonda globular.

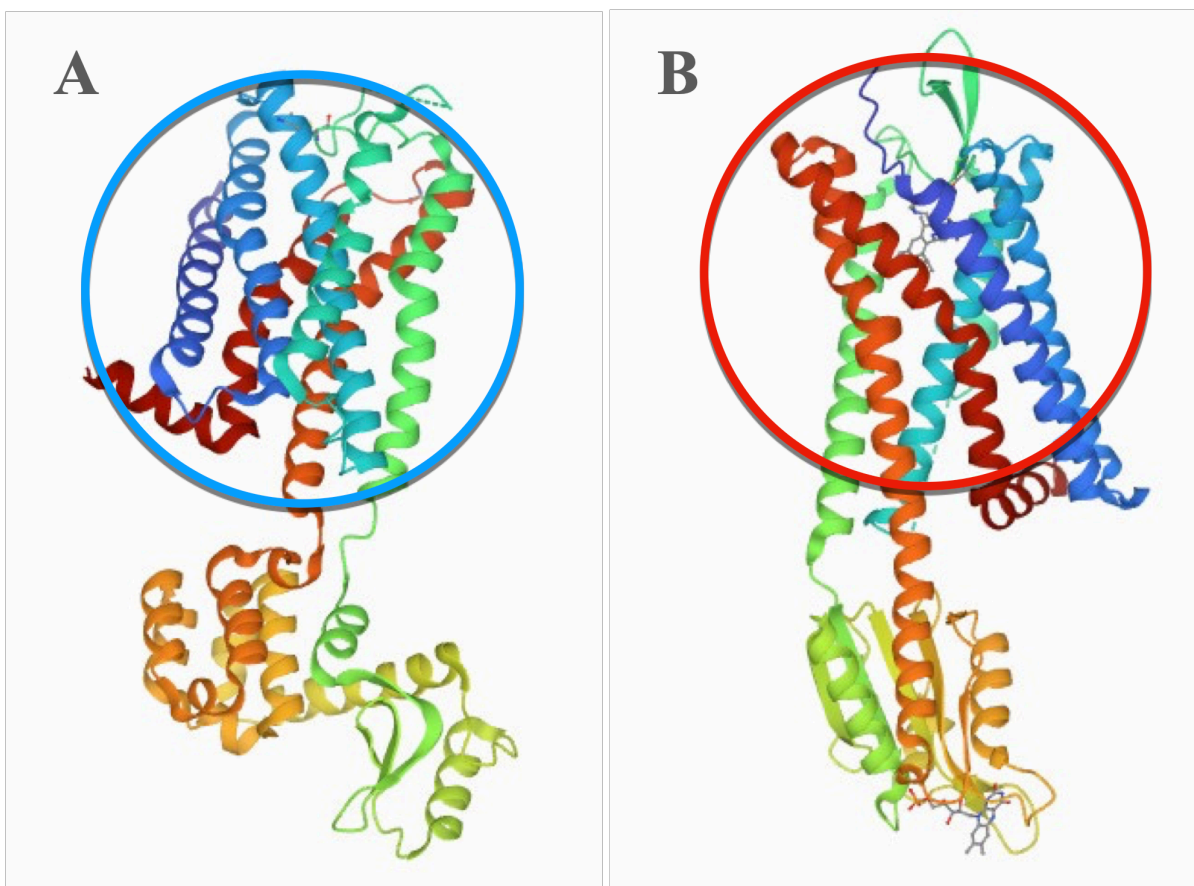


Figura 4. Modelos 3D correspondientes a la forma cristalizada de A) H1R pdb ID: 3RZE, B) PAFR pdb ID: 5ZKP [57,58].

Después de obtener los modelos tridimensionales se continuó con el estudio de preparación y optimización de las proteínas, a través del cual, se añadieron a cada una de las proteínas los estados de protonación, interacciones intermoleculares y enlaces disulfuros. Lo anterior permitió obtener un análisis conformacional y las características que describen la naturaleza química de la proteína, y de esta forma predecir el comportamiento de los receptores frente a las interacciones con sus respectivos ligandos. A continuación, se presenta el estudio del modelado molecular y procesamiento de cada uno de los receptores seleccionados.

5.1.1 Receptor de Histamina tipo 1 (H1R)

Para el receptor de histamina tipo 1, se encuentra reportado un cristal con código pdb 3RZE de humano, obtenido en sistema de expresión por *Komagataella pastoris*, este se encuentra cocrystalizado con doxepina (un antagonista del H1R, también medicamento utilizado como

tratamiento depresivos, ansiedad y el insomnio y tratamiento del prurito cutáneo) que se encuentra profundamente en el sitio de unión al ligando e interactúa directamente con Trp 428, un residuo clave altamente conservado en la activación de los receptores acoplados a la proteína G) [65,66]. Lo que ubica el sitio activo que deberá estar disponible para el acoplamiento cuando el receptor este fijo dentro de una matriz.

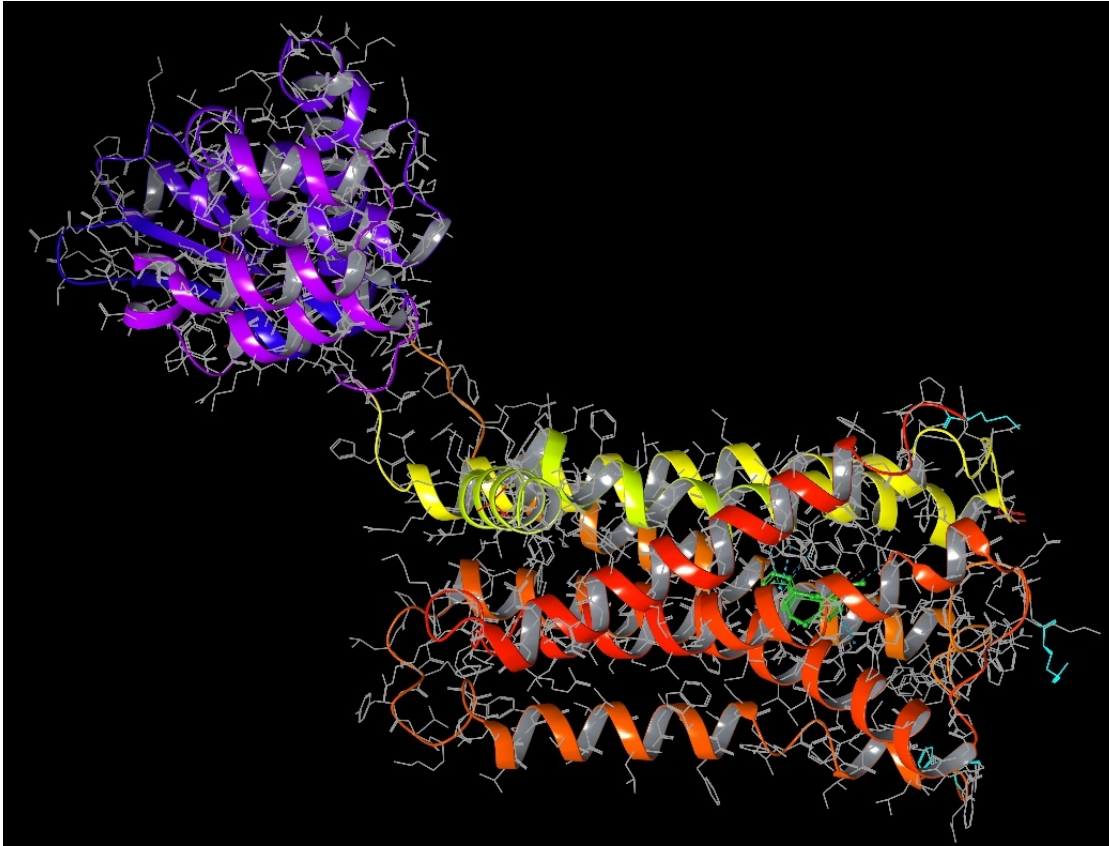


Figura 5. Modelo 3D del receptor de histamina tipo 1 con código pdb 3RZE.

Después de obtener el modelo de cristal para preparar dicha proteína se construyen las interacciones como primer paso, posteriormente se procede a completar los estados de protonación, establecer los sistemas aromáticos y formación de los puentes de hidrógenos, en la figura 5.1 podemos observar el resultado de estas dos etapas, donde se forman adecuadamente las alfa hélices y la conexión entre las dos regiones. En la región de color morada se encuentra un sitio de unión (ASN 126 y LYS 127) para el reconocimiento de (2*R*)-2,3-Dihydroxypropyl(9*Z*)-Octadec-9-Enoate, la doxepin es reconocida por la región acoplada a la proteína G con las alfa hélices presentadas en color naranja, roja y amarilla [57].

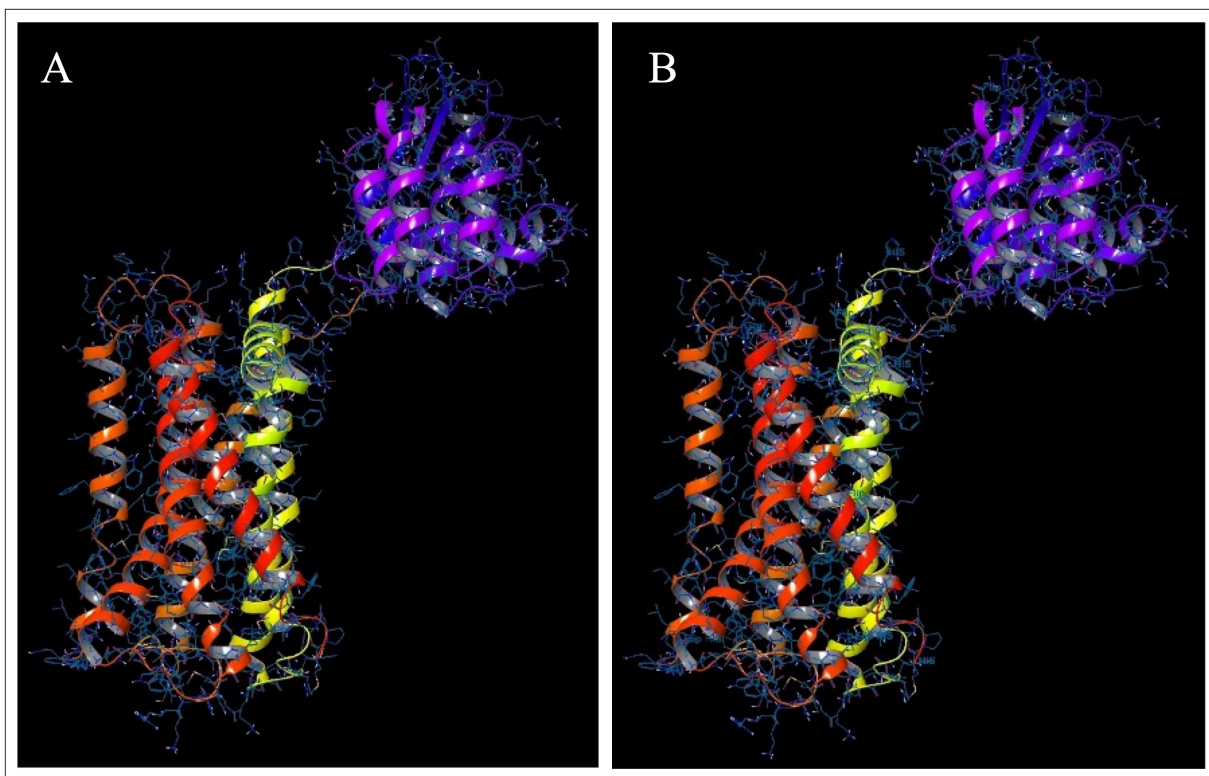


Figura 5.1. Modelo 3D de H1R con código pdb 3RZE, A) protonado, B) estabilizado.

Con los modelos optimizados y con la formación de puentes de hidrógeno, es necesario establecer si el modelo es óptimo y particularmente, permitir el libre giro de sistemas como histidina, cisteínas y tirosinas, por lo que al minimizar el sistema completo se obtuvo una energía de -973.58 kcal/mol, lo que indica una alta estabilidad del sistema, lo cual lo vuelve idóneo para el uso de este en estudios teóricos, particularmente en la figura 5.1 podemos observar varias regiones de interés, primero en la región blanca se encuentran las histidinas en forma básica (HIP) y con giro por partes de las tirosinas, lo que esta región tienen una alta flexibilidad, no siendo idónea para el fijado sobre una matriz, ya que dependería de muchas variables, destacando el pH y la temperatura, por lo que no es idóneos el anclaje en esta región.

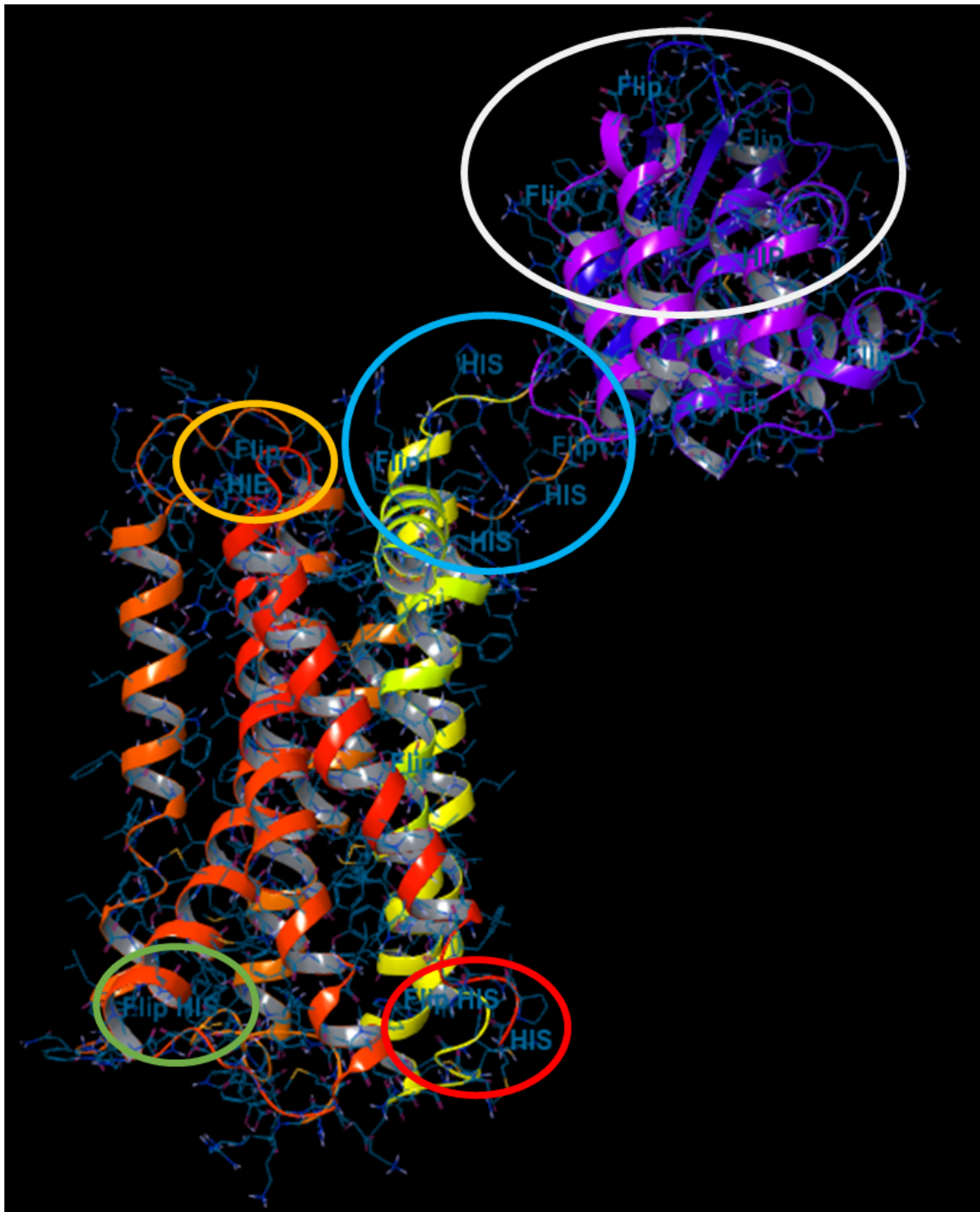


Figura 5.2. Modelo 3D minimizado H1R.

Continuando con el análisis en la región azul podemos observar unidades de histidina 4 pero solo 2 con movimiento lo que permite que esta se pueda plegar, mover de arriba abajo, pero en un volumen limitado de la región superficial, en la parte superior de la región de alfa hélices, encontramos una región naranja que tiene una histidina en forma acida (HIE) que

funciona como control del paso de moléculas pero de bajo volumen, mientras que en la región inferior, en la región roja y verde las histidinas en estado naturales presentan libre giro y da paso a la entrada de moléculas de control, como el ligando endógeno sitio que se encuentra en la región superior a la verde y roja, garantizando este sitio como el de acceso del ligando endógeno.

Al estudiar todo el modelo y todas las fases de preparación, esta proteína resulta viable para el acoplamiento y soporte en una matriz, pero deberán considerarse varios criterios de exclusión o limitantes del modelo final obtenido, en primera instancia que la región citoplasmática o alfa hélices moradas, no es idónea para el soporte dado la gran movilidad obtenida, mientras que el resto de la proteína si es suficientemente estática para un soporte adecuado en una matriz de grafeno o de nanotubos su fuera el caso de estudio, pero se deberá garantizar que el sitio de unión debe ser en paralelo a esta región o perpendicular en la parte superior, porque en la inferior deberá estar disponible para la entrada de la histamina y lograr así el acoplamiento adecuado para la detección de los niveles del mismo.

5.1.2 Receptor de Histamina tipo 2 (H2R)

A finales de las décadas de 1970 y 1980, los antagonistas de los receptores de histamina tipo 2, revolucionaron el tratamiento de la úlcera péptica y otras enfermedades relacionadas con el ácido gástrico lo que dejó la puerta abierta para comenzar a realizar estudios más profundos sobre H2R [67]. Hok et al., realizaron una gama de técnicas computacionales para revelar una mayor afinidad de la histamina por su receptor H2 tras la deuteración, para acomodar su agonista endógeno histamina, este último particularmente adecuado para inspeccionar las alternancias en los patrones de enlaces de hidrógeno y las afinidades que los acompañan, confirmando así la relevancia del enlace de hidrógeno para la activación del receptor H2 [68]. A pesar de ello, después del *Docking Simulation* (simulación de acoplamiento, proceso computacional utilizado para predecir la interacción entre dos moléculas, que nos ayuda a predecir cómo se unirán las dos moléculas y para calcular la energía asociada con esta interacción, obteniendo información de cómo podrían ser diseñados compuestos que se unan de manera efectiva a la proteína en cuestión[69–71]. No se llevaron a cabo una cristalización o modelado base del receptor de histamina tipo 2.

Para el caso del receptor de histamina tipo 1, al contar con el cristal el proceso de preparación fue directo, sin embargo, no en todos los casos se cuenta con un modelo de cristal, lo cual se puede deber a una dificultad de estabilidad de la proteína, que no cristalice en condiciones controladas, cristales de muy baja calidad, la no producción suficiente de la proteína en sistemas recombinantes o en su caso el no interés por algún grupo de investigación especializado en esta área, pero existe también se puede optar por modelar a partir de la secuencia proteica si esta esta reportada, para el receptor de histamina tipo 2 es el caso, existen dos opciones principales de modelado, uno utilizando redes neuronales para predecir un modelo tridimensional, con la desventaja que es por parte de una inteligencia artificial (IA) y no de un modelo biológico existente[72].

La otra opción es el modelado por homología, de esta forma al analizar la secuencia del H2R con un buscador de homología obtuvimos su código pdb 7BTS que corresponde a la estructura del receptor adrenérgico β_1 (ADRB1) acoplado con epinefrina (figura 6) [61]. Podemos observar una gran similitud al H1R, una región de hélices α compactadas como poro y una segunda región con hélices α anexa en una segunda región, lo que indica que puede ser una buena plantilla de trabajo.

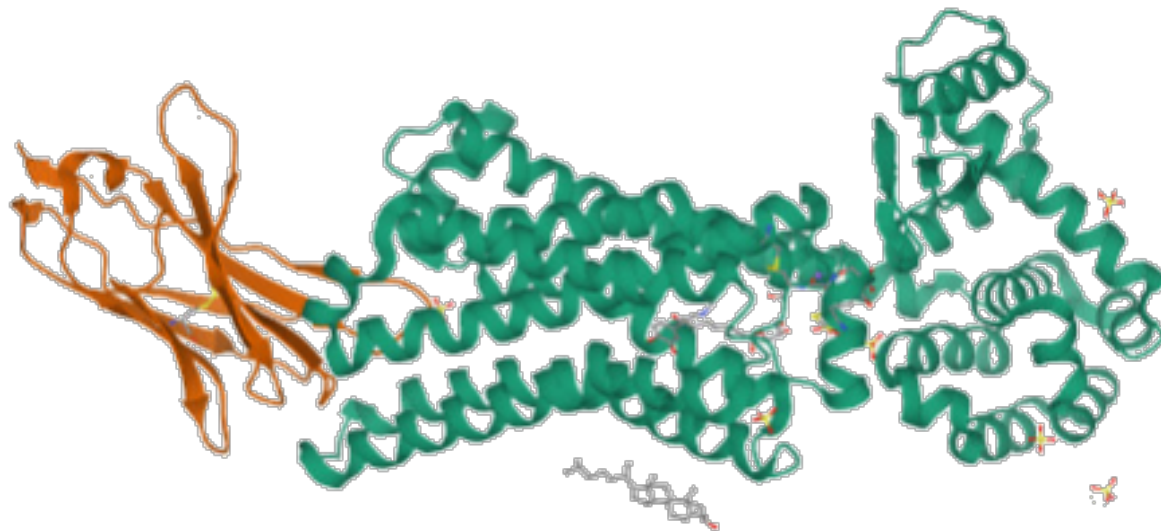


Figura 6. Modelo 3D de 7BTS obtenido del Protein Data Bank (PDB).

Con la elección adecuada de la plantilla de modelado por homología, realizando el alineamiento entre las dos proteínas encontramos una identidad superior al 30%, considerado idónea para el uso de estas herramientas (figura 7), particularmente en la región primera con una zona de 47 % de identidad, aunque se puede observar que si no son los mismo aminoácidos en el resto, son del mismo tipo, por ejemplo en lugar de una leucina se encuentra la isoleucina o la valina, en un 30 % más de los casos. Podemos observar en la figura 7 que de la región 202-206 (señalada en rojo) hay un salto de aminoácidos de acuerdo a la categoría de cargas polares o hidrofóbicas, en la region 240-257 (señalada en azul) es donde más variabilidad encontramos con los aminoácidos porque la mayoría en esa región son aminoácidos con anillos aromáticos, y se dan cambios (sustituyen) entre aquellos hidrofóbicos y aquellos aminoácidos sin carga. De la región 315 -342 hay una notable diferencia entre aminoácidos (señalada en verde), sin embargo, estos no afectan el modelado pues se encuentran al final de la cadena de la proteína lo cual no impide alguna parte de la estructura y su conformación en los posibles sitios de union de nuestra molécula de interés.

Con esta alta homología encontrada se procedió a obtener el modelo como se observa en la figura 7, a la izquierda (A) tenemos la plantilla donde se observan claramente las dos regiones, primero la correspondiente al sitio citoplasmático en colores desde naranja hasta amarillo, y en segunda parte la región verde a azul correspondiente a la región homóloga del sitio activo del receptor de histamina, a la derecha (B) encontramos el modelo obtenido, en dos tonos de azul, siendo el azul marino la regiones de alta identidad y las azul claro de baja identidad las cuales están en mayor proporción, en rojo se encuentran las asas o loops que estas se podrían interpretar de baja confiabilidad pero la realidad es que se debe al libre giro de las mismas, por lo que es necesario estabilizar la proteína, es decir adicionar estados de protonación, tautomerías, puentes disulfuro, liberar de giro y finalmente minimizar como fue en el caso de HR1.

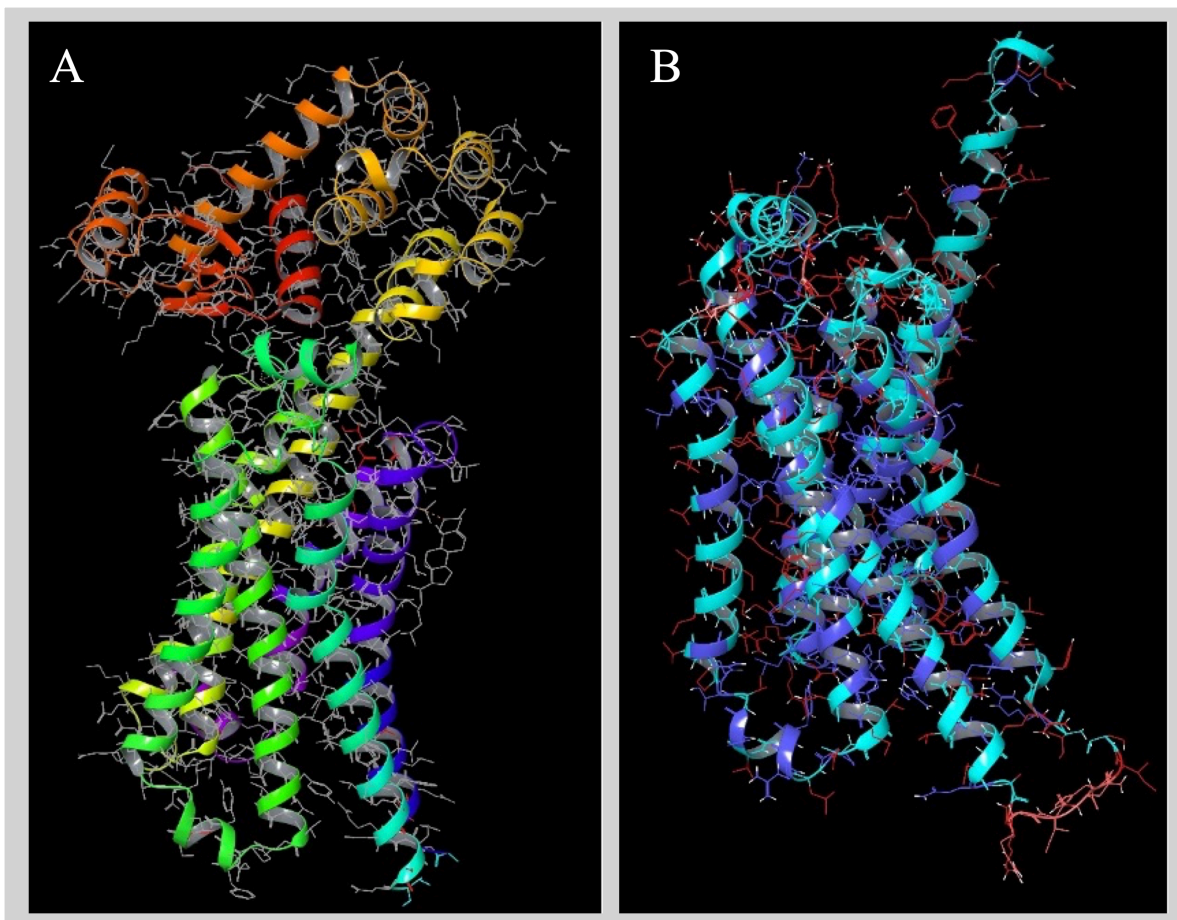


Figura 7.1. Comparación de modelos A) plantilla 7BTS y B) modelo de H2R obtenido por homología.

Una vez añadido los estados de protonación se puede observar en la figura 7.2 en la imagen de la izquierda (A) que las regiones en rojo disminuyeron y aunque la proteína predomina los colores azul marino y azul claro, en primera instancia se puede esperar un acoplamiento débil del ligando o en el peor de los casos nulo puesto que en el sitio activo teórico las hélices están en colores azules claro que indican baja identidad de la estructura. En la figura 7.2, la imagen de la derecha (B) podemos observar la molécula con las interacciones intermoleculares necesarias (como puentes de hidrogeno entre otras) y enlaces disulfuros.

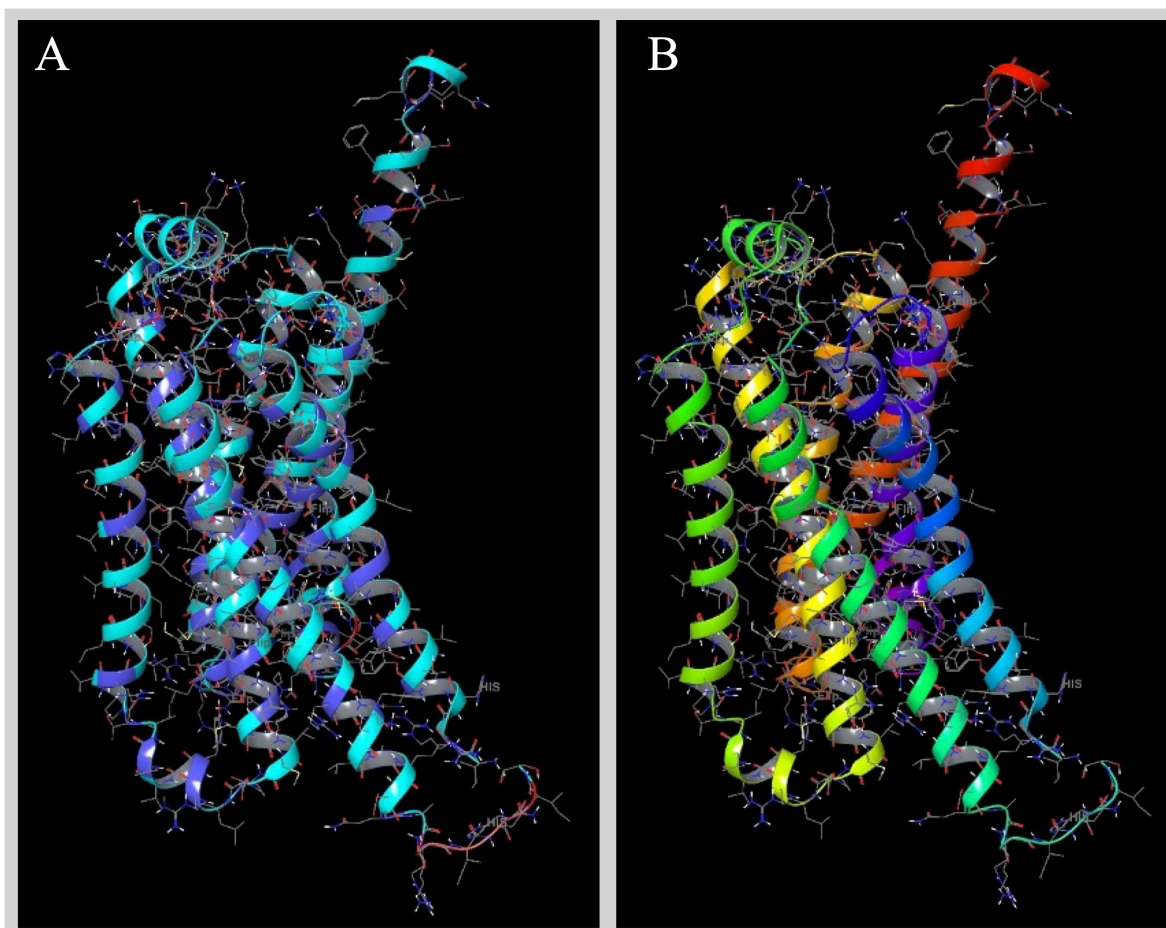


Figura 7.2. A) modelo en 3D preprocesado con estados de protonación, B) modelo con enlaces optimizados y puentes de hidrogeno formados.

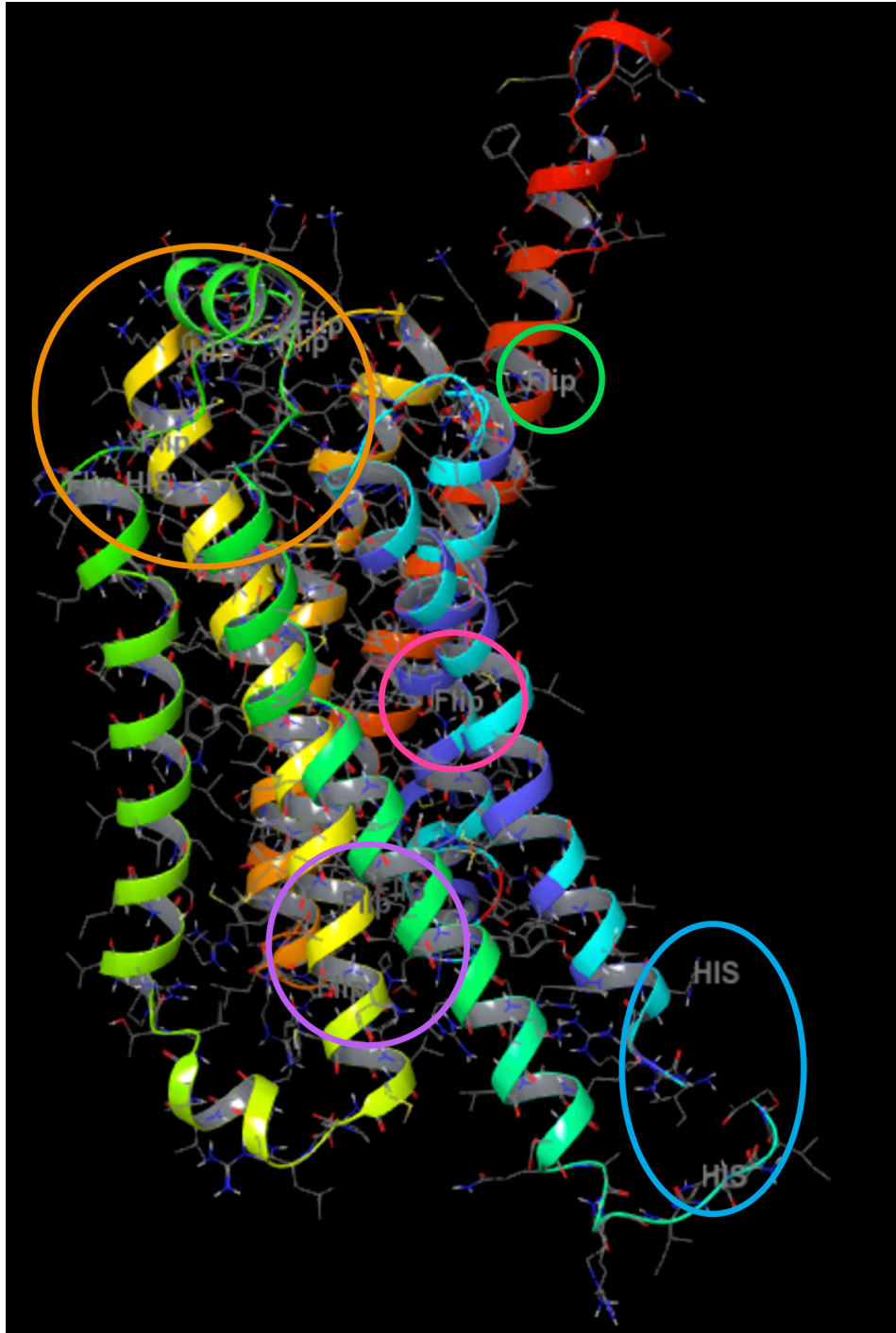


Figura 7.3 Modelo minimizado del receptor de H2R

Con los modelos optimizados y con la formación de puentes de hidrogeno, es necesario establecer si el modelo es óptimo y particularmente, en este caso para el H2R se obtuvo una energía de -851.98 kcal/mol, lo que indica una alta estabilidad del sistema, lo cual lo vuelve idóneo para el uso de este en estudios teóricos. Tras la obtención del modelo minimizado de H2R (figura 7.3), podemos observar que el contenido dentro del óvalo azul hay unidades de histidina, pero estas no generan movimiento. En las regiones encerradas con óvalos verde y rosa podemos encontrar sitios que permiten giros, al tener movimiento permite que esta se pueda mover, sin embargo, estas partes se ven limitadas por la región superficial. En la parte superior de la región de alfa hélices, encontramos una región naranja que tiene dos histidinas en su forma neutra y cuenta con varios giros en ese sitio, mientras que, en la región inferior, en la región morada igual se encuentran giros, pero no hay histidinas, para el resto los movimientos o presencias de histidinas son mínimas, lo cual nos hace suponer que el ligando se acopla a la zona con óvalos naranjas o morados, garantizando este sitio como el de acceso del ligando endógeno.

Tras estudiar todo el modelo y todas las fases de preparación, esta proteína no resulta tan viable para el acoplamiento y soporte en una matriz, debido a que las zonas de giro están en el centro del poro de alfas hélices lo que podría causar un mal anclaje a la matriz que se trate de usar, mientras que el resto de la proteína si es suficientemente estática para un soporte adecuado en una matriz de grafeno o de nanotubos si fuera el caso de estudio, de igual forma que con el H1R y su posible acoplamiento a la matriz se deberá garantizar que el sitio de unión, el cual se precice esta dentro de los círculos señalados en morado y rosa de la figura 7.3, así que dicha inmovilización teórica debería ser en paralelo a esta región o perpendicular en la parte superior, porque deberá estar disponible para la entrada de la histamina y para la detección de los niveles de la misma.

5.1.3 Receptor de Histamina tipo 3 (H3R)

La liberación de neurotransmisores está modulada por receptores presinápticos de histamina tipo 3, ubicados en las neuronas histaminérgicas, noradrenérgicas y otras neuronas no hehistamérgicas del sistema nervioso central y periférico. Este receptor se ha usado para explorar más a fondo su función farmacológica, a través de fármacos neuropsiquiátricos

clínicamente relevantes para detectar la actividad del receptor, Wellendorph et al. identificaron un pequeño número de antipsicóticos que poseen una actividad antagonista significativa [73,74]. Sin embargo, a pesar de su potencial uso no se tiene una estructura cristalizada en bases de datos, afortunadamente contamos con el código PDB de la secuencia protéica.

Para el receptor de Histamina tipo 3, no se cuenta con el cristal, probablemente por las mismas razones que para el tipo 2 (dificultad de estabilidad de la proteína, cristales de muy baja calidad, la no producción suficiente de la proteína en sistemas recombinantes etc.). De las dos opciones de modelado, se optó por el modelado por homología. Al analizar la secuencia del H2R con un buscador de homología obtuvimos como resultado la proteína con código pdb 4U15 que corresponde a la estructura del receptor muscarínico de acetilcolina M3 (ver figura 8), donde podemos observar una gran similitud al HR1, una región de hélices α compactadas como poro y una segunda región con hélices α anexa en una segunda región, lo que indica que puede ser una buena plantilla de trabajo.

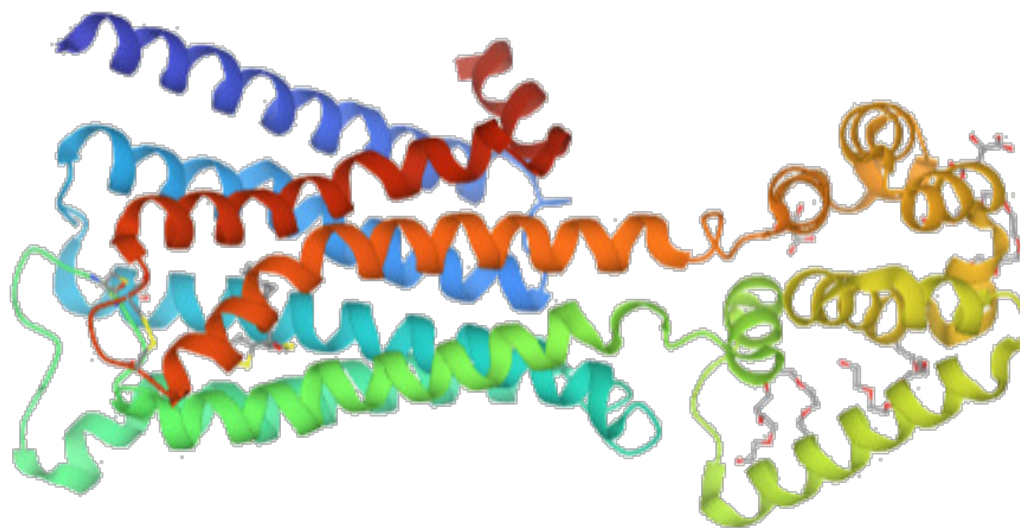


Figura 8. Modelo 3D de 4U15 obtenido del Protein Data Bank [62].

Para comparar y seleccionar analizamos si esta plantilla era ideal, buscamos que el alineamiento entre las dos proteínas encontramos tuvieran una identidad superior al 30% (ver figura 9) particularmente en la región primera con una zona de 47% identidad. Lo cual indica

un alto porcentaje de identidad que nos permite usarla como plantilla base para realizar el modelado por homología.

Podemos observar la presencia de espacios entre los alineamientos que va de entre 1-3 aminoácidos por espacio, cabe destacar que si bien que la plantilla carece de identificación en la región de 161 a 168, dado la secuencia de referencia de HR3 se logra modelar por la estabilidad de los aminoácidos en esta región, también hay un cambio en la secuencia de aminoácidos que indican una preferencia de color en el modelo final una molécula de ácido glutámico en lugar del triptófano que coincide para la plantilla y el H3R, el resto tuvieron por caso contrario cambios de aminoácidos mayoritariamente hidrofóbicos y de cadena corta por aminoácidos aromáticos como Fenilalanina (F), Tirosina(Y), Triptófano(W).

De la región 177-198 que está señalada en azul, encontramos cambios para los 3 alineamientos pues predomina la presencia de aminoácidos polares sin carga e hidrofóbicos (excepto 184 y 191 donde conservan la plantilla y el modelo el mismo aminoácido) la mayoría son de cadena corta y se puede notar la constante presencia de fenilalaninas (F). De la región 211-234 (señalada en rosa) hay una notable diferencia entre aminoácidos, se puede observar la correspondiente a la secuencia del modelado que cambió la mayoría de los aminoácidos (de la plantilla y el H3R) por Prolinas, siendo estas de diferentes categorías (aromáticos, polares, hidrofóbicos etc.) a las que tenían las otras secuencias alineadas. Por último de la región 396 en adelante no hay secuencia para el modelo obtenido, sin embargo estos no afectan el modelado pues se encuentran al final de la cadena de la proteína lo cual no impide alguna parte de la estructura y su conformación en los posibles sitios de unión de nuestra molécula de interés.

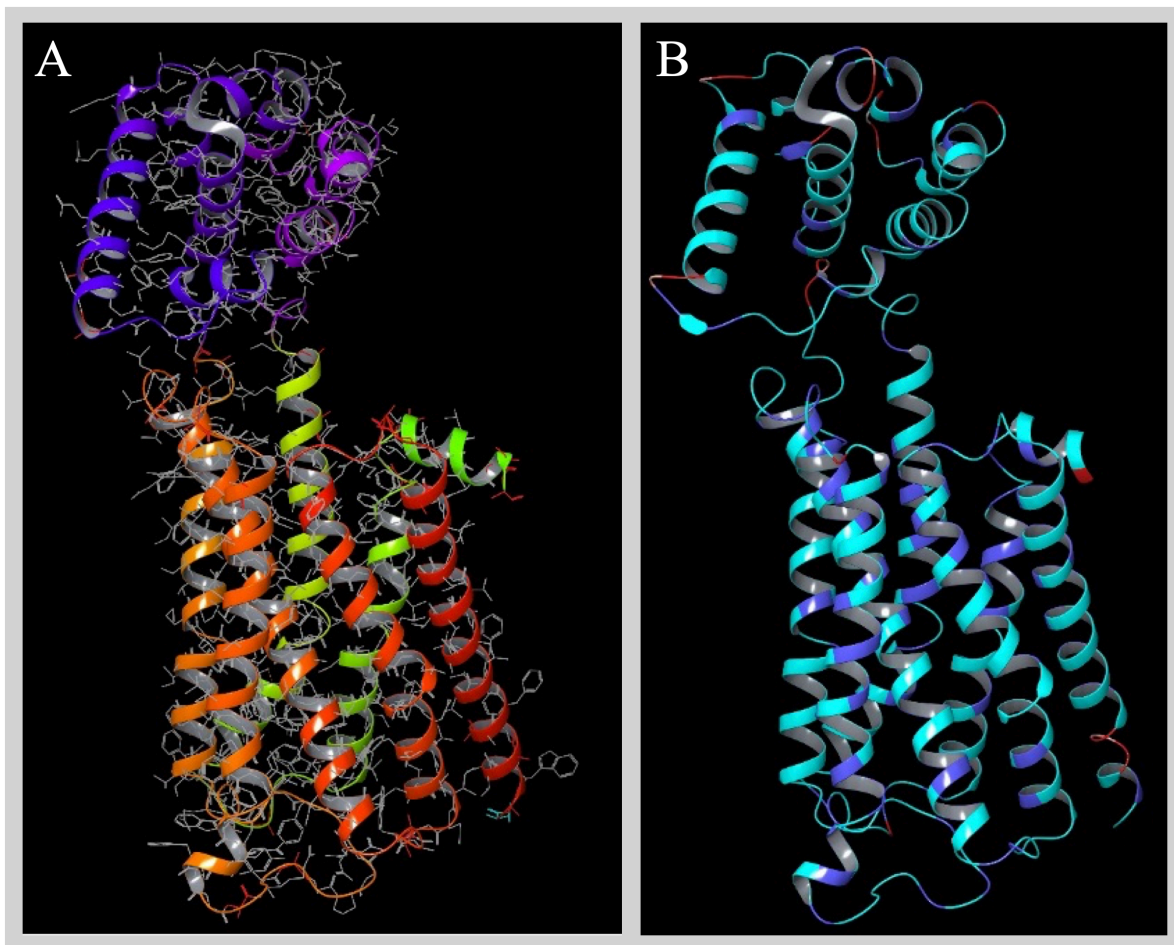


Figura 9.1. Comparación de modelos A) plantilla 4U15 y B) modelo de H3R obtenido por homología.

Se procedió a obtener el modelo observado en la figura 9.1, a la izquierda (A) tenemos la plantilla donde se observan claramente las dos regiones, primero la correspondiente al sitio citoplasmático en colores desde naranja hasta amarillo, y en la segunda parte la región verde a azul correspondiente a la región homologa del sitio activo del receptor de histamina, a la derecha (B) encontramos el modelo obtenido, en dos tonos de azul, siendo el azul marino la regiones de alta identidad y las azul claro de baja identidad, observando una alta confiabilidad del modelo, en rojo se encuentras las asas o loops que se podrían interpretar de baja confiabilidad pero la realidad es que se debe al libre giro de las mismas, por lo que es necesario estabilizar la proteína, es decir adicionar estados de protonación, tautomerías, puentes disulfuro, libertar de giro y finalmente minimizar como fue en el caso de H1R y H2R.

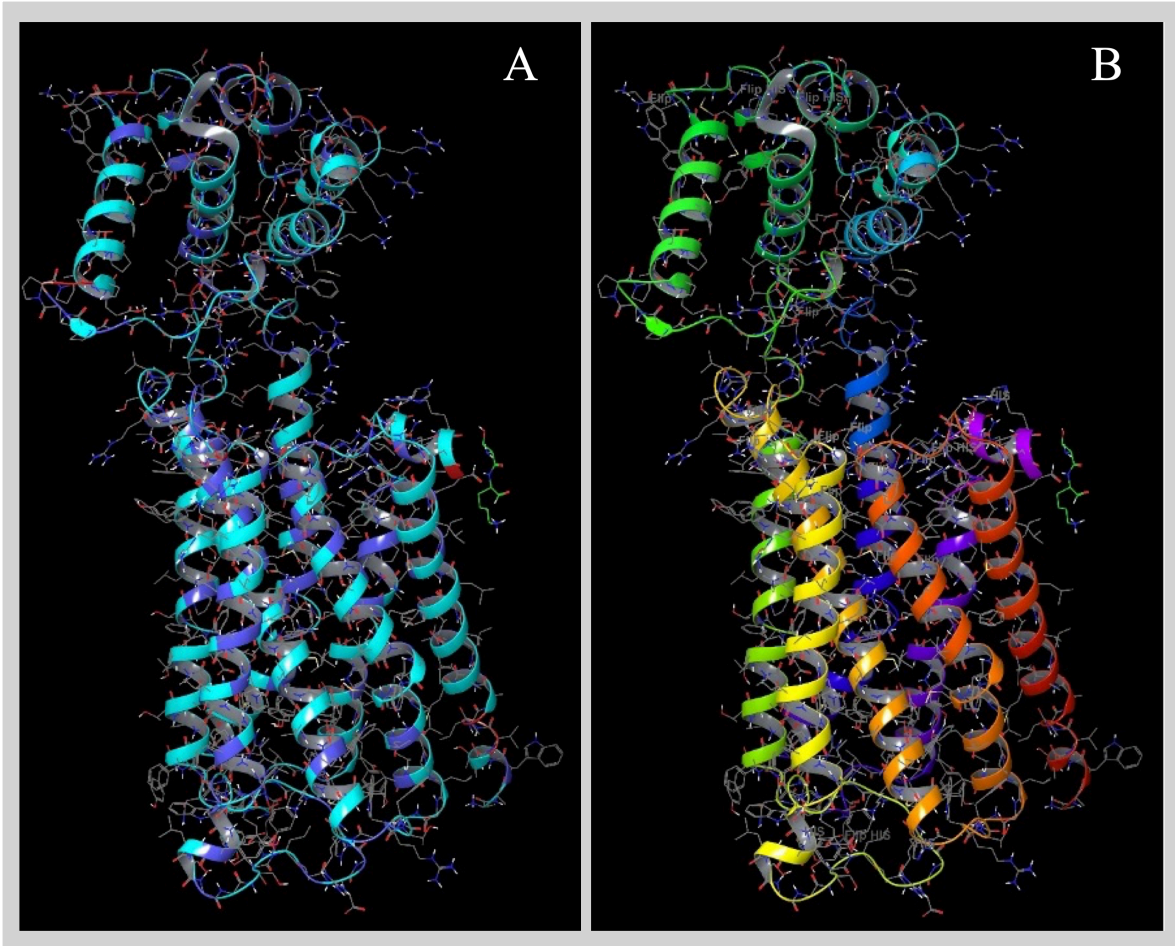


Figura 9.2. A) modelo en 3D preprocesado con estados de protonación, B) modelo con enlaces optimizados y puentes de hidrogeno formados.

Tras la adición de los estados de protonación que se observa en la figura 9.2 en la parte A, se puede observar un resultado favorable del modelado por homología pues los colores azules (marino y claro) predominan en la estructura modelada y a pesar de la presencia de colores rojos que son indicativos de una baja identidad éstas no interfieren en el sitio activo que hemos venido prediciendo con base en el sitio de unión del H1R, posteriormente al llevar a cabo la optimización del modelo a través de las interacciones moleculares observadas en la parte B de la figura; obtuvimos una estructura más fácil de estudiar, en ella vemos la presencia de Histidinas las cuales permiten el libre giro.



Figura 9.3. Modelo minimizado de H3R.

Con los modelos optimizados (figura 9.3) y con la formación de puentes de hidrogeno, es necesario establecer si el modelo es óptimo y particularmente, permitir el libre giro de sistemas como histidina, cisteínas y tirosinas, por lo que al minimizar el sistema completo se obtuvo una energía de -987.93 kcal/mol, lo que indica una alta estabilidad del sistema, lo cual lo vuelve idóneo para el uso de este en estudios teóricos. La region contenida en el óvalo naranja contiene 2 histidinas en estado naturales presentan libre giro y da paso a la entrada de moléculas de control, como el ligando endógeno. Dentro del óvalo rosa podemos observar un *Flip* (giros libres) entre las dos regiones de la proteína, lo que indica el movimiento libre de la parte correspondiente a la citoplasmática. La region contenida en el óvalo morado es la region que tiene mas giros libres comparando con el H1R y H2R en ese sitio en especifico además de la presencia de 2 histidinas. La región que contiene el óvalo azul en la parte de debajo de igual forma cuenta con un giro libre y la presencia de 3 histidinas. Podriamos considerarlo un buen modelo para el diseño del biosensor pero en especifico, al tener varios giros esto podria traer una dificultad para el acoplamiento a la matriz que se pretende usar por lo que lo anterior indica que no podremos tener resultados favorables respecto al papel del H3R posterior a su union a un soporte.

5.1.4 Receptor de Histamina tipo 4 (H4R)

De acuerdo a los trabajos de Tiligada et al. y Deiteren et al., el receptor H4 por la histamina es mucho mayor que la del receptor H1, H2 y su papel en la anafilaxia que radica en la intensificación de la quimiotaxis de eosinófilos y mastocitos y la expresión de moléculas de adhesión, la movilización y diferenciación de monocitos, linfocitos Th1/Th2 y la estimulación de la producción de citocinas y quimiocinas por células dendríticas y linfocitos T, además de ser una posible diana terapéutica en el tratamiento de trastornos gastrointestinales [52,53]. Sin embargo, a pesar de su potencial uso como diana terapéutica, no se cuenta con la estructura de dicho receptor cristalizado, por lo que se realizó de igual forma un modelado por homología. Al analizar la secuencia del H4R con un buscador de homología obtuvimos como resultado la proteína con código pdb 4U15, la cual es igual a la usada para el modelado del receptor H3 (ver figura 8), esto se debe probablemente a que cuentan con regiones conservadas en región de hélices α compactadas como poro. En ella

podemos observar, en la segunda región con hélices α anexa hay cambios, pero estos son mínimos, lo que indica que esta de igual forma puede ser una buena plantilla de trabajo.

Comparamos si la plantilla anteriormente seleccionada era ideal, así que buscamos que el alineamiento entre las dos proteínas encontramos tuvieran una identidad superior al 30% (ver figura 10), particularmente en la región primera con una zona de 51% de identidad. Lo cual indica un alto porcentaje de identidad que nos permite usarla como plantilla base para realizar el modelado por homología. En el alineamiento de homología entre H4R, el receptor muscarínico de acetilcolina M3 y y el modelo obtenido, podemos observar la presencia de espacios entre los alineamientos que va llegando a tener hasta 23 espacios (de la 310-332) de aminoácidos por espacio.

En la región 161-168 (señalada en rojo) hay un cambio en la secuencia de aminoácidos que indican una preferencia de color en el modelo final una molécula de ácido glutámico en lugar de el triptófano que coincide para la plantilla y el H3R, el resto tuvieron por caso contrario cambios de aminoácidos mayoritariamente hidrofóbicos y de cadena corta por aminoácidos aromáticos como Fenilalanina (F), Tirosina(Y), Triptófano (W). De la región 177 -198 que está señalada en azul, encontramos cambios para los 3 alineamientos pues predomina la presencia de aminoácidos polares sin carga e hidrofóbicos (excepto 184 y 191 donde conservan la plantilla y el modelo el mismo aminoácido) la mayoría son de cadena corta y se puede notar la constante presencia de fenilalaninas (F). De la región 211-234 (señalada en rosa) hay una notable diferencia entre aminoácidos, se puede observar la correspondiente a la secuencia del modelado que cambió la mayoría de los aminoácidos (de la plantilla y el H3R) por Prolinas, siendo estas de diferentes categorías (aromáticos, polares, hidrofóbicos etc.) a las que tenían las otras secuencias alineadas.

Por último de la región 396 en adelante no hay secuencia para el modelo obtenido, sin embargo estos no afectan el modelado pues se encuentran al final de la cadena de la proteína lo cual no impide alguna parte de la estructura y su conformación en los posibles sitios de unión de nuestra molécula de interés.



Figura 10. Proceso de alineamiento con el RHR con la proteína 4U15 del receptor muscarínico de acetilcolina M3

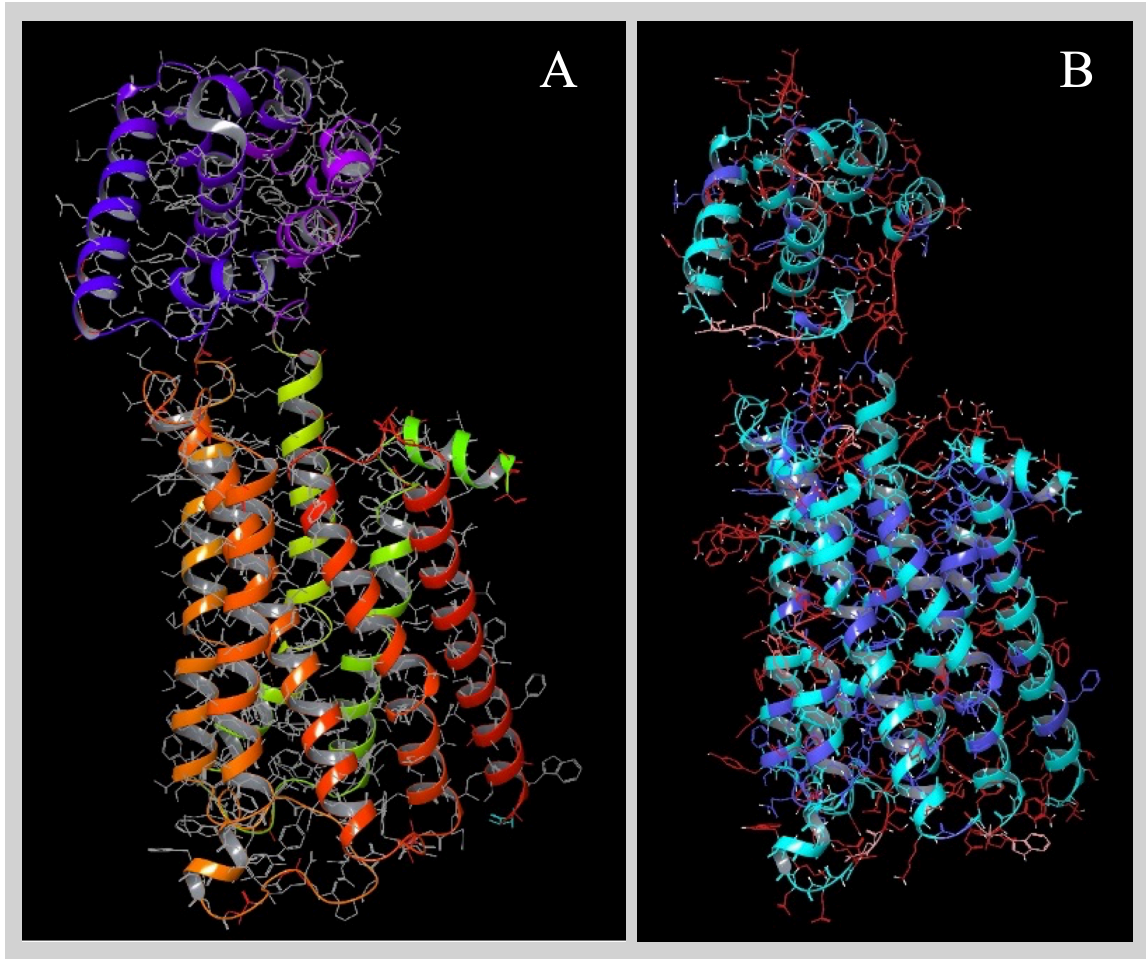


Figura 10.1 Comparación de modelos (A) izquierda plantilla 4U15 y (B) derecha modelo de H4R obtenido por homología.

Se realiza el modelado 3D del receptor muscarínico de acetilcolina M3 y se observa las características estructurales de la proteína, esto nos permite a primera instancia observar la similitud entre las estructuras de los anteriores receptores modelados y el que ya está cristalizado. En la figura 10.1 podemos observar la comparación entre el modelo obtenido de la plantilla 4U15 y el modelo obtenido para el H4R. Se puede observar un resultado favorable del modelado por homología pues los colores azules (marino y claro) predominan en la estructura modelada y posteriormente al llevar a cabo la optimización del modelo a través de las interacciones moleculares observadas en la parte A para el preprocesado con estados de protonación y B para la adición de enlaces optimizados y puentes de hidrógeno formados (ver figura 10.2) obtuvimos una estructura más fácil de estudiar, en ella vemos la presencia de Histidinas las cuales permiten el libre giro.

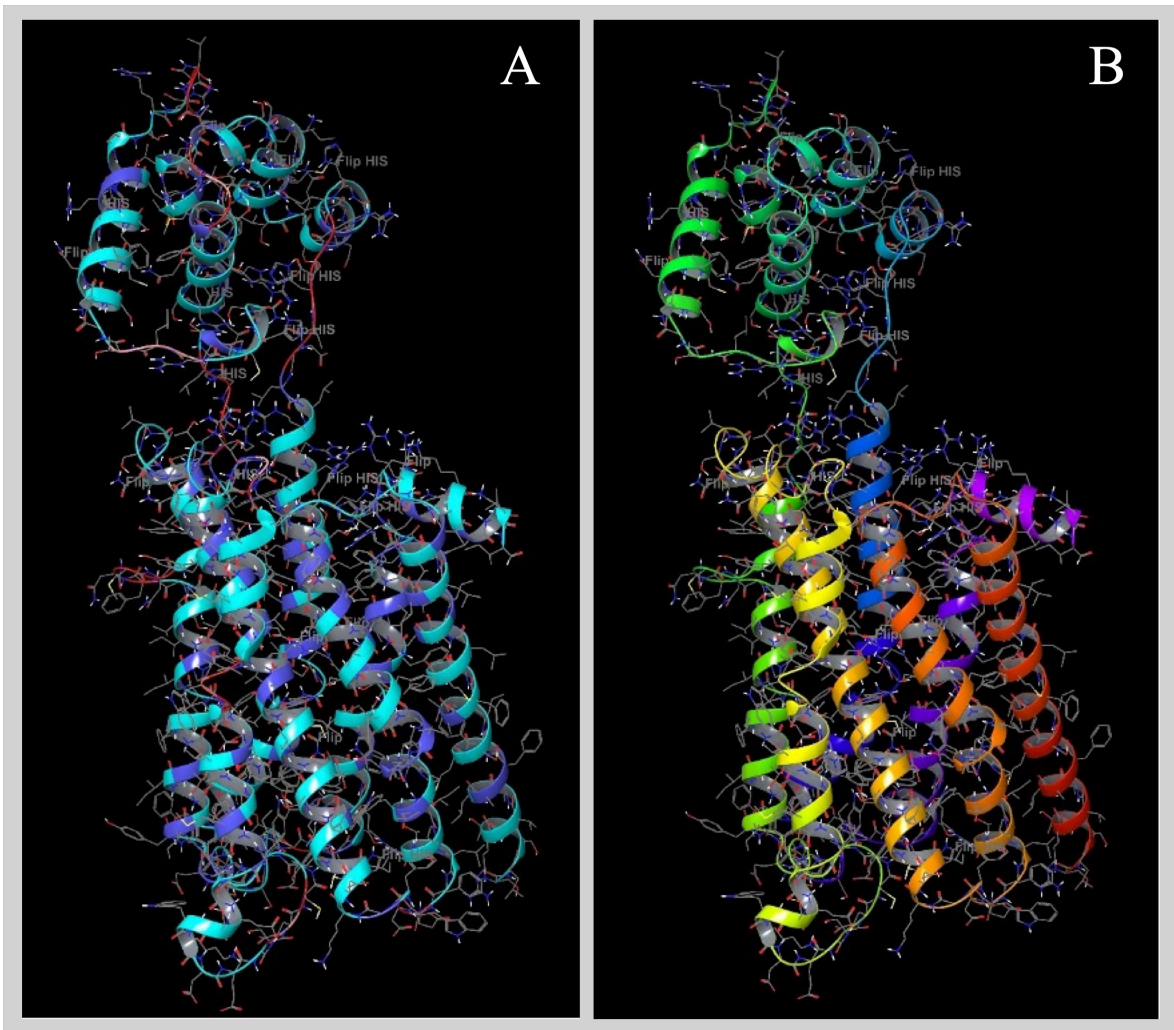


Figura 10.2 A) modelo en 3D preprocesado con estados de protonación, B) modelo con enlaces optimizados y puentes de hidrogeno formados.

En la figura 10.2 podemos observar el modelo con estados de protonación en el que se muestran la estructura y su identidad, en tonos de azul marino, claro y rojo siendo el azul marino la regiones de alta identidad y las azul claro de baja identidad las cuales están en mayor proporción, en rojo se encuentran las asas o loops que estas se podrían interpretar de baja confiabilidad pero la realidad es que se debe al libre giro de las mismas. Se espera que la unión del ligando a dicho receptor se lleve a cabo de manera correcta, esto se comprobará más adelante con los estudios de simulaciones de interacción.

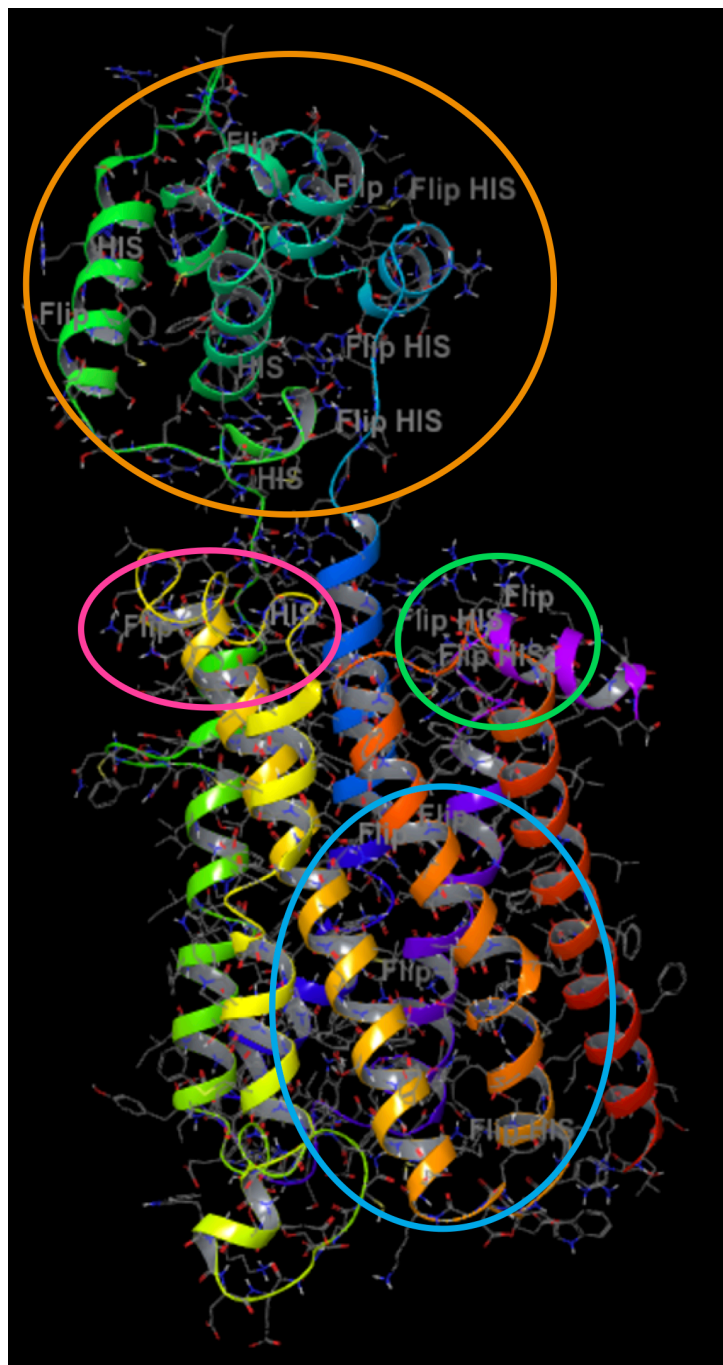


Figura 10.3 Modelo minimizado del H4R

Al minimizar el sistema completo se obtuvo una energía -1089.32 kcal/mol, lo que indica la mayor estabilidad del sistema, lo cual lo vuelve el candidato más idóneo para el uso de este

en estudio teórico. La region contenida en el óvalo naranja contiene histidinas en estado naturales presentando libre giro que probablemente den paso a diferentes ligandos ligando endógenos pero principalmente el la Histamina que es la que nos interesa. Dentro del óvalo rosa podemos observar una histidina en su forma natural y el giro libre entre las dos regiones de la proteina, lo que indica el movimiento libre de la parte correspondiente a la citoplasmática. En la region correspondiente a la zona inferior con alfas hélices que forman un poro y que esta encerrada en óvalo verde podemos observar la presencia de 2 histidinas en forma natural y giros libres. La region contenida en el óvalo azul cuenta con varios giros libres y una sola Histidina los cuales se encuentran en el poro de la estructura de las alfa hélices porque da paso a la entrada de moléculas de control como ligandos que interaccionan con esa parte de la región. Podríamos considerarlo un buen modelo para el diseño del biosensor siempre y cuando se considere que al tener varios giros esto podría traer una dificultad para el acoplamiento a la matriz, por lo que la zona mas óptima para su acoplamiento se encuentra en la zona de la región inferior izquierda de la estructura que tiene una alfa hélice en color verde que no contiene histidinas ni giros libres.

5.1.5 Receptor de PAF (PAFR)

La oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) fragmenta y deriva los residuos de ácidos grasos en la posición 2 de las fosfatidilcolinas que componen la cáscara de las LDL, un evento que permite que ciertos fosfolípidos oxidados interactúen y activen el PAFR [75]. Una clase de compuestos inflamatorios generados oxidativamente son los fosfolípidos que imitan estructuralmente el PAF, los lípidos similares al PAF. Por lo tanto el receptor de PAF se considera una importante diana farmacológica para tratar el asma, la inflamación y las enfermedades cardiovasculares. Cao et al. identificaron y cristalizaron dicho complejo de estructuras, apoyadas por el acoplamiento molecular de PAF, proporcionando, información sobre los mecanismos de reconocimiento de señales del PAFR, haciendo posible encontrar las estructuras cristalinas del PAFR humano a través de un complejo con el antagonista SR 27417 y el agonista inverso ABT-491[76]. La información anterior nos permitió realizar el modelado 3D sin tener que recurrir a un alineamiento por homología (ver figura 11). En términos generales PAFR esta compuesto por dos regiones al igual que los receptores de

histamina, una región de hélices α compactadas como poro y una segunda región con hélices α y láminas beta anexadas en dicha región.

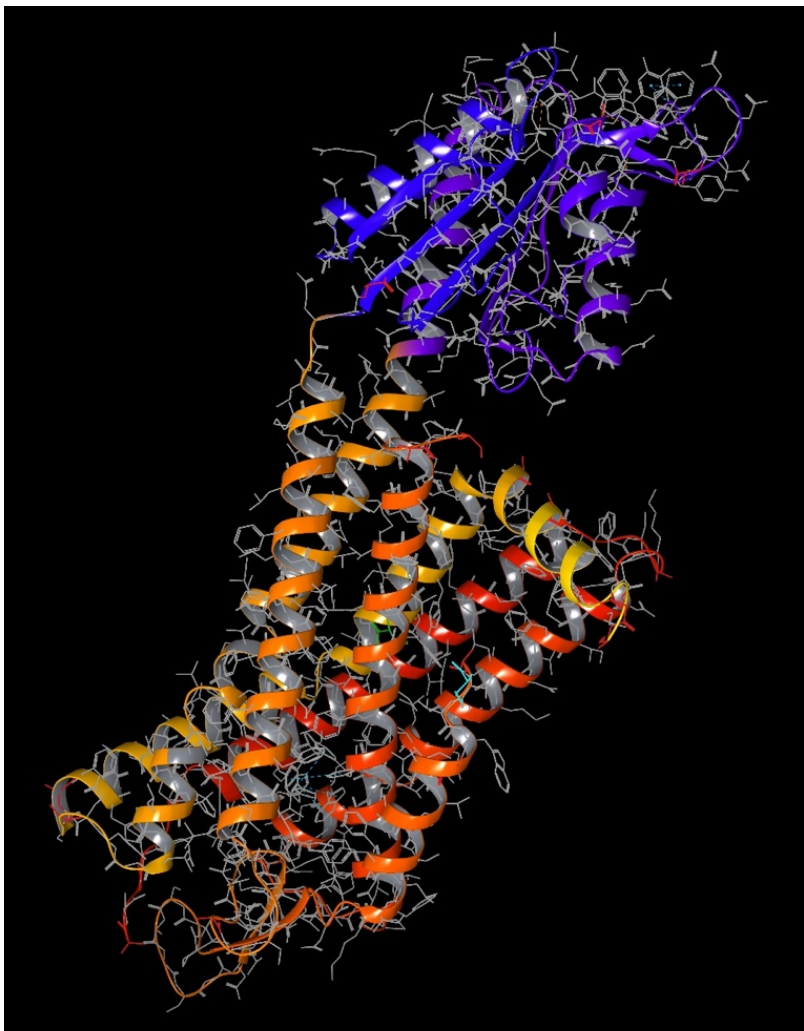


Figura 11. Modelo 3D del PAFR con código pdb 5ZKP.

Podemos observar el modelo 3D de PAFR con código pdb 5ZKP obtenido para este estudio (ver figura 11). El modelo tiene una estructura similar a los HxR de este estudio; tanto los HxR y PAFR se encuentran acoplados a la proteína G den la parte externa de la membrana de las células, eso explicaria por qué tienen una similitud estructural, ahora corresponde revisar si la interacción de los ligandos ocurre en sitios de acomplamiento similares tanto para histamina como para PAF. En la figura 11.1 podemos observar (A) el preprocesado con estados de protonación y (B) se obtuvo el modelo con enlaces optimizados y puentes de hidrogeno formados.

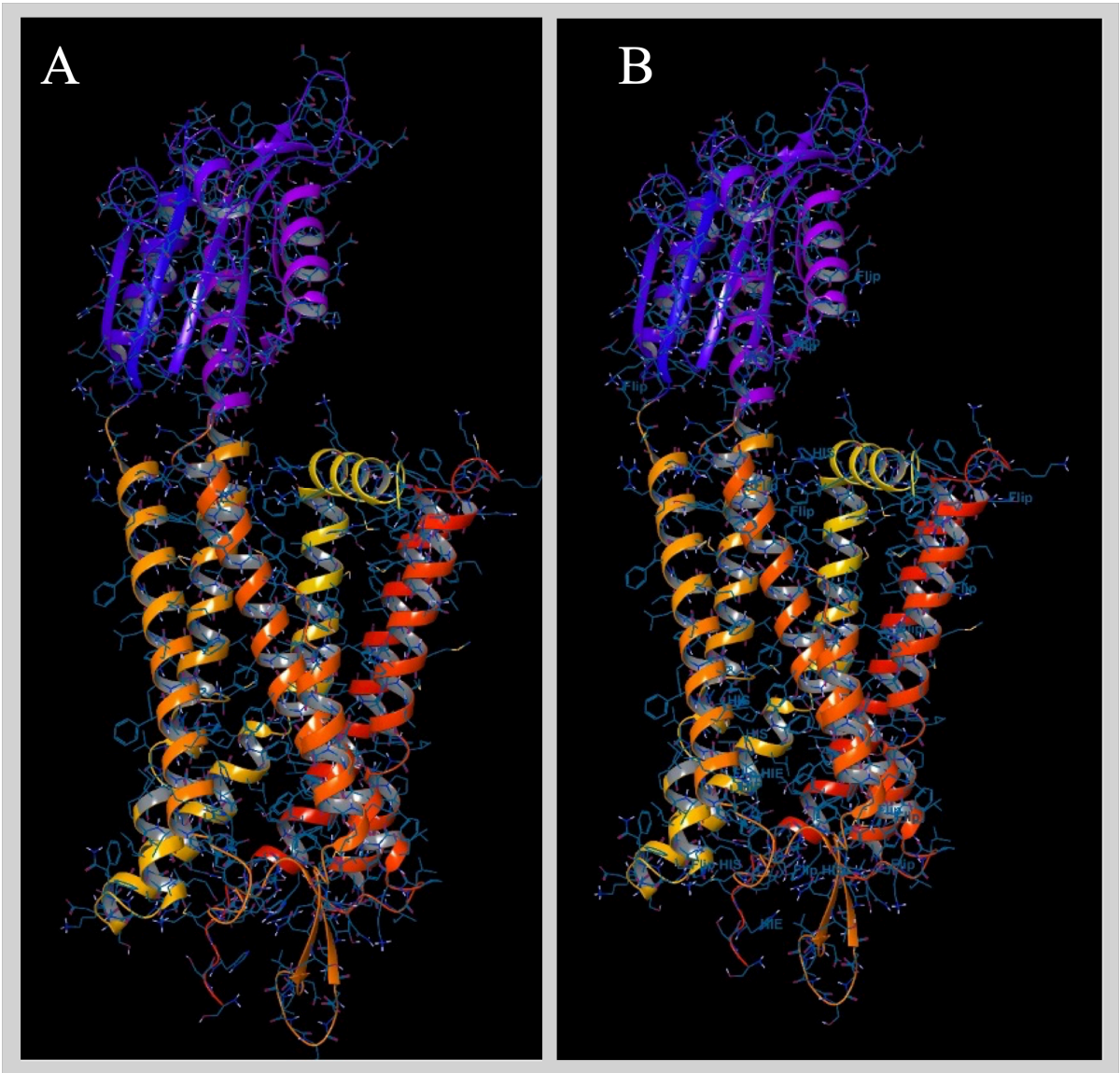


Figura 11.1. Modelo 3D de PAFR con código pdb 5ZKP , A) modelo en 3D preprocesado con estados de protonación, B) modelo con enlaces optimizados y puentes de hidrogeno formados.

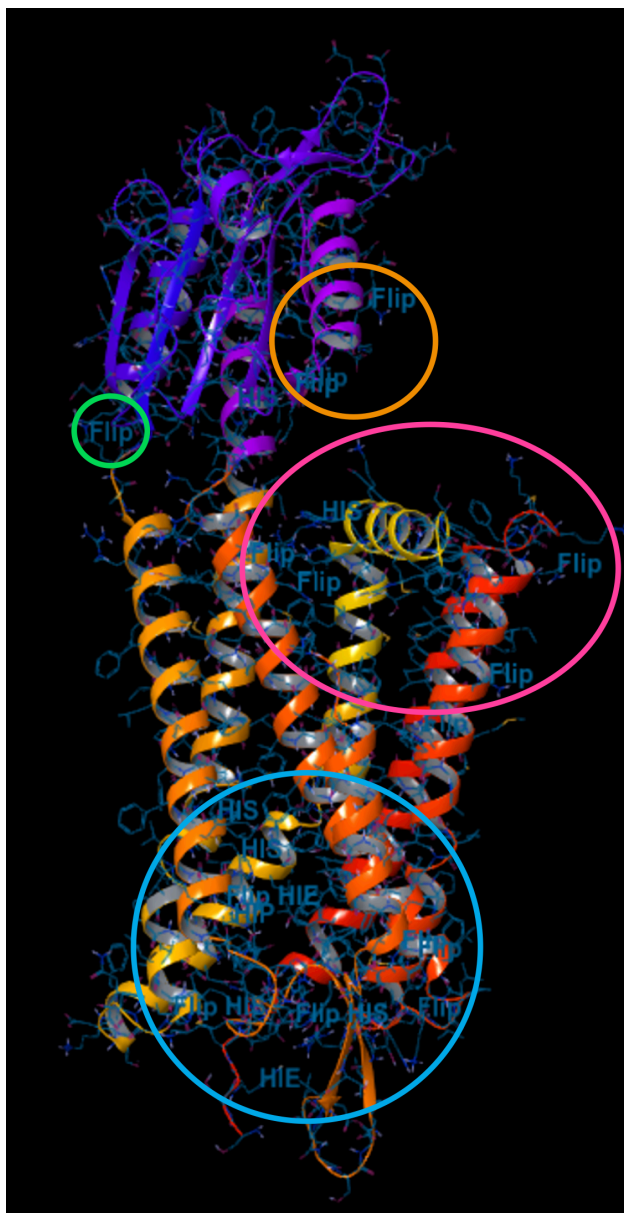


Figura 11.2. Modelo 3D minimizado del PAFR obtenido de un complejo con el antagonista SR 27417 y el agonista inverso ABT-491, con código pdb 5ZKP.

Al minimizar el sistema completo (ver figura 11.2) se obtuvo una energía -978.31 kcal/mol, lo que indica la mayor estabilidad del sistema, lo cual lo vuelve el candidato más idóneo para el uso de este en estudio teórico. Partiendo del análisis de la región encerrada en un círculo azul podemos observar la gran cantidad de Histidina presente en su forma ácida (HIE), básica (HIP) y normal (HIS), y giros libres que contiene la parte inferior de la región del receptor que va del naranja al amarillo, en la misma región pero un poco más hacia arriba podemos

encontrar encerrada en un óvalo rosa otra Histidina en forma normal y la presencia de varios giros libres.

Todo lo anterior indica que en esa región no es apta para realizar el acomplamiento al grafeno en algunas de esas zonas pues al existir dichos movimientos, estos causarían un mal acomplamiento o desprendimiento del receptor después de el acomplamiento al momento de llevar a cabo el desarrollo experimental *in vitro*. En la región la región morada de PAFR se encuentran giros libres en la parte de la alfa hélices (encerrada en naranja) y en esa misma región del lado izquierdo a un lado en la parte inferior de láminas beta plegadas (encerrada en verde) observamos un giro libre lo que podría no permitir el acoplamiento a la matriz, pero debido a la presencia de dicha estructura de lámina beta le confiere rigidez en esta región, volviéndola estable y con baja movilidad lo que nos indica una estabilidad latente de esta proteína, pudiéndose colocar en última interacción para el contacto con la muestra biológica ya que al ser esta región fija no da lugar a degradación primaria, dado que estos enlaces peptídicos no están favorecidos para hidrólisis la firmeza suficiente para el anclaje. Con base en todos los modelos A continuación se muestra en la figura 12 una imagen de todos los modelos obtenidos y las energías de estabilidad correspondientes.

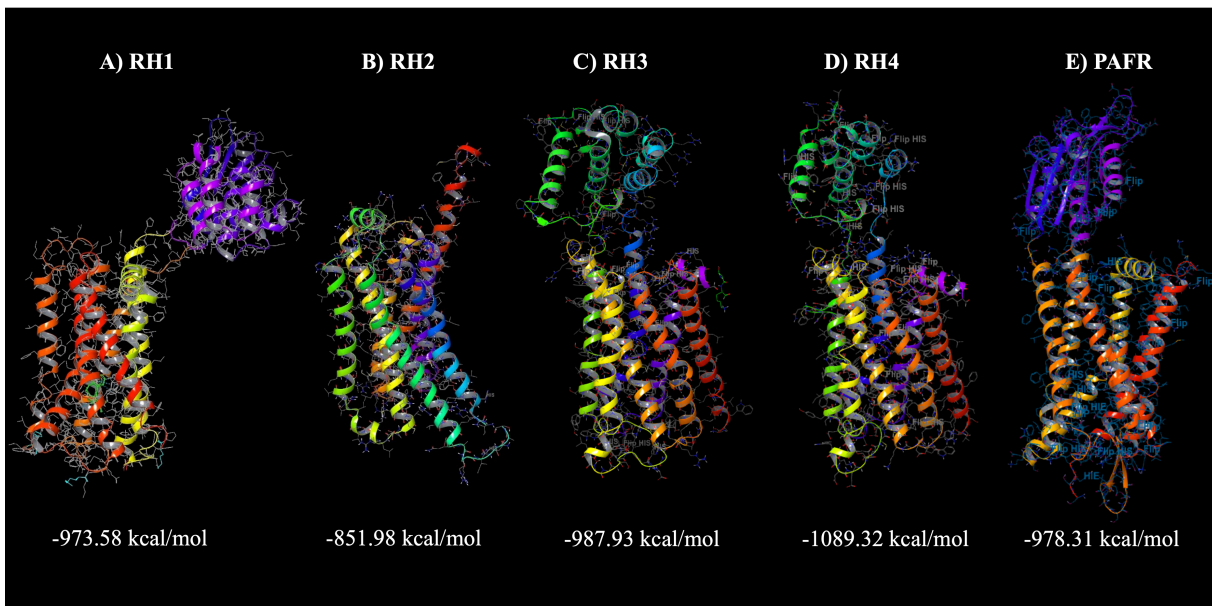


Figura 12. Modelos obtenidos por los cristales A)3ZRE de H1R y 5ZKP de PAF, así como los obtenidos por homología B)H2R, C)H3R y D)H4R

5.2 Análisis de interacción con ligandos endógenos.

Los receptores humanos de histamina H1R y H2R constituyen dianas farmacológicas importantes, mientras que los H3R y H4R se puede considerar un potencial pero carecen de muchos estudios en el área. En primera instancia para comprender el funcionamiento de cada hHxR (simología para designar los sub receptores de histamina) y poder extrapolar a una aplicación como lo son los biosensores, es necesario estudiar como se comporta cada receptor frente a la histamina (ligando endógeno del mismo). Los estudios con sistemas nativos y recombinantes respaldan el concepto de conformaciones de receptores específicas de ligando, que abarcan agonistas y antagonistas [44]. Para estudiar este comportamiento se puede realizar mediante técnicas de biología molecular, pero debido a su alto costo se vuelve improductivo, una alternativa son los estudios denominados bioinformáticos, Al realizar los estudios de interacción de los receptores con sus respectivos ligandos endógenos presentados en la tabla 1. que se muestra a continuación.

Tabla 1. Valores de energías del acoplamiento (EA) de la histamina con los diferentes receptores de histamina.

Interacción ligando- receptor	Histamina- H1R	Histamina- H2R	Histamina- H3R	Histamina- H4R
EA	-5.178	N/I	-6.253	-6.023

5.2.1 Interacción de Histamina con H1R.

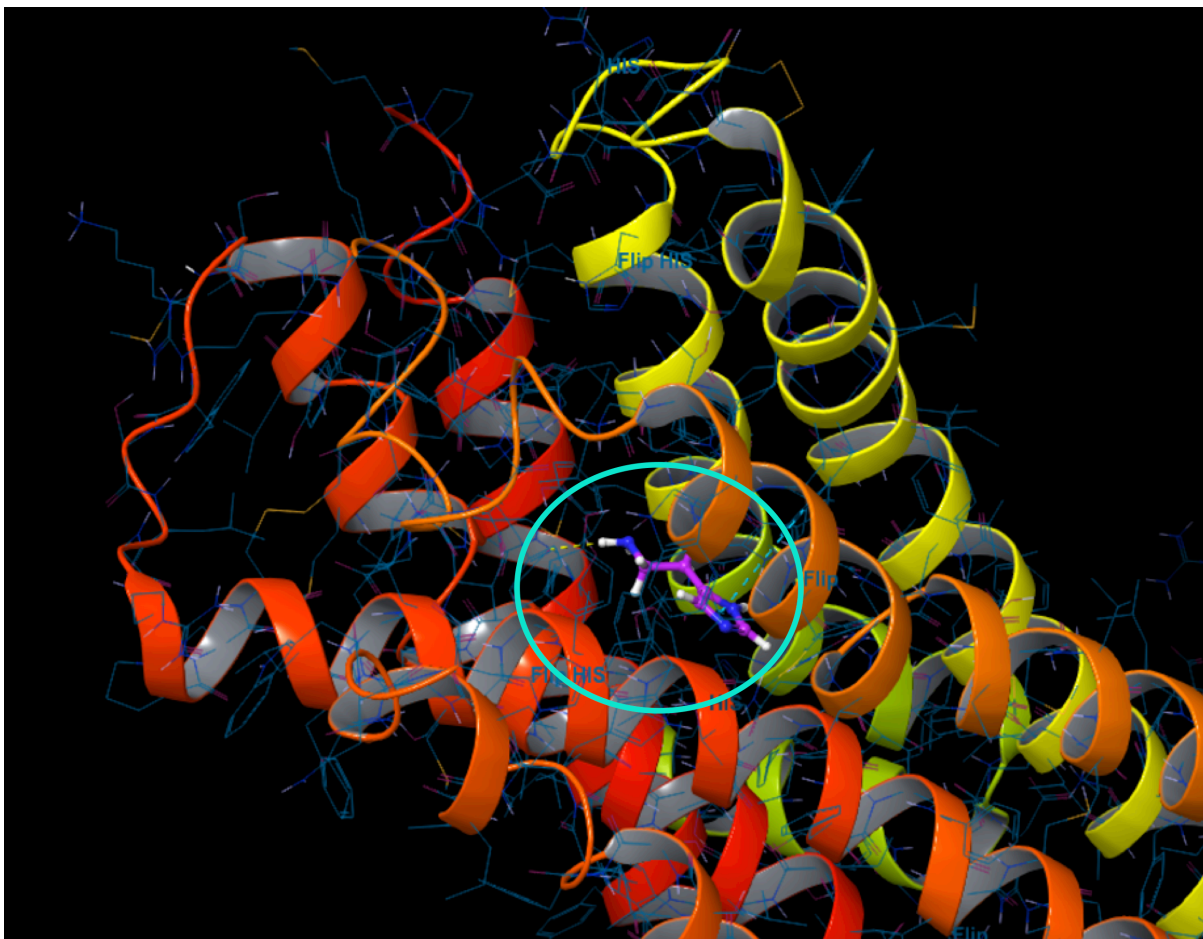


Figura 12. Modelo 3D de las interacciones de Histamina con H1R

En la figura 12 se puede observar la interacción de la Histamina en el interior de las alfa hélices que forman un poro que corresponde a la zona inferior del receptor H1R. Marcado en azul se muestra la histamina al interior del poro, y se pueden observar las interacciones con alguno de los aminoácidos de las alfa helices naranjas y amarillas. En la figura 12.1 mediante un docking molecular, podemos observar de mejor forma las interacciones en el acomplamiento ligando-receptor con cada uno de los aminácidos con los que interactúa. Se demuestra que el sitio de unión ocurrió en donde se había predicho en la sección del modelo del H1R (ver figura 4).

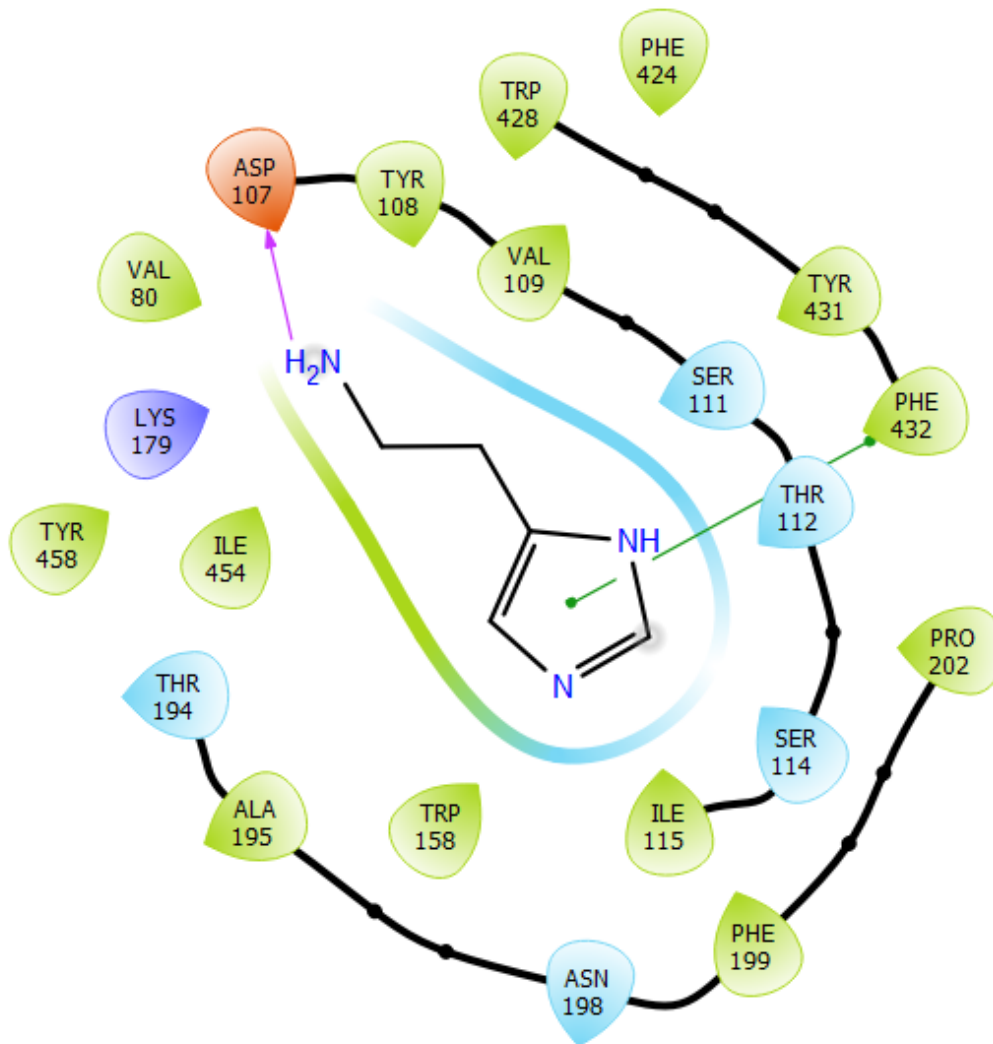


Figura 12.1 Interacción Histamina con aminoácidos del H1R.

La cadena terminal de la Histamina se une mediante un puente de Hidrógeno con el Ácido aspártico-107. Se puede observar una interacción π - π (línea verde) con el anillo de la Histamina y la Fenilalanina-432, dicho anillo posee un espacio para disolventes como agua (señalado en la figura con círculo gris). La Serina-111, Tirosina-112 y Serina-114 interaccionan mediante cargas polares con la parte del anillo y un lateral de la cadena de la histamina, mientras que Isoleucina-454 y Triptófano-158 interaccionan mediante cargas hidrofóbicas.

5.2.2 Interacción de Histamina con H2R.

Se realizó el docking molecular para la unión de histamina y el receptor de histamina tipo 2, pero no se logró obtener un resultado favorable, es decir, no hubo interacción ligando-receptor. Para entender qué es lo que impedía el acoplamiento se procedió a analizar y comparar el modelado tridimensional de H2R (ver figura 7.3) con los demás modelados por homología que obtuvimos.

El modelado de H2R no cuenta con las dos regiones que sí se pueden observar (para ejemplificar) en la figura 5 (región 1 en color morado y región 2 correspondiente a las hélices α compactadas como poro en colores rojas, naranjas y amarillas), al igual que lo que se puede observar en la figura 7.1 si comparamos las imágenes A y B y sus respectivas regiones.

Lo anterior indica que las capacidades de interacción del receptor modelado están relacionadas con alguno de los aminoácidos faltantes en el modelo de H2R, así que comparamos las 3 interacciones con los receptores H1R, H3R y H4R e identificamos aquellos aminoácidos que tenían un papel importante en la interacción del ligando-receptor que no se encuentran en H2R.

5.2.3 Interacción de Histamina con H3R.



Figura 13. Modelo 3D de las interacciones de Histamina con aminoácidos del H3R.

En la figura 13 se puede observar la interacción de la Histamina en el interior de las alfa hélices que forman un poro que corresponde a la zona inferior del receptor H3R. Los resultados indican una similitud de interacción en la zona de las estructuras de H1R y H3R.

secuencia del sitio activo, además al observar el sitio de interacción se puede denotar que no entra dentro de las regiones de libre movimiento marcadas anteriormente lo que garantiza un buen acoplamiento además de que este sea estable.

5.2.4 Interacción de Histamina con H4R.

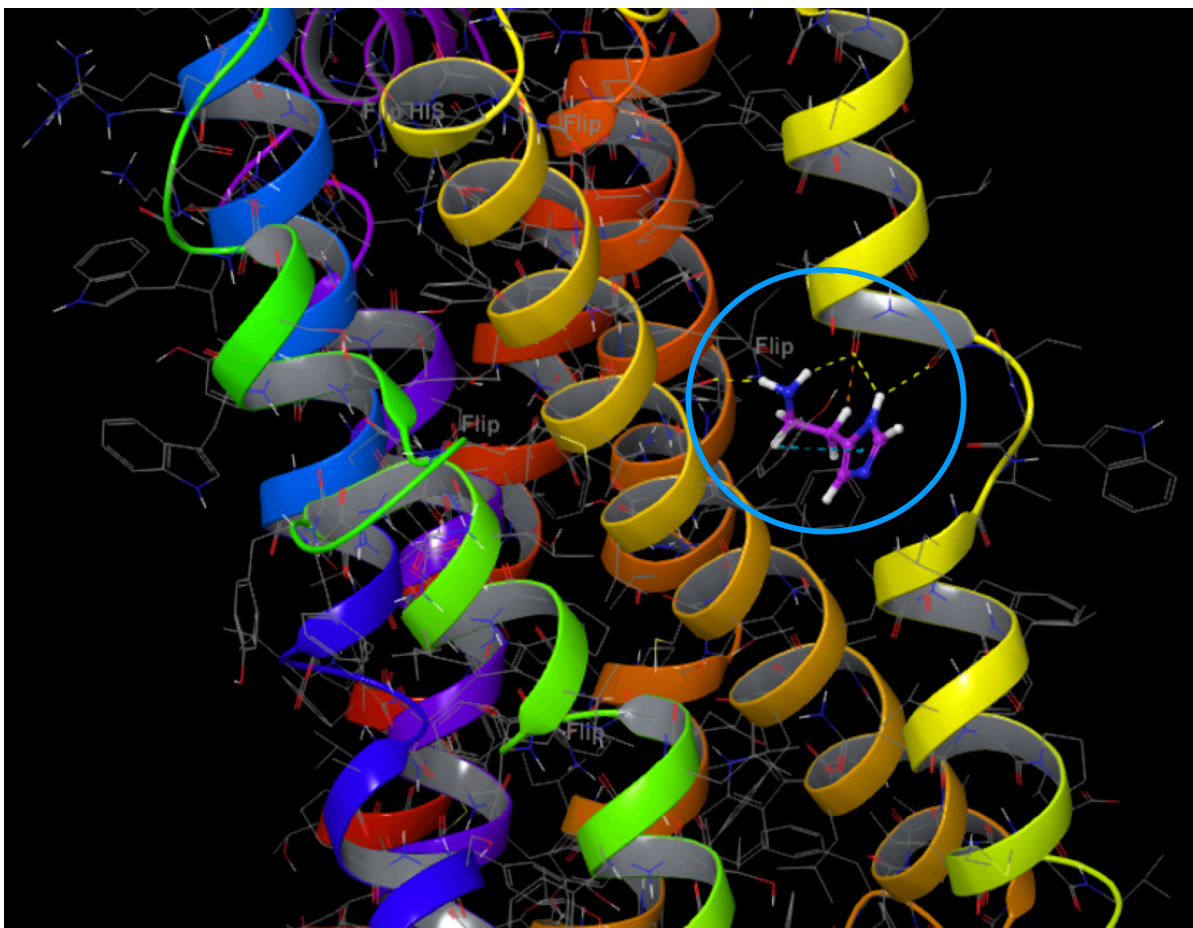


Figura 14. Modelo 3D de las interacciones de Histamina con aminoácidos de H4R.

Para el receptor tipo 4 de Histamina se observa que la interacción con la histamina ocurre en la región inferior, sin embargo esta no se realiza en la misma zona de el poro que se forma con las alfa helices de la proteína, se observa una interacción más orientada a la alfa helice mostrada en amarillo.

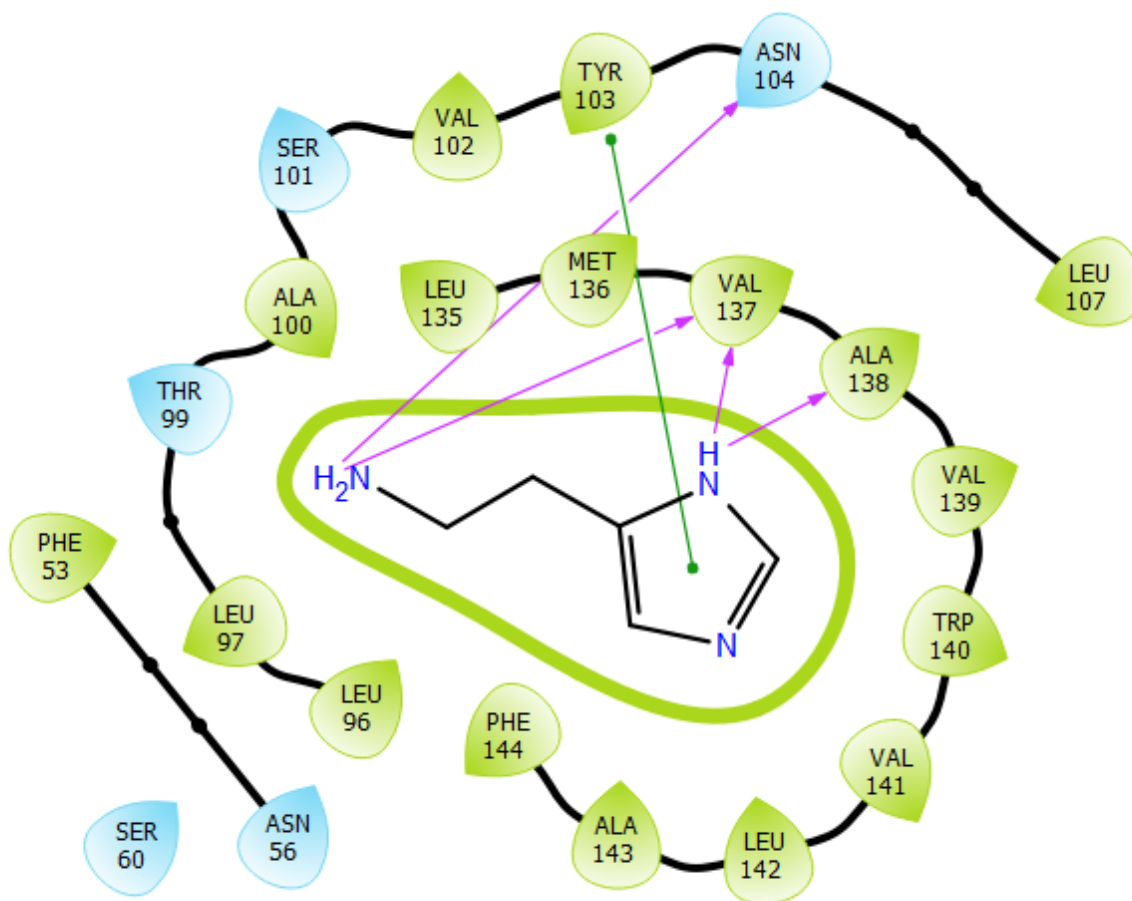


Figura 14.1 Interacción de Histamina con aminoácidos del H4R.

En el análisis correspondiente del ligando endógeno y H4R no existe presencia de interacciones polares, el ligando se encuentra rodeado de interacciones a través de cargas hidrofóbicas con un gran número de aminoácidos que lo rodean, sin embargo, hay un número mayor de interacciones con puentes de hidrogeno de la cadena terminal de la Histamina con Asparagina-104 y Valina-137, de igual forma hay una doble interacción de uno de los hidrógenos del anillo con Val 137 y Alanina 138 (flechas Rosas). Se conserva la interacción $\pi\pi$, esta vez entre el anillo del ligando y la Tirosina 103 (flecha verde). Todo lo anterior sugiere que a pesar de que no hay presencia de cargas polares, estas se compensan con el alto número de puentes de hidrógeno y la presencia de la interacción $\pi\pi$. Esta última interacción se encuentra presente en los 3 resultados del analisis realizado, lo que sugiere que desempeña

un papel importante en la interacción del ligando endógeno y los 3 receptores de histamina analizados en esta parte del estudio.

Con base en la información de literatura y de los resultados obtenidos se determinó que el receptor que se utilizará como primer elemento de reconocimiento será el H1R por su valor de $EA = -5.178$ lo que indica que pasado el tiempo la medición podría debilitarse y el sistema ligando-receptor podría desacoplarse sin embargo es a través del receptor H1 que la histamina aumenta la capacidad de las células presentadoras de antígenos, aumenta la liberación de histamina y otros mediadores de los mastocitos y basófilos, regula la inmunidad humoral y el cebado de Th, la proliferación de Th1 y la producción de $IFN-\gamma$, su papel desencadenante nos indicaría que la afinidad de histamina por H1R en la medición sería una primera señal activación de mecanismos responsables de la anafilaxia. En segundo lugar sería el receptor H4R que tuvo una $EA = -6.023$ y cuyo papel en la anafilaxia es la intensificación de la quimiotaxis de eosinófilos y mastocitos, la movilización y diferenciación de monocitos, linfocitos TH1 / TH2 y la estimulación de la producción de citocinas y quimiocinas por células dendríticas y linfocitos T, además de que la histamina muestra una alta afinidad por este receptor donde el pK_i para este es de 7.8 en comparación a H1 con pK_i de 4.2 [52,53].

El último receptor que se usará para el diseño es el H3R, este receptor se encuentra en el hipotálamo y su estimulación dificulta la liberación de norepinefrina, esto luego contribuye al shock [21]. Su selección y participación al final no está definida por su actividad o papel en la anafilaxia sino por su alto valor de energía de acoplamiento pues tiene una $EA = -6.253$, lo cual permitiría realizar mediciones aun después de cierto tiempo y menor posibilidad de una disminución en las señales obtenidas por la medición de histamina presente. De esta forma el orden del biosensor será H1R, H4R y H3R (ver Tabla 2) para así proponer un diseño bien estructurado y pensado para una efectiva medición de predisposición a anafilaxia.

Tabla 2. Orden de inmovilización en el biosensor a diseñar

<i>Receptor</i>	<i>H1R</i>	<i>H4R</i>	<i>H3R</i>
<i>Selección</i>	es principal receptor desencadenante de los mecanismos que conducen a la anafilaxia.	pKi de 7.8 lo que muestra una alta afinidad y permitiría la medición de histamina en el transcurso del tiempo sin riesgo a un desacoplamiento rápido.	Muestran un papel importante en la intensificación de la quimiotaxis de eosinófilos y mastocitos.
<i>EA</i>	Valor relativamente bajo de EA de -5.178 en comparación de los otros HxR.	Valor de EA -6.023 lo que indica alta afinidad.	Valor de EA de -6.253, el cual fue el mayor.
<i>Energías de estabilización</i>	-973.58 kcal/mol	-1089.32 kcal/mol, presenta la mayor energía de estabilidad.	-987.93 kcal/mol

Como hemos visto los receptores están formados de dos regiones (ver figura 5 como referencia) una superior (color morado) y una inferior (color rojo y naranja) que esta compuesta de hélices alfa formando un poro que es donde interactúa el ligando en cada uno de los HxR. No se podría inmovilizar en la región superior (region morada) primero porque dicha zona es de menor tamaño al poro donde ocurre la interacción y segundo, debido a que la unión de ambas regiones sucede por la cadena de aminoácidos que componen al receptor y es en estos sitios que ocurren *Flips* (giros libres) lo cual genera movimiento en esa zona y el receptor estaría realizando constantes giros que no permitiría que la región de acoplamiento se mantenga fija.

5.2.1 Interacción de PAF con PAFR.

Para analizar la interacción de PAF con su receptor decidimos buscar en PubChem la estructura del ligando y algunas moléculas estructuralmente similares a PAF así que realizamos un docking molecular de las diferentes interacciones del receptor con aquellos

ligandos que tienen una estructura altamente similar que difieren únicamente en algunos enlaces moleculares a lo largo de la cadena, los PubChem CID son: 124663, 108157, 2733535. Al realizar los estudios de interacción de los receptores con sus respectivos ligandos endógenos se obtuvo la tabla 2.

Tabla 2. Valores de energía de los diferentes ligandos analogos al factor activador de plaquetas (PAF)

Ligando	mcPAF	PAF C-16-d4	C18-PAF
Energía de Acoplamiento (EA)	-6.497	-8.061	-8.284

➤ Interacción de mcPAF con PAFR

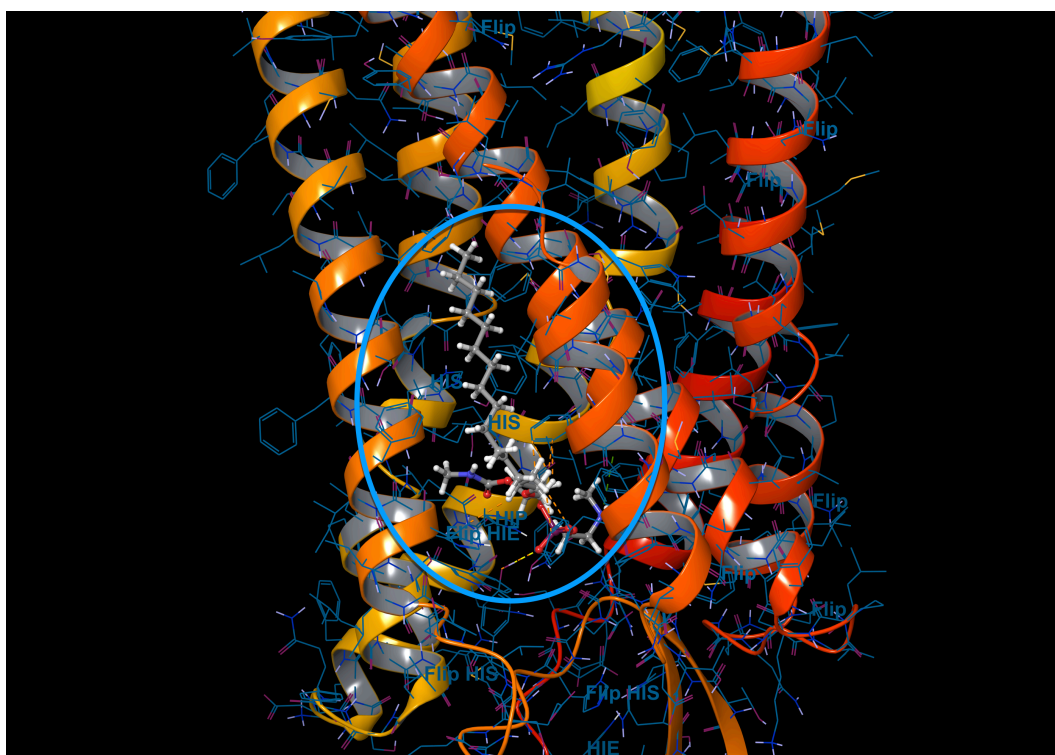


Figura 15. Modelo 3D de las interacciones del factor activador de plaquetas metilcarbamil (mcPAF, PubChem CID 124663) y PAFR.

El mc-PAF (1-O-hexadecil-2N-metilcarbamil-sn-glicero-3-fosfo-colina) es el agonista de PAF no hidrolizable, en conjunto con PAF evocan un colapso del cono de crecimiento

neuronal dependiente de la dosis; mc-PAF es un compuesto con usos potenciales en la purificación de receptores PAF y la producción de anticuerpos [58,59].

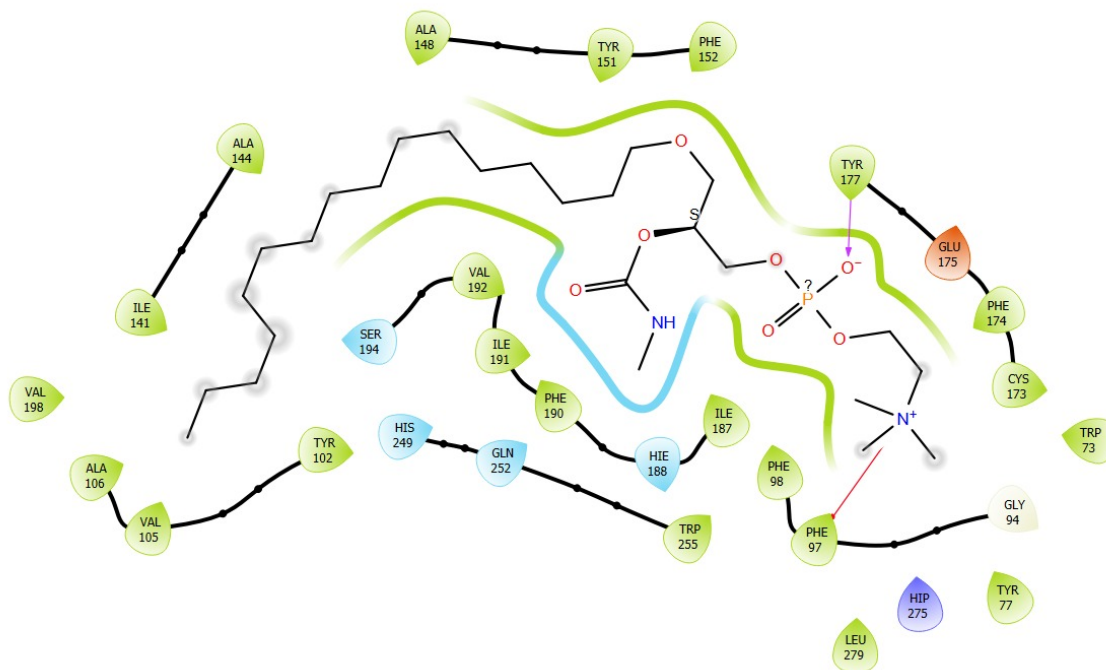


Figura 15.1 Interacción del receptor del factor activador de plaquetas (PAFR) con metilcarbamil PAF(mcPAF), PubChem CID 124663.

El análisis demostró un acoplamiento de mcPAF con PAFR mediante la interacciones de uno de los oxígenos libres del fosfato que realiza una interacción con la Tirosina 177 y el extremo de la carga negativa del oxígeno, en la cadena terminal del extremo derecho podemos observar una interacción entre el anillo aromático de la Fenilalanina 97 y la carga positiva del nitrógeno. La parte larga de la cadena lipídica y también el nitrógeno terminal poseen espacios para disolventes como agua (señaladas en la figura a, parte señalada con círculos grises a lo largo de la cadena lipídica). Predominan las interacciones hidrofóbicas con el ligando metilcarbamil PAF. La interacción polar la histidina en su forma ácida (HIE 188) con la parte media de la estructura de mcPAF. Podemos encontrar una histidina en su forma básica (HIP 275) pero esta no interactúa con el ligando. Lo anterior muestra cómo al ser un fosfolípido predominan las interacciones hidrofóbicas.

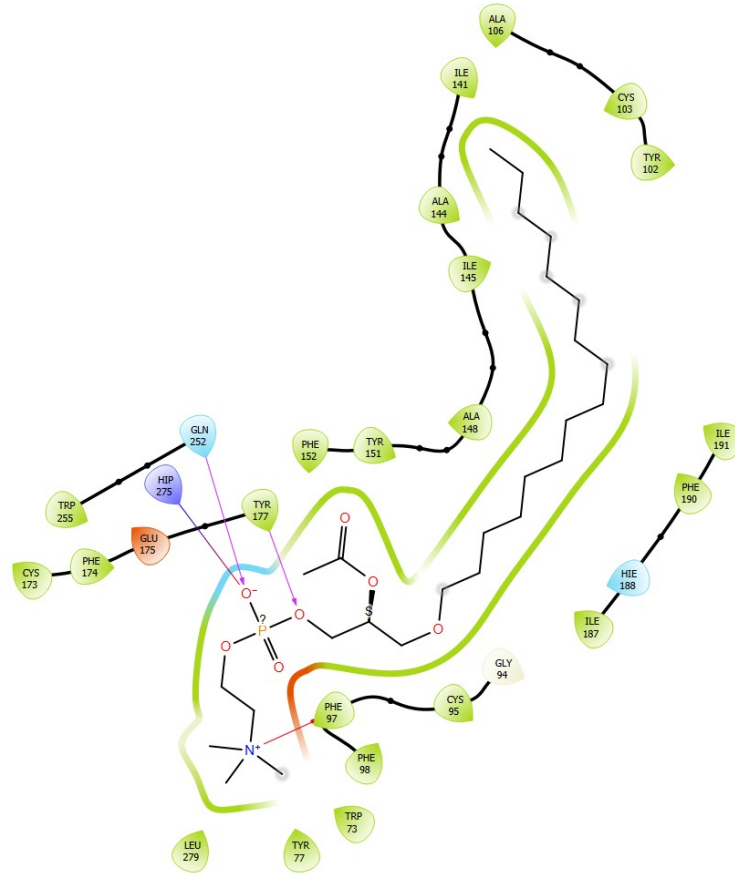


Figura 16.1 Interacción del receptor del factor activador de plaquetas (PAFR) con PAF C-16-d4, PubChem CID: 108157.

Los resultados bioinformáticos muestran que el oxígeno cargado negativamente interacciona con la Glutamina 252 mediante un puente de hidrógeno y con la histidina en su forma básica (HIP 275). Otro de los oxígenos del grupo fosfato interacciona con la tirosina 177; también se puede observar una interacción entre el anillo aromático de la fenilalanina 97 y la carga positiva del nitrógeno. La parte larga de la cadena lipídica y también el nitrógeno terminal poseen espacios para disolventes como agua (señaladas en la figura con círculos grises). Lo anterior muestra que las interacciones que predominan en el acoplamiento son de tipo hidrofóbicas.

➤ Interacción de C18-PAF con PAFR

La estimulación antigénica de mastocitos cultivados derivados de médula ósea sensibilizados con desgranulación celular inducida por IgE monoclonal específica y la biosíntesis de PAF-aceter (C18-PAF) se lleva a cabo a través de la vía de desacilación/acetilación [81–83]. C18-

PAF es un vasodilatador renal, pero es menos potente e hipotensivo que PAF C-16-d4; tanto C16-PAF como C18-PAF realizan actividades neurotóxicas y neuroprotectoras que causan la muerte del paciente al presentar un proceso anafiláctico, independiente del receptor PAF, pero señalan a través de diferentes vías. La activación de PAFR por C18-PAF es proapoptótica y desencadena la muerte independiente de la caspasa en las neuronas deficientes en el receptor de PAF [84,85].

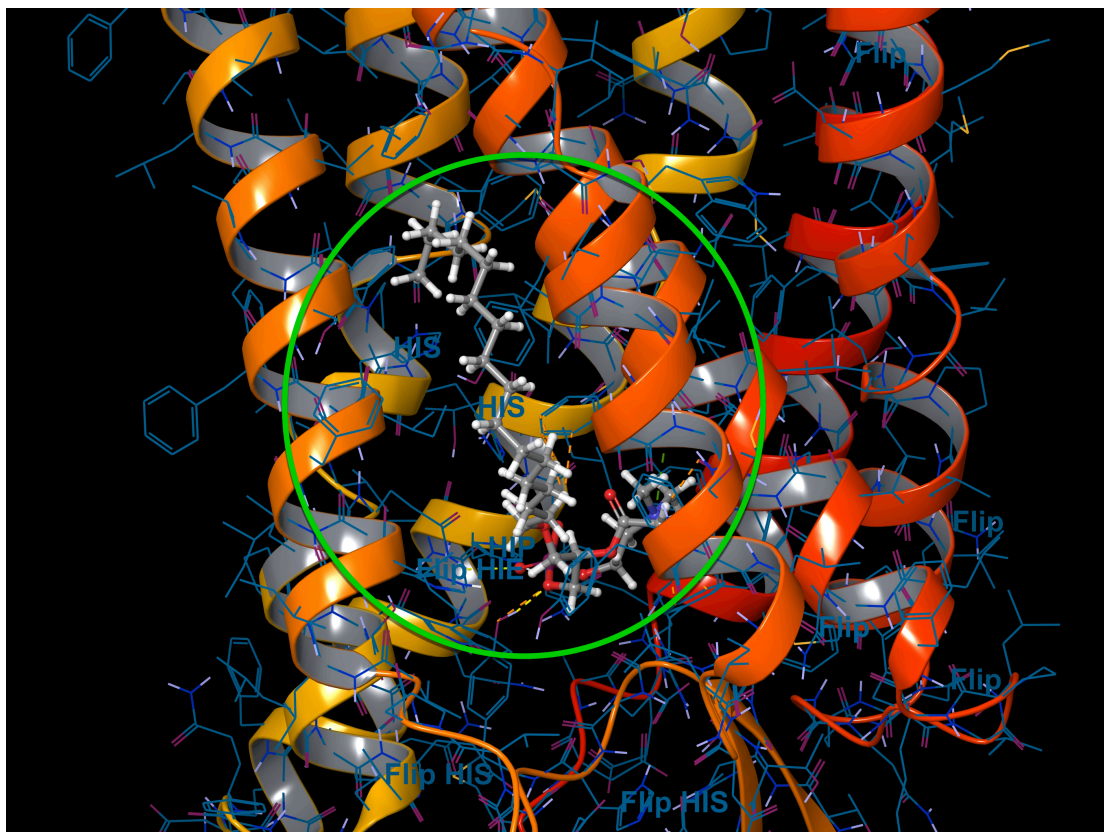


Figura I7. Modelo 3D de las interacciones del factor activador de plaquetas-aceter (C18-PAF, PubChem CID: 2733535) y PAFR.

La figura del modelo tridimensional muestra que, en las interacciones moleculares, la participación de las histidinas tienen una participación notable en el acoplamiento de la molécula de C18-PAF con el receptor que se acopla en la región porosa que forma las alfa helice de la parte inferior de la proteína.

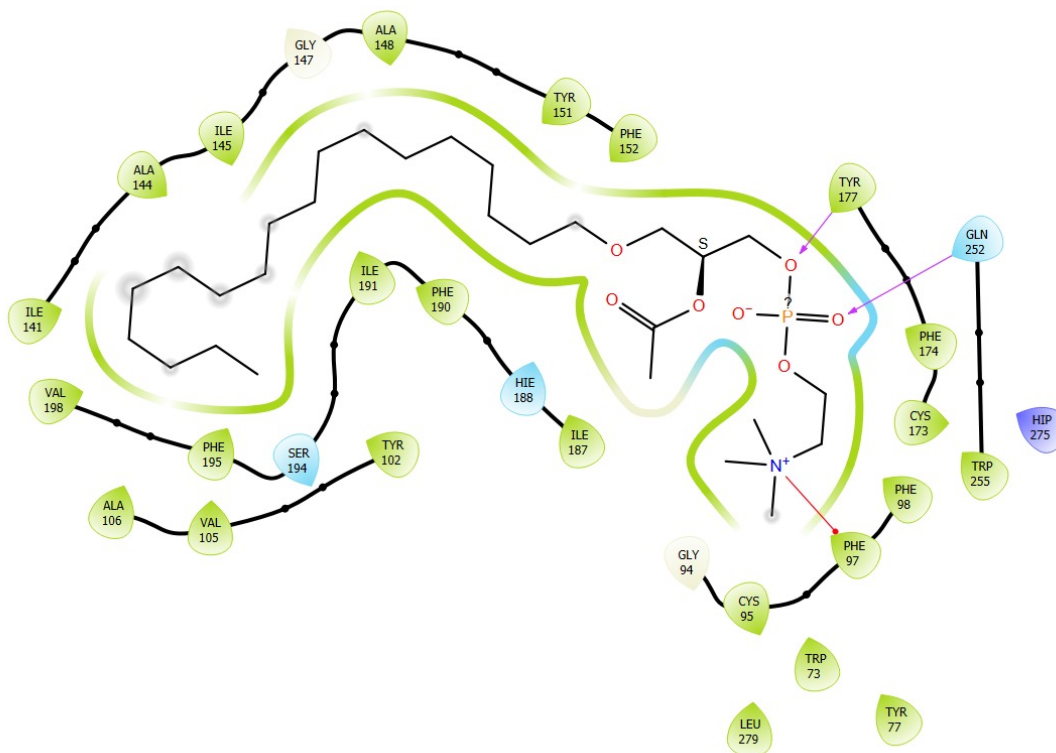


Figura 17.1 Interacción del receptor del factor activador de plaquetas (PAFR) con el factor activador de plaquetas-aceter (C18-PAF), PubChem CID: 2733535.

El docking molecular muestra que para C18-PAF uno de los oxígenos del fosfato realiza una interacción con la Tirosina 177 mientras que el oxígeno con doble enlace interactúa mediante un puente de hidrogeno con la glutamina. Se puede observar la presencia de una histidina en su forma básica (HIP 275) sin embargo esta no tiene una interacción con el ligando. La parte larga de la cadena lipídica y también el nitrógeno terminal poseen espacios (señalados en la figura con círculos grises) para disolventes como agua.

Debido a que PAF C-18 y C-16d4 están relacionadas en los procesos que conllevan a la anafilaxia, el receptor cumple la función de reconocer los ligandos y por lo tanto es posible utilizar a PAFR como receptor biológico del biosensor. Lo anterior sugiere que de acuerdo al método de detección se tendría que considerar que los agonistas de PAF van a mostrar diferentes señales de respuesta en la medición pero esta no cambia mucho debido a que los cambios entre moléculas son mínimos. Por ello, se concluye que PAFR muestra una buena interacción con los ligandos endógenos y puede ser utilizado para el diseño del biosensor.

Tabla 3. Resultados de los valores de las energías de estabilidad de los receptores de histamina (HxR), PAFR y las energías de acoplamiento de los complejos ligando-receptor.

<i>Receptor</i>	<i>Energía de estabilidad</i>	<i>EA del complejo histamina-HxR</i>
<i>H1R</i>	-973.58 kcal/mol	-5.178
<i>H2R</i>	-851.98 kcal/mol	N/I
<i>H3R</i>	-987.93 kcal/mol	-6.253
<i>H4R</i>	-1089.32 kcal/mol	-6.023
<i>PAFR</i>	-978.31 kcal/mol	-----
<i>Ligandos</i>	<i>Agonistas PAF</i>	<i>EA del complejo PAFR-agonistas</i>
	mcPAF	-6.497
	PAF-C16-d4	-8.061
	C18-PAF	-8.284

Los resultados evidencian que H4R, H3R y PAFR son los modelos más negativos; ya que valores más negativos indican mayor estabilidad, estos tres receptores fueron los mejores modelos. Sobre las energías de acoplamiento (EA), PAFR tuvo mayores valores respecto a los mostrados con la histamina y sus receptores, siendo PAF-C16-d4 y C18-PAF los agonistas con valores de EA más negativos, lo que indica un mejor acoplamiento y afinidad de dichos agonistas con PAFR. Histamina mostró mejor acoplamiento con el receptor tipo 3 seguido de H4R, el valor de H1R fue menor en comparativa a los antes mencionados y H2R mostró nula interacción. Los motivos de estas diferencias residen en los tipos de interacciones moleculares de cada complejo ligando-receptor. De este trabajo se identificó que para el complejo histamina-HxR las interacciones los enlace pi-pi que se dan entre los orbitales de los aromáticos, así como los puentes de hidrógeno desempeñaron un papel importante en el acoplamiento, dichos puentes se dan entre los residuos de los aminoácidos salvo el caso de el H3R donde la Valina-137 y Valina-138 al ser compuestos que no presentan Nitrógeno(N), Oxígeno(O) o Fósforo(F) libre para interactuar se teoriza que su interacción fue mediante los grupos carboxilo o amino de estos aminoácidos. Para los agonistas de PAF que interaccionaron con el PAFR fue la interacción del grupo fosfato mediante puentes de H y la interacción del N protonado (N⁺) en la cadena terminal de las moléculas.

5.3 Diseño del biosensor.

En esta parte del trabajo se presenta un diseño del biosensor, el cual permita identificar la presencia de Histamina y PAF en sangre y determinar las concentraciones para así dar un pronóstico/diagnóstico de riesgo a presentar una anafilaxia. Ahora conocemos que los receptores de H1R, H3R y H4R presentan energías de acomplamiento altas con respecto a la histamina, y que PAFR mostró que tiene buena interacción con PAF-C18 y PAF-C16-d4. Por lo que H3R, H4R, H1R y PAFR son los receptores seleccionados para el diseño del biosensor. El transductor se propone de tipo óptico debido a que en literatura se encontró información de las mediciones tanto de Histamina como PAF mediante técnicas de luz UV [86,87]. Se propone una prueba rápida a de flujo lateral para tener un dispositivo POC testing (point of care testing, por sus siglas en Inglés) que es una prueba examen en el lugar de atención, que ofrecen diversos beneficios a médicos y pacientes a partir del momento en que permite obtener resultados en cuestión de minutos[88–90]. La propuesta se fundamenta en que a consecuencia de la necesidad de diagnosticar a pacientes con COVID-19, se han desarrollado tecnologías que complementan las pruebas de este tipo, prueba de ello es que Montesinos et al. realizaron inmunoensayos cuantitativos y cualitativos (ELISA, CLIA y tres pruebas de flujo lateral) que demostraron un rendimiento preciso y equivalente de los cinco ensayos de anticuerpos serológicos y en literatura se encontró que en Hung et al. realizaron un inmunoensayo de flujo lateral acoplado a un microgating para desarrollar un spectrochip innovador[91]. La propuesta considera que las mediciones por UV ocurran a una sola longitud de onda, sin embargo, debido a que a diferencia del spectrochip que sólo mide un compuesto, esta propuesta esta enfocada en medir primero histamina y posteriormente C18-PAF y PAF-C16-d4. Por lo que se estudiaron las longitudes de onda o los valores de absorbancia de estos compuestos.

La histamina no suele medirse directamente por su longitud de onda o su valor de absorbancia, sino por su capacidad para unirse a receptores específicos en el cuerpo y producir una respuesta fisiológica, debido a su estructura química, la histamina tiene una absorbancia característica en el rango de longitud de onda de 200-300 nm, para la detección de la histamina mediante espectroscopía UV, una longitud de onda comúnmente utilizada es de 254 nm. Sin embargo, la longitud de onda óptima para la medición de la histamina puede

variar ligeramente dependiendo de la técnica analítica específica, las condiciones experimentales y el equipo utilizado para la medición [92,93]. Una longitud de onda comúnmente utilizada para la detección de lípidos como el C18-PAF mediante HPLC es de 210 nm y en el caso de la espectroscopia de absorción UV, se puede medir el C18-PAF a una longitud de onda de alrededor de 205-210 nm, que corresponde al máximo de absorción de los enlaces dobles conjugados presentes en la estructura de los lípidos, sin embargo, la concentración de C18-PAF en una muestra específica puede influir en la elección de la longitud de onda óptima para la detección [94,95]. Para PAF-C16-d4, su absorción máxima se encuentra alrededor de 205-210 nm, lo que es similar a la longitud de onda óptima para la detección de otros lípidos como el PAF-C16 no deuterado. Por lo tanto, una longitud de onda comúnmente utilizada para la detección de PAF-C16-d4 mediante espectroscopia de absorción UV es de alrededor de 205-210 nm, sin embargo, la longitud de onda exacta puede variar según las condiciones experimentales específicas y el equipo utilizado para la medición, por último PAF comúnmente se mide a una absorbancia de 206 nm que esta dentro del rango de C18-PAF y PAF-C16-d4[95–97]. Lo anterior muestra que PAF y sus agonistas deberán caracterizarse en función de este tipo de medición propuesta.

Tabla 4. Mediciones de histamina, C18-PAF y PAF-C16-d4 mediante UV

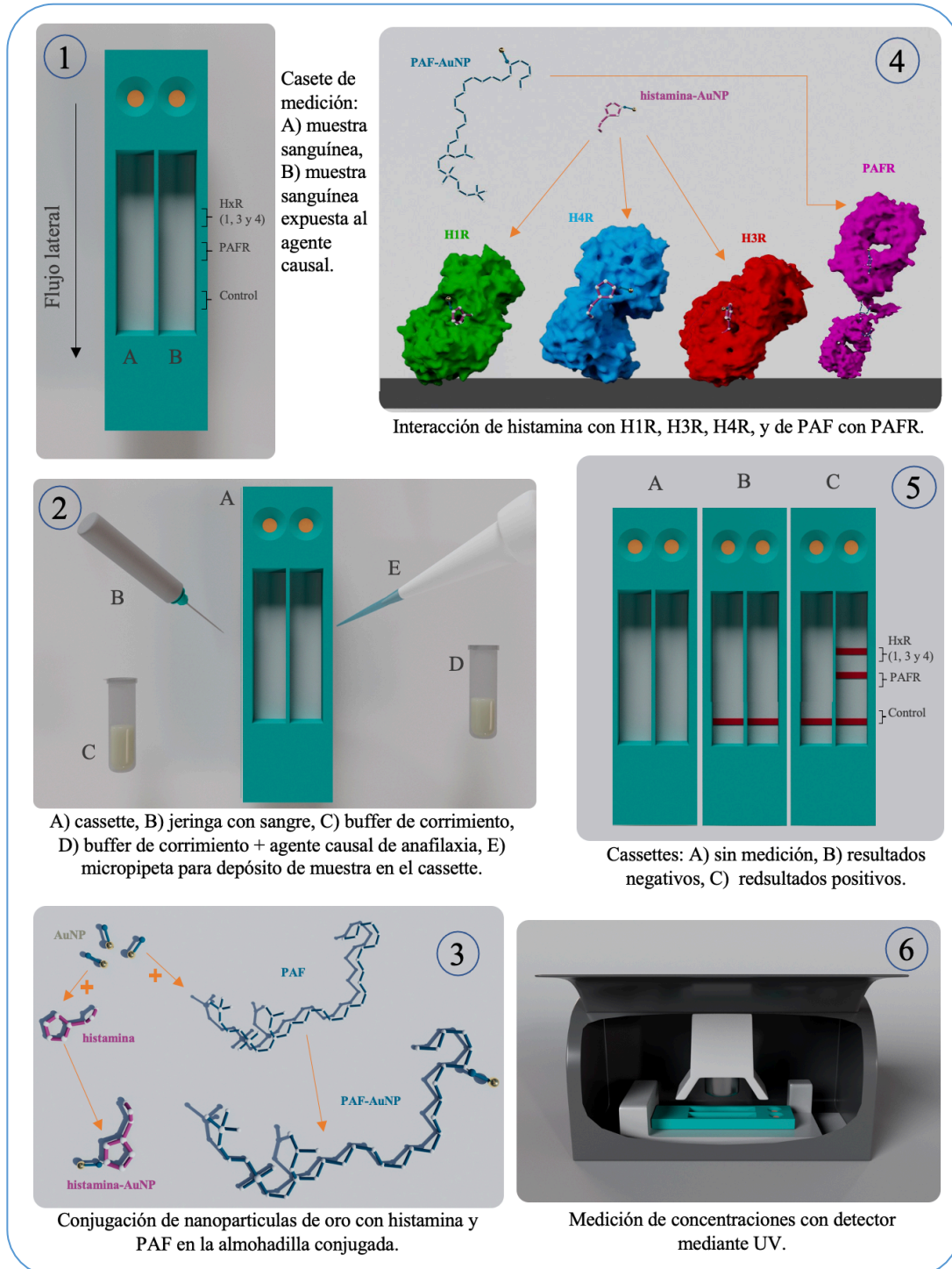
<i>ligando</i>	<i>Longitud de onda</i> (mediante HPLC)	<i>Absorción mediante UV</i>
<i>Histamina</i>	200-300 nm	≈ 254 nm *
<i>PAF</i>	206 nm	206 nm
<i>C18-PAF</i>	210 nm	≈ 205-210 nm *
<i>PAF-C16-d4</i>	205-210 nm	≈ 205-210 nm *

*Nota: Los valores pueden variar ligeramente dependiendo de la técnica analítica específica, las condiciones experimentales y el equipo utilizado para la medición así como la concentración.

Lo anterior muestra que la prueba debe considerar el aspecto de la medición UV pues los valores de absorción a pesar de variar ligeramente con PAF y sus agonistas, es más notable la diferencia con la histamina, se propone un corrimiento del laser que primero mida histamina y luego PAF y sus agonistas. La propuesta del biosensor con su forma de uso, así como proceso de lectura, se presenta en la figura 18. Es posible que alguna de las propuestas

establecidas tenga detalles metodológicos pero el punto principal es mostrar un diseño que conjunte el conocimiento obtenido en la tesis.

Figura 18. Esquema del biosensor propuesto con base en la información obtenida en este estudio.



CONCLUSIONES

En este trabajo, se llevó a cabo un análisis *in-silico* de las interacciones de dos de los biomarcadores asociados a anafilaxia grave, histamina y factor activador de plaquetas (PAF) con sus respectivos receptores HxR y PAFR. Del anterior estudio se concluye lo siguiente:

- 1) Mediante el uso de modelado molecular se obtuvieron las energías de estabilidad para los HxR modelados, demostrando que H4R es el más estable seguido de H3R y PAFR. Estos resultados proponen que para cualquier tipo de análisis *in silico* posterior a este estudio ya no se consideren a H2R como parte del estudio comparativo o que los modelados se realicen por otro tipo de metodología.
- 2) El docking molecular evidenció el papel fundamental de las interacciones pi-pi de los anillos aromáticos de los aminoácidos y la histamina, los puentes de hidrógeno no son dependientes de los residuos de los aminoácidos, como fue el caso de la Valina-137 y Alanina-138 del H3R, donde se teoriza que los puentes se formaron con la parte amino o carboxílica del aminoácido.
- 3) Respecto al PAFR, los agonistas C18-PAF y PAF C-16-d4 presentaron los valores más negativos, esto se relaciona a un mayor acoplamiento al receptor lo cual se relaciona con literatura que describen a ambos su papel en las actividades neurotóxicas y neuroprotectoras referentes al proceso anafiláctico, demostrando en este estudio su afinidad por PAFR.
- 4) Con la información obtenida respecto a la estabilidad molecular de los receptores modelados, las EA de los HxR seleccionados y los ligandos endógenos de PAF, se corrobora de manera *in silico* la pertinencia de inmovilizar los receptores H1R, H3R, H4R y PAFR para la elaboración de un biosensor que permita identificar los riesgos de un proceso anafiláctico frente a un agente causal de la anafilaxia, por ejemplo, fármacos, vacunas y alimentos.
- 5) El estudio permitió reenfocar el diseño y llevar a la obtención de una nueva propuesta al pasar de un método cualitativo a uno cuantitativo mediante el análisis y descubrimiento de las posibles formas de diseñar el biosensor.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Ring, K. Brockow, H. Behrendt, History and classification of anaphylaxis, *Novartis Found Symp.* 257 (2004) 6–16. <https://doi.org/10.1002/0470861193.ch2>.
- [2] C.L. Rohrer, W.J. Pichler, A. Helbling, [Anaphylaxis: clinical aspects, etiology and course in 118 patients], *Schweiz Med Wochenschr.* 128 (1998) 53–63. <https://europepmc.org/article/med/9498256> (accessed June 1, 2022).
- [3] S.F. Kemp, R.F. Lockey, Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms, *J Allergy Clin Immunol.* 110 (2002) 341–348. <https://doi.org/10.1067/MAI.2002.126811>.
- [4] C.A. Lowell, Neutrophils give us a shock, *J Clin Invest.* 121 (2011) 1260–1263. <https://doi.org/10.1172/JCI57296>.
- [5] S.M.T. Nguyen, C.P. Rupprecht, A. Haque, D. Pattanaik, J. Yusin, G. Krishnaswamy, Mechanisms Governing Anaphylaxis: Inflammatory Cells, Mediators, Endothelial Gap Junctions and Beyond, *Int J Mol Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/IJMS22157785>.
- [6] L. Rosenwasser, Bienvenido a la Semana Mundial de la Alergia 2014, (n.d.).
- [7] S. Clark, C.A. Camargo, Epidemiology of anaphylaxis, *Immunol Allergy Clin North Am.* 27 (2007) 145–163. <https://doi.org/10.1016/J.IAC.2007.03.002>.
- [8] P. R, H. MB, Y. PR, H. KE, Idiopathic anaphylaxis. An attempt to estimate the incidence in the United States, *Arch Intern Med.* 155 (1995) 869–871. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.155.8.869>.
- [9] F.E.R. Simons, L.R.F. Arduoso, M.B. Bilò, Y.M. El-Gamal, D.K. Ledford, J. Ring, M. Sanchez-Borges, G.E. Senna, A. Sheikh, B. Thong, World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis, *World Allergy Organ J.* 4 (2011) 13. <https://doi.org/10.1097/WOX.0B013E318211496C>.
- [10] Y. Wang, K.J. Allen, N.H.A. Suaini, V. McWilliam, R.L. Peters, J.J. Koplin, The global incidence and prevalence of anaphylaxis in children in the general population: A systematic review, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 74 (2019) 1063–1080. <https://doi.org/10.1111/ALL.13732>.
- [11] J. Londoño, M. Raigosa, M. Vásquez, J. Sánchez, J. Londoño, M. Raigosa, M. Vásquez, J. Sánchez, Anafilaxia: estado del arte, *Iatreia.* 31 (2018) 166–179. <https://doi.org/10.17533/UDEA.IATREIA.V31N2A05>.
- [12] R. Bustamante Bozzo, Anafilaxia y shock anafiláctico Anaphilactic shock and anaphylaxis, *Rev Chil Anest.* 50 (2021) 27–55. <https://doi.org/10.25237/revchilanestv50n01-04>.
- [13] M.L. Sanz, P.M. Gamboa, B.E. García-Figueroa, M. Ferrer, In vitro diagnosis of anaphylaxis, *Chem Immunol Allergy.* 95 (2010) 125–140. <https://doi.org/10.1159/000315947>.
- [14] F.E.R. Simons, K.J. Simons, Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress, *J Allergy Clin Immunol.* 128 (2011). <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2011.09.005>.
- [15] S. Lata, S. Yadav, R. Bhardwaj, C.S. Pundir, Amperometric determination of tyramine in sauce and beer by epoxy resin biocomposite membrane bound tyramine oxidase, *Sens Instrum Food Qual Saf.* 5 (2011) 104–110. <https://doi.org/10.1007/S11694-011-9117-5/FIGURES/6>.
- [16] A. Moyano, M. Salvador, J.C. Martínez-García, V. Socoliuc, L. Vékás, D. Peddis, M.A. Alvarez, M. Fernández, M. Rivas, M.C. Blanco-López, Magnetic

- immunochromatographic test for histamine detection in wine, *Anal Bioanal Chem.* 411 (2019) 6615–6624. <https://doi.org/10.1007/S00216-019-02031-6/TABLES/3>.
- [17] P. Gill, N.L. Jindal, A. Jagdis, P. Vadas, Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis, *J Allergy Clin Immunol.* 135 (2015) 1424–1432. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2015.04.019>.
- [18] S.C. Beck, T. Wilding, R.J. Buka, R.L. Baretto, A.P. Huissoon, M.T. Krishna, Biomarkers in Human Anaphylaxis: A Critical Appraisal of Current Evidence and Perspectives, *Front Immunol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00494>.
- [19] S. Ishii, T. Shimizu, Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice, *Prog Lipid Res.* 39 (2000) 41–82. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(99\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(99)00016-8).
- [20] P. Vadas, B. Perelman, G. Liss, Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis, *J Allergy Clin Immunol.* 131 (2013) 144–149. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2012.08.016>.
- [21] M.M. Tomasiak-Łozowska, M. Klimek, A. Lis, M. Moniuszko, A. Bodzenta-Łukaszyk, Markers of anaphylaxis - a systematic review, *Adv Med Sci.* 63 (2018) 265–277. <https://doi.org/10.1016/J.ADVMS.2017.12.003>.
- [22] R.Y. Lin, L.B. Schwartz, A. Curry, G.R. Pesola, R.J. Knight, H.S. Lee, L. Bakalchuk, C. Tenenbaum, R.E. Westfal, Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study, *J Allergy Clin Immunol.* 106 (2000) 65–71. <https://doi.org/10.1067/MAI.2000.107600>.
- [23] P. Vadas, M. Gold, B. Perelman, G.M. Liss, G. Lack, T. Blyth, F.E.R. Simons, K.J. Simons, D. Cass, J. Yeung, Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis, *N Engl J Med.* 358 (2008) 28–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA070030>.
- [24] J. Ring, H. Behrendt, A. De Weck, History and classification of anaphylaxis, *Chem Immunol Allergy.* 95 (2010) 1–11. <https://doi.org/10.1159/000315934>.
- [25] C.P.P. Richet, De l'action anaphylactique de certains venins., *CR Soc Biol, Paris,* 1902.
- [26] G. Richet, P. Estingoy, [The life and times of Charles Richet]., *Hist Sci Med.* 37 (2003) 501–513. <https://europepmc.org/article/med/15025138> (accessed March 7, 2023).
- [27] S.G. Cohen, M. Zelaya-Quesada, Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial., *J Allergy Clin Immunol.* 110 (2002) 331–336. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(02\)70118-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(02)70118-8).
- [28] anafilaxia | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE, (n.d.). <https://dle.rae.es/anafilaxia> (accessed March 7, 2023).
- [29] A. Alvarez-Perea, B. Ameiro, C. Morales, G. Zambrano, A. Rodríguez, M. Guzmán, J.M. Zubeldia, M.L. Baeza, Anaphylaxis in the Pediatric Emergency Department: Analysis of 133 Cases After an Allergy Workup, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 5 (2017) 1256–1263. <https://doi.org/10.1016/J.JAIP.2017.02.011>.
- [30] L.E. Zudaire, D. Olmo De La Lama, S. Rodríguez, Anafilaxia en pediatría, in: 2013. www.aeped.es/protocolos/ (accessed May 26, 2022).
- [31] P.K. Smith, J.O.B. Hourihane, P. Lieberman, Risk multipliers for severe food anaphylaxis, *World Allergy Organ J.* 8 (2015) 30. <https://doi.org/10.1186/S40413-015-0081-0>.

- [32] N. Ontiveros, E.E. Valdez-Meza, M.J. Vergara-Jiménez, A. Canizalez-Román, A. Borzutzky, F. Cabrera-Chávez, Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study, *Allergol Immunopathol (Madr)*. 44 (2016) 563–570. <https://doi.org/10.1016/J.ALLER.2016.03.003>.
- [33] S.G.O. Johansson, T. Bieber, R. Dahl, P.S. Friedmann, B.Q. Lanier, R.F. Lockey, C. Motala, J.A. Ortega Martell, T.A.E. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. van Cauwenberge, H.C. Williams, Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113 (2004) 832–836. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2003.12.591>.
- [34] H.A. Sampson, Food allergy, *J Allergy Clin Immunol*. 84 (1989) 1062–1067. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90154-1](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90154-1).
- [35] C. Rohrer, W. Pichler, A. Helbling, [Anaphylaxis: clinical aspects, etiology and course in 118 patients] - PubMed, (1998). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9498256/> (accessed May 27, 2022).
- [36] S. Acero, A.I. Tabar, B.E. García, S. Echechipía, J.M. Olaguibel, Anafilaxia: diagnóstico etiológico, (1999).
- [37] F. de Medicina, A. Álvarez-Perea Directores María Luisa Baeza Ochoa de Ocariz José Manuel Zubeldia Ortuño, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID TESIS DOCTORAL, (n.d.).
- [38] E. Brazil, A.F. MacNamara, “Not so immediate” hypersensitivity--the danger of biphasic anaphylactic reactions., *J Accid Emerg Med*. 15 (1998) 252. <https://doi.org/10.1136/EMJ.15.4.252>.
- [39] F.E.R. Simons, L.R. Arduoso, M.B. Bilò, V. Cardona, M. Ebisawa, Y.M. El-Gamal, P. Lieberman, R.F. Lockey, A. Muraro, G. Roberts, M. Sanchez-Borges, A. Sheikh, L.P. Shek, D. v. Wallace, M. Worm, International consensus on (ICON) anaphylaxis, *World Allergy Organ J*. 7 (2014). <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-9>.
- [40] V.R. Baral, J. O’B Hourihane, Food allergy in children, *Postgrad Med J*. 81 (2005) 693–701. <https://doi.org/10.1136/PGMJ.2004.030288>.
- [41] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment, *J Allergy Clin Immunol*. 133 (2014). <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2013.11.020>.
- [42] M.E. Parsons, C.R. Ganellin, Histamine and its receptors, *Br J Pharmacol*. 147 (2006) S127. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706440>.
- [43] E.B. Thangam, E.A. Jemima, H. Singh, M.S. Baig, M. Khan, C.B. Mathias, M.K. Church, R. Saluja, The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets, *Front Immunol*. 9 (2018) 1873. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01873/BIBTEX>.
- [44] R. Seifert, A. Strasser, E.H. Schneider, D. Neumann, S. Dove, A. Buschauer, Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes, *Trends Pharmacol Sci*. 34 (2013) 33–58. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2012.11.001>.
- [45] P. Lieberman, R.A. Nicklas, J. Oppenheimer, S.F. Kemp, D.M. Lang, D.I. Bernstein, J.A. Bernstein, A.W. Burks, A.M. Feldweg, J.N. Fink, P.A. Greenberger, D.B.K. Golden, J.M. James, D.K. Ledford, A.L. Sheffer, J. Blessing-Moore, L. Cox, D.A. Khan, J.M. Portnoy, C. Randolph, D.E. Schuller, S.L. Spector, S. Tilles, D. Wallace, The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update, *J Allergy Clin Immunol*. 126 (2010). <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2010.06.022>.

- [46] Z. Khoshbin, M.R. Housaindokht, M. Izadyar, M.R. Bozorgmehr, A. Verdian, Recent advances in computational methods for biosensor design, *Biotechnol Bioeng.* 118 (2021) 555–578. <https://doi.org/10.1002/BIT.27618>.
- [47] K.A. Giuliano, D.L. Taylor, Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01166-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01166-9).
- [48] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60 (2016) 1. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [49] R.H. Patel, S.S. Mohiuddin, Biochemistry, Histamine, *StatPearls.* (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557790/> (accessed March 6, 2023).
- [50] M. Dy, E. Schneider, Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 393–410. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2004.06.003>.
- [51] M. Deng, H. Guo, J.W. Tam, B.M. Johnson, W.J. Brickey, J.S. New, A. Lenox, H. Shi, D.T. Golenbock, B.H. Koller, K.P. McKinnon, B. Beutler, J.P.Y. Ting, Platelet-activating factor (PAF) mediates NLRP3-NEK7 inflammasome induction independently of PAFR, *J Exp Med.* 216 (2019) 2838–2853. <https://doi.org/10.1084/JEM.20190111>.
- [52] E. Tiligada, E. Zampeli, K. Sander, H. Stark, Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets, *Expert Opin Investig Drugs.* 18 (2009) 1519–1531. <https://doi.org/10.1517/14728220903188438>.
- [53] A. Deiteren, J.G. de Man, P.A. Pelckmans, B.Y. de Winter, Histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract, *Br J Pharmacol.* 172 (2015) 1165–1178. <https://doi.org/10.1111/BPH.12989>.
- [54] W. Chao, M.S. Olson, Platelet-activating factor: receptors and signal transduction, *Biochem. J.* 292 (1993) 617–629.
- [55] S.B. Hwang, Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms, *J Lipid Mediat.* 2 (1990) 123–158. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1966805/> (accessed June 1, 2022).
- [56] F. Lantoin, L. Iouzalén, M.A. Devynck, E. Millanvoye-Van Brussel, M. David-Duflho, Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca²⁺ influx, *Biochem J.* 330 (Pt 2) (1998) 695–699. <https://doi.org/10.1042/BJ3300695>.
- [57] T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G.W. Han, T. Kobayashi, R.C. Stevens, S. Iwata, Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin, *Nature.* 475 (2011) 65–72. <https://doi.org/10.1038/NATURE10236>.
- [58] C. Cao, Q. Tan, C. Xu, L. He, L. Yang, Y. Zhou, Y. Zhou, A. Qiao, M. Lu, C. Yi, G.W. Han, X. Wang, X. Li, H. Yang, Z. Rao, H. Jiang, Y. Zhao, J. Liu, R.C. Stevens, Q. Zhao, X.C. Zhang, B. Wu, Structural basis for signal recognition and transduction by platelet-activating-factor receptor, *Nature Structural & Molecular Biology* 2018 25:6. 25 (2018) 488–495. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0068-y>.
- [59] Schrödinger Release 2022-4, BioLuminate, Schrödinger, LLC, (2021). <https://www.schrodinger.com/citations#> (accessed February 15, 2023).
- [60] Schrödinger Release 2022-4., Prime, Schrödinger, LLC, (2021). <https://www.schrodinger.com/citations#> (accessed February 15, 2023).

- [61] X. Xu, J. Kaindl, M.J. Clark, H. Hübner, K. Hirata, R.K. Sunahara, P. Gmeiner, B.K. Kobilka, X. Liu, Binding pathway determines norepinephrine selectivity for the human β 1AR over β 2AR, *Cell Res.* 31 (2021) 569–579. <https://doi.org/10.1038/S41422-020-00424-2>.
- [62] T.S. Thorsen, R. Matt, W.I. Weis, B.K. Kobilka, Modified T4 Lysozyme Fusion Proteins Facilitate G Protein-Coupled Receptor Crystallogenesis, *Structure.* 22 (2014) 1657–1664. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2014.08.022>.
- [63] A. Carrasco-Carballo, D.F. Mendoza-Lara, J.A. Rojas-Morales, V. Alatraste, P. Merino-Montiel, F. Luna, J. Sandoval-Ramirez, In silico Study of Coumarins Derivatives With Potential Use in Systemic Diseases, (2022). <https://doi.org/10.33263/BRIAC133.240>.
- [64] El equilibrio del PH en el organismo | Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado | Gobierno | gov.mx, (n.d.). <https://www.gob.mx/issste/articulos/el-equilibrio-del-ph-en-el-organismo?idiom=es> (accessed March 8, 2023).
- [65] A. A, M. CE, Doxepin, XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. . (2019) 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61649-6>.
- [66] T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G.W. Han, T. Kobayashi, R.C. Stevens, S. Iwata, Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin, *Nature* 2011 475:7354. 475 (2011) 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature10236>.
- [67] M.E. Parsons, C.R. Ganellin, Histamine and its receptors, *Br J Pharmacol.* 147 (2006). <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706440>.
- [68] L. Hok, J. Mavri, R. Vianello, The effect of deuteration on the h2 receptor histamine binding profile: A computational insight into modified hydrogen bonding interactions, *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25246017>.
- [69] B. Mukesh, K. Rakesh, MOLECULAR DOCKING: A REVIEW, *Int J Res Ayurveda Pharm.* 2 (2011) 1746–1751. www.ijrap.net (accessed March 9, 2023).
- [70] S. Agarwal, R. Mehrotra, An overview of Molecular Docking, *JSM Chem.* 4 (2016) 1024. <https://www.researchgate.net/publication/303897563> (accessed March 9, 2023).
- [71] S. Singh, Q. Bani Baker, D.B. Singh, Molecular docking and molecular dynamics simulation, *Bioinformatics: Methods and Applications.* (2022) 291–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00014-6>.
- [72] D. Paul, G. Sanap, S. Shenoy, D. Kalyane, K. Kalia, R.K. Tekade, Artificial intelligence in drug discovery and development, *Drug Discov Today.* 26 (2021) 80. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2020.10.010>.
- [73] P. Wellendorph, M.W. Goodman, E.S. Burstein, N.R. Nash, M.R. Brann, D.M. Weiner, Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H(3) receptor, *Neuropharmacology.* 42 (2002) 929–940. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00041-2).
- [74] P. Wiedemann, H. Bönisch, F. Oerters, M. Brüss, Structure of the human histamine H 3 receptor gene (HRH3) and identification of naturally occurring variations, *J Neural Transm.* 109 (2002) 443–453.
- [75] G.K. Marathe, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL, *Vascul Pharmacol.* 38 (2002) 193–200. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00169-6).

- [76] C. Cao, Q. Tan, C. Xu, L. He, L. Yang, Y. Zhou, Y. Zhou, A. Qiao, M. Lu, C. Yi, G.W. Han, X. Wang, X. Li, H. Yang, Z. Rao, H. Jiang, Y. Zhao, J. Liu, R.C. Stevens, Q. Zhao, X.C. Zhang, B. Wu, Structural basis for signal recognition and transduction by platelet-activating-factor receptor, *Nat Struct Mol Biol.* 25 (2018) 488–495. <https://doi.org/10.1038/S41594-018-0068-Y>.
- [77] P. SM, Z. GA, M. TM, Platelet-activating factor, *J Biol Chem.* 265 (1990) 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62437-7>.
- [78] H. Wang, X. di Tan, X.W. Qu, H. Chang, D.G. Remick, F. Gonzalez-Crussi, W. Hsueh, Platelet-activating factor (PAF) up-regulates plasma and tissue PAF-acetylhydrolase activity in the rat: effect of cycloheximide, *Pediatr Res.* 42 (1997) 597–603. <https://doi.org/10.1203/00006450-199711000-00008>.
- [79] T.B. Casale, M.K. Abbas, E.J. Carolan, Degree of neutrophil chemotaxis is dependent upon the chemoattractant and barrier., *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7 (1992) 112–117. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/7.1.112>.
- [80] M. Rouis, F. Nigon, M. John Chapman, Platelet activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages, *Biochem Biophys Res Commun.* 156 (1988) 1293–1301. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80773-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80773-3).
- [81] S. Leyravaud, M.J. Bossant, F. Joly, G. Bessou, J. Benveniste, E. Ninio, Biosynthesis of paf-acether. X. Phorbol myristate acetate-induced paf-acether biosynthesis and acetyltransferase activation in human neutrophils, *J Immunol.* 143 (1989) 245–249. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2732470/> (accessed September 19, 2022).
- [82] F. Joly, I. Vilgrain, M.J. Bossant, G. Bessou, J. Benveniste, E. Ninio, Biosynthesis of paf-acether. Activators of protein kinase C stimulate cultured mast cell acetyltransferase without stimulating paf-acether synthesis., *Biochemical Journal.* 271 (1990) 501. <https://doi.org/10.1042/BJ2710501>.
- [83] E. Ninio, F. Joly, Transmembrane signalling and paf-acether biosynthesis, *Lipids.* 26 (1991) 1034–1037. <https://doi.org/10.1007/BF02536497>.
- [84] S.D. Ryan, C.S. Harris, C.L. Carswell, J.E. Baenzinger, S.A.L. Bennett, Heterogeneity in the sn-1 carbon chain of platelet-activating factor glycerophospholipids determines pro- or anti-apoptotic signaling in primary neurons, *J Lipid Res.* 49 (2008) 2250–2258. <https://doi.org/10.1194/JLR.M800263-JLR200>.
- [85] R.K. Handa, J.W. Strandhoy, V.M. Buckalew, Vasorelaxant effect of C16-PAF and C18-PAF on renal blood flow and systemic blood pressure in the anesthetized rat, *Life Sci.* 49 (1991) 747–752. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90107-M](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90107-M).
- [86] S. Oguri, S. Watanabe, S. Abe, Determination of histamine and some other amines by high-performance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization, *J Chromatogr A.* 790 (1997) 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00719-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00719-X).
- [87] C.A. Demopoulos A*, N.K. Anddopoulos, S. Antonopoulou, A Simple and Precise Method for the Routine Determination of Platelet-Activating Factor in Blood and Urine, 1994.
- [88] C.P. Price, Point of care testing, *BMJ.* 322 (2001) 1285–1288. <https://doi.org/10.1136/BMJ.322.7297.1285>.
- [89] S.K. Vashist, P.B. Luppa, L.Y. Yeo, A. Ozcan, J.H.T. Luong, Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 692–705. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2015.09.001>.

- [90] Z. Zhang, P. Ma, R. Ahmed, J. Wang, D. Akin, F. Soto, B.F. Liu, P. Li, U. Demirci, Advanced Point-of-Care Testing Technologies for Human Acute Respiratory Virus Detection, *Advanced Materials*. 34 (2022) 2103646. <https://doi.org/10.1002/ADMA.202103646>.
- [91] I. Montesinos, D. Gruson, B. Kabamba, H. Dahma, S. van den Wijngaert, S. Reza, V. Carbone, O. Vandenberg, B. Gulbis, F. Wolff, H. Rodriguez-Villalobos, Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies, *Journal of Clinical Virology*. 128 (2020) 104413. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2020.104413>.
- [92] J. feng Peng, K. teng Fang, D. hua Xie, B. Ding, J.Y. Yin, X. mei Cui, Y. Zhang, J. fu Liu, Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J Chromatogr A*. 1209 (2008) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.028>.
- [93] G. Hovde, J. Wang-Andersen, B. Asbjørnsen, Histamine in fish: Liquid chromatographic determination with post-column derivatization and fluorescence detection, (2015). <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/handle/11250/281163> (accessed March 10, 2023).
- [94] T.N. Nomikos, S. Antonopoulou, D. Argyropoulos, C.A. Demopoulos, DETERMINATION OF PLATELET-ACTIVATING FACTOR BY HPLC WITH FLUORESCENCE DETECTION, <Http://Dx.Doi.Org/10.1081/JLC-100101735>. 22 (2006) 1331–1341. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101735>.
- [95] J.S. Owen, R.L. Wykle, M.P. Samuel, M.J. Thomas, An improved assay for platelet-activating factor using HPLC-tandem mass spectrometry, *J Lipid Res*. 46 (2005) 373–382. <https://doi.org/10.1194/JLR.D400029-JLR200>.
- [96] P. Bento, D. Silva, A.D. Tischler, S. Sharma, A.A. Pathan, M.S. Riaz, A. Kaur, S.N. Shwayat, S. Behboudi, U. Kishore, Direct Growth Inhibitory Effect of Platelet Activating Factor C-16 and Its Structural Analogs on Mycobacteria, (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01903>.
- [97] H.W. Mueller, C.A. Haught, J.M. McNatt, K. Cui, S.J. Gaskell, D.A. Johnston, J.T. Willerson, Measurement of Platelet-Activating Factor in a Canine Model of Coronary Thrombosis and in Endarterectomy Samples From Patients With Advanced Coronary Artery Disease, *Circ Res*. 77 (1995) 54–63. <https://doi.org/10.1161/01.RES.77.1.54>.