

18.379

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Biología Animal II
(Fisiología animal)



* 5 3 0 9 5 6 1 9 2 2 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**CARACTERIZACION DE ALERGENOS DEL POLEN
DE CENTENO**

Tesis presentada por María Teresa Montero Vega para
optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 1 de Marzo de 1993

Vº Bº Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'E. Herrera Castellón', written in a cursive style.

Prof. D. Emilio Herrera Castellón

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Teresa Montero', written in a cursive style.

Dª Mª Teresa Montero

**CARACTERIZACION DE ALERGENOS DEL POLEN
DE CENTENO**

El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Bioquímica, Departamento de Investigación, del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, bajo la dirección del Profesor D. Emilio Herrera Castellón, subvencionada en parte por el Fiss (proyectos 89/0154 y 90/0246).

Una parte de los resultados obtenidos han sido publicados en:

- Allergy (1992) 47:22-25
- Allergy (1992) 47:26-29

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a quienes han contribuido de alguna forma en la realización de este trabajo:

Al Dr. **Emilio Herrera**, por su interés como Director del trabajo y por su constante estímulo hasta su finalización.

A la Dra. **Mónica de la Fuente**, por su amable actuación como tutora.

A la Dra. **Matilde Salinas** por su paciente escucha y sus útiles consejos.

A la Dra. **Elena Martín** y al Dr. **Alberto Alcázar** por poner a mi disposición su experiencia en el manejo del Sistema de Cromatografía FPLC.

A **Esther Alonso** por su colaboración y ánimo en los comienzos del estudio, imprescindibles para la continuación del mismo.

A **Sara Guerras** por su inapreciable ayuda técnica.

A **Ignacio Dávila, Jose Antonio Martín** y a la Dra. **Manuela Cuevas** por el interés demostrado por el tema y su colaboración en la selección de pacientes y realización de pruebas clínicas.

A la Dra. **M^a de los Angeles Trillo** y al Dr. **Carlos Paño** por la realización de las fotos al microscopio.

A **Juan Antonio Jiménez** por su gran amabilidad y generoso suministro de pólenes.

A **Concepción Muela** por su aportación en los trabajos de fotografía.

A mi marido **Domingo Torres** por su esmero en la edición.

Dedicado a:

- *Mi marido, Domingo*
- *nuestros hijos Pablo, Teresa y Luis*
- *mi padre*

por su enorme cariño y comprensión

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO

0 ABREVIATURAS

1 INTRODUCCION

1.1 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO I. ALERGIA	1.1
1.1.1 La inmunoglobulina E	1.3
1.1.2 Síntesis IgE	1.5
1.1.2.1 Mecanismos de síntesis dependientes de las células T	1.7
1.1.2.2 Mecanismos de síntesis independientes de las células T	1.11
1.1.3 Regulación de la síntesis de IgE	1.12
1.1.3.1 Regulación por antagonistas de la IL-4	1.12
1.1.3.2 Regulación por autoanticuerpos	1.12
1.1.3.3 Regulación por factores de unión a la IgE	1.13
1.1.3.4 Regulación a través del receptor de baja afinidad FcεR2	1.13
1.1.4 Procesos alterados en las enfermedades alérgicas	1.14
1.1.4.1 Alteraciones a nivel de la presentación de antígeno	1.15
1.1.4.2 Alteraciones a nivel de los linfocitos T	1.16
1.1.4.3 Alteraciones en la regulación mediante autoanticuerpos	1.16
1.1.4.4 Alteraciones en el receptor de baja afinidad	1.17
1.1.5 Células efectoras en las reacciones alérgicas	1.17
1.1.5.1 Mastocitos y basófilos	1.18
1.1.5.2 Eosinófilos	1.19
1.1.5.3 Otras células efectoras	1.20
1.1.6 Los alérgenos	1.20
1.1.6.1 Nomenclatura de los alérgenos	1.23
1.2 EL GRANO DE POLEN: ASPECTOS BOTANICOS	1.23
1.2.1 Morfología del polen de las angiospermas	1.24
1.2.1.1 Aperturas	1.26
1.2.2 Formación del grano de polen de las angiospermas	1.30
1.2.3 Polinización	1.31
1.2.4 Germinación del grano de polen	1.31
1.3 LOS POLENES EN LOS PROCESOS ALERGICOS	1.34
1.3.1 Plantas de interés en alergia	1.35
1.3.2 Los pólenes de las gramíneas	1.35
1.3.2.1 El polen del centeno	1.36

INDICE DE CONTENIDO

1.3.2.2 Aspectos morfológicos y químicos	1.38
1.3.2.3 Deshidratación	1.41
1.3.2.4 Germinación	1.42
1.4 PREPARACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS PARA DIAGNOSTICO Y TERAPIA DE LAS ENFERMEDADES ALERGICAS	1.44
1.4.1 Estandarización de extractos alérgicos	1.46
1.4.1.1 Criterios de la IUIS y de la OMS sobre preparaciones de extractos de referencia de pólenes	1.50

2 OBJETIVOS

3 MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO	3.1
3.1.1 Especificaciones de los pólenes estudiados	3.1
3.2 REACTIVOS EMPLEADOS	3.3
3.3 PREPARACION DE EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO	3.4
3.3.1 Extractos totales (ET)	3.4
3.3.2 Extractos a tiempos parciales	3.5
3.3.3 Extracto sonicado (ES)	3.5
3.3.4 Recuento de pólenes rotos	3.6
3.3.5 Pólenes de Sigma y Allergon	3.6
3.3.6 Pólenes de diferentes lotes de J.A. Jiménez	3.6
3.4 PREPARACION DE EXTRACTOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE PH	3.7
3.4.1 Extracciones con cambios consecutivos de tampón	3.8
3.4.1.1 Pruebas de alergenidad in vitro.	3.9
3.5 TECNICAS ELECTROFORETICAS	3.10
3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de detergente Sodiodecil lauril sulfato (PAGE-SDS)	3.10
3.5.1.1 Tinción de geles con azul de coomassie R-250	3.11
3.5.1.2 Tinción de geles con plata	3.12
3.5.2 Detección de alérgenos mediante inmunoelectrotransferencia	3.12
3.5.3 Isoelectroenfoque	3.15
3.5.3.1 Isoelectroenfoque en presencia de detergente y urea	3.16
3.5.3.2 Inmunodetección de alérgenos	3.17

INDICE DE CONTENIDO

3.6 IDENTIFICACION DE ALERGENOS MEDIANTE LA TECNICA DE "DOT-IMMUNOBINDING"	3.18
3.7 VALORACIONES DE PROTEINA	3.19
3.7.1 Método de Lowry (1951)	3.19
3.7.2 Método de Bradford (1976)	3.20
3.7.3 Método de Warburg y Christian (1942)	3.21
3.7.4 Método de Kalb y Bernlohr (1977)	3.21
3.8 PROCESOS CROMATOGRAFICOS	3.21
3.8.1 Cromatografía de intercambio aniónico	3.21
3.8.2 Cromatografía de exclusión molecular	3.22
3.8.2.1 Purificación de la banda de 48 kDa, a partir del polen de 1987.	3.22
3.8.2.2 Purificación de la banda de 48 kDa a partir de pólenes recolectados en 1991.	3.23
3.8.3 Cromatografía de intercambio catiónico	3.24
3.8.3.1 Muestras del polen de 1987	3.24
3.8.3.2 Extracto de 4 horas en medio ácido del polen de 1991.	3.25
3.9 PRUEBAS DE ALERGENICIDAD IN VIVO	3.25

4 RESULTADOS

4.1 INCUBACIONES EN TAMPON FOSFATO	4.1
4.1.1 Pólenes de J. A. Jiménez, recolectados en 1987	4.1
4.1.1.1 Recuento de pólenes rotos	4.2
4.1.1.2 Liberación de proteínas al medio de incubación	4.3
4.1.1.3 Identificación de alergenicos	4.6
4.1.1.4 Cromatografía de intercambio iónico	4.8
4.1.2 Pólenes de Allergon y Sigma	4.15
4.1.3 Pólenes de J. A. Jiménez recolectados en 1991, 1989 y 1987	4.20
4.1.3.1 Control de roturas de pólenes	4.21
4.1.3.2 Liberación de proteínas y alergenicos	4.23
4.2 INCUBACIONES BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PH	4.31
4.2.1 Estudios realizados con pólenes de 1987	4.32
4.2.1.1 Cambios en el pH del medio inducidos por el polen	4.32
4.2.1.2 Liberación de proteínas	4.32
4.2.1.3 Liberación de alergenicos	4.36
4.2.1.4 Incubaciones con cambios consecutivos de tampón	4.37
4.2.1.5 Isoelectroenfoco de los extractos obtenidos con cambios consecutivos del tampón de incubación.	4.40
4.2.2 Estudios realizados con pólenes del año 1991	4.41
4.2.2.1 Cambios en pH del medio inducidos por el polen	4.42

INDICE DE CONTENIDO

4.2.2.2 Liberación de proteínas	4.42
4.2.2.3 Estudio con cambios consecutivos de tampón	4.44
4.2.2.4 Isoelectroenfoque de las fracciones ácidas, neutras y básicas	4.46
4.3 CARACTERIZACION DE ALERGENOS DEL POLEN DE 1991	4.49
4.3.1 Determinación de pesos moleculares	4.50
4.3.2 Determinación de sus puntos isoeléctricos	4.52
4.4 PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ALERGENOS	4.52
4.4.1 Extractos obtenidos a partir del polen del año 1987	4.54
4.4.1.1 Purificación de la banda de 48 kDa	4.54
4.4.1.2 Comprobación in vivo de la alergenicidad de la banda de 48 kDa	4.56
4.4.1.3 Cromatografía de exclusión molecular a nivel preparativo	4.57
4.4.1.4 Determinación del punto isoeléctrico del componente purificado	4.59
4.4.1.5 Cromatografía de intercambio catiónico	4.60
4.4.2 Purificación de alergenitos a partir del polen de 1991	4.62
4.4.2.1 Purificación de la banda de 48 kDa	4.62
4.4.2.2 Determinación de los puntos isoeléctricos de los componentes de las fracciones cromatográficas	4.64
4.4.2.3 Identificación de alergenitos en las fracciones cromatográficas	4.65
4.4.2.4 Purificación de alergenitos mediante cromatografía de intercambio catiónico	4.66
4.4.2.5 Comprobación de la alergenicidad de las bandas separadas	4.68
4.5 ANALISIS MICROSCOPICO DEL ESTADO DEL POLEN RETENIDO EN LA MUCOSA NASAL	4.70

5 DISCUSION

5.1 COMPORTAMIENTO DEL POLEN DE CENTENO DURANTE LOS PROCESOS DE INCUBACION	5.2
5.1.1 Roturas de pólenes	5.3
5.1.2 Liberación de proteínas	5.5
5.1.2.1 Liberación de proteínas en diferentes medios de incubación	5.8
5.1.3 Liberación de alergenitos	5.11
5.1.4 Cambios de pH inducidos por el polen	5.15
5.2 FACTORES QUE AFECTAN SOBRE LA CALIDAD DEL POLEN	5.17
5.2.1 Proceso de recolección	5.17
5.2.2 Proceso de desecado y conservación del polen	5.19

INDICE DE CONTENIDO

5.3 VALORACION DE PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS DE POLENES . . . 5.22

5.4 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS ALERGENOS DEL
POLEN DEL CENTENO 5.25

6 CONCLUSIONES

A BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

CRIE	Radioinmunolectroforesis cruzada
DO	Densidad óptica
Fc _ε R1	Receptor para IgE de alta afinidad
Fc _ε R2 o CD23	Receptor para IgE de baja afinidad
FPLC	Sistema de cromatografía de alta resolución
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad en humanos
IEF	Isoelectroenfoque
IFN _α	Interferón α
IFN _γ	Interferón γ
IL	Interleucina
UIS	Unión Internacional de Sociedades de Inmunología
IUs	Unidades internacionales de potencia alergénica
Ka	Constante de afinidad
kDa	Kilodalton
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
OMS	Organización mundial de la salud

ABREVIATURAS

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino ($\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM, 150 mM ClNa pH 7.4)
PGE2	Prostaglandina E2
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PNU	Una unidad de nitrógeno = 0.0001 mg de proteína por valoración de nitrógeno)
PRU	Unidades de PhadebaRast
RAST	Prueba del radioalergosorbente
SDS	Sodiododecil sulfato sódico
TBS	Tris ClH 20 mM pH 7.5, 500 mM ClNa
TEMED	N, N, N', N' - tetrametil-etilen-diamina
TGF	Factor de crecimiento transformador
Tris	Tris hidroximetil amino metano
TTBS	TBS con un 0.05 % Tween 20
UO	Unidades ópticas

INTRODUCCION

1.1 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO I. ALERGIA

Los organismos superiores están capacitados para reconocer como propias o no propias a todas las sustancias presentes en su entorno. Cuando alguna de estas sustancias supera las barreras fisicoquímicas protectoras del organismo (piel, membrana mucosa, sistema mucociliar, secreciones etc..) y penetra en su interior, se desencadenan una serie de reacciones muy complejas destinadas a reconocer, neutralizar y eliminar al agente invasor. En estos mecanismos de defensa participan un conjunto de órganos, células y factores solubles que constituyen el sistema inmune. A pesar del papel beneficioso que representan estos procesos defensivos, diversas alteraciones en ellos pueden dar lugar a reacciones adversas para el organismo, produciendo enfermedad e inclusive la muerte del individuo. El nivel al que se produce la alteración es muy variado, dando lugar a diferentes patologías conocidas hoy en día con el nombre general de reacciones de hipersensibilidad o reacciones *inmunoalérgicas*.

En 1968 Gell y Coombs, clasificaron estas enfermedades en cuatro grupos diferentes atendiendo al tipo de proceso que se encontraba alterado. De estos cuatro grupos solo nos ocuparemos de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, por ser la base del presente estudio. En estas reacciones se produce una respuesta elevada de inmunoglobulinas de la clase E contra antígenos (alergenos) inocuos para el individuo. Estas inmunoglobulinas poseen la capacidad de permanecer unidas a receptores específicos, expuestos sobre la membrana de diversas células efectoras del sistema inmune. Al contacto con

INTRODUCCION

el antígeno las IgEs se entrecruzan transmitiendo a la célula una señal que induce la liberación de potentes mediadores los cuales provocan, de forma inmediata, una reacción inflamatoria aguda. A los síntomas clínicos de esta reacción se les ha denominado de forma global, atopia e incluyen asma, eczema, fiebre de heno, urticaria e inclusive, en determinadas circunstancias anafilaxia. Por las características de los síntomas que producen, las reacciones de hipersensibilidad de tipo I son también conocidas como reacciones anafilácticas o como reacciones de hipersensibilidad inmediata. A veces se presenta una sintomatología inflamatoria secundaria, posterior a la inmediata conocida como fase tardía de la respuesta alérgica. Los mediadores y células implicadas en estas reacciones no están muy bien caracterizados por el momento.

Históricamente se han descrito cuadros clínicos de este tipo de enfermedad desde la antigüedad, pero la primera asociación de ésta con la exposición a un determinado antígeno se llevó a cabo en 1873 cuando se demostró que los pólenes de las gramíneas eran los responsables de la enfermedad conocida como "fiebre del heno" (Blackey, 1873), aunque un año antes Wyman ya había implicado al polen de la ambrosía en la aparición de los catarros otoñales. La naturaleza inmunológica de esta patología fue puesta de manifiesto, por primera vez, en 1906 (Von Pirquet) que introdujo el termino de "alergia" refiriéndose al concepto de reactividad cambiada en la respuesta del huésped, al entrar en contacto por segunda vez o sucesivas con un "agente". Bajo la denominación de alergia se fueron englobando las diferentes reacciones de hipersensibilidad que se iban conociendo. Hoy en día existe confusión con la denominación, pero se tiende a asociar el nombre

de alergia con las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, por lo que en este trabajo se utilizarán indistintamente ambos términos.

En 1921 Prausnitz y Künster demostraron la existencia de una respuesta humoral específica en las reacciones alérgicas, descubriendo la presencia de una sustancia que ellos denominaron "reaginina" en el suero de los pacientes que padecían la enfermedad. Las características moleculares de esta sustancia han sido muy estudiadas durante un largo periodo (Stanworth, 1963). Inicialmente fue clasificada como una subclase de la IgA (revisado por Sehon y Gyenes, 1971), pero gracias a los trabajos de Ishizaka *et al* (1966 a, 1966b y 1967), a los de Johansson y Bennich (1967) y a los de Stanworth *et al* (1968), se pudo determinar que las reagininas eran en realidad una nueva clase de inmunoglobulina a la que se le denominó IgE. Posteriormente el grupo de Ishizaka describió que los niveles de IgE en los pacientes alérgicos se encontraban aumentados con respecto al resto de la población no alérgica, siendo desde entonces objetivo de estudio los mecanismos de producción y regulación de esta inmunoglobulina. (Yodoy e Isizaka, 1979 y 1980; Yodoy *et al*, 1979 y 1980; Hirashima *et al*, 1980; Ishizaka 1985)

1.1.1 La inmunoglobulina E

Al igual que otras inmunoglobulinas, la IgE es una glicoproteína tetramérica compuesta por dos cadenas pesadas y dos ligeras idénticas entre sí. Las cadenas ligeras son de tipo κ o λ con características químicas idénticas a las de otros anticuerpos.

Las cadenas pesadas (cadenas épsilon), contienen los determinantes isotípicos de esta clase de inmunoglobulina. Están formadas por una región variable de 110 aminoácidos y una región constante de 440 residuos. Se ha

INTRODUCCION

descrito que en estas cadenas existen 15 cisteínas, 10 de las cuales están implicadas en la formación de 5 puentes intracatenarios. Cuatro de ellos se localizan en la región constante formando cuatro "loops" peptídicos denominados dominios C 1, C 2, C 3 y C 4 y el quinto en la región variable. En el dominio C 1 hay un puente disulfuro extra, que implica a otras dos cisteínas. De los otros tres aminoácidos azufrados, dos forman puentes de unión con la otra cadena pesada y el restante con la ligera (Bennich y Von Bahr-Lindstron, 1974).

El peso molecular de una molécula de IgE es de 190 kDa, correspondiendo un 12% del peso a carbohidratos, lo cual es una característica molecular diferente del resto de las inmunoglobulinas.

La propiedad más importante de la IgE, es su capacidad para unirse de forma reversible a receptores específicos expuestos sobre las superficies celulares de diversas células efectoras, induciendo los síntomas de la alergia. Dos son los tipos de receptores a los que esta molécula puede unirse: los receptores de alta afinidad ($Fc_{\epsilon}R1$, $K_a = 10^{-9}$ M), expuestos sobre las membranas de los mastocitos y de los basófilos (Metzger, 1991; Metzger y Kinet, 1989) y los receptores de baja afinidad ($Fc_{\epsilon}R2$ o CD23, $K_a = 10^{-7}$ a 10^{-8}) que se encuentran sobre las superficies celulares de los linfocitos B, monocitos, macrófagos, eosinófilos y plaquetas (Delespesse *et al*, 1990).

Los primeros experimentos para determinar la zona de la molécula que se unía al receptor, demostraron que ésta se producía en ambos a través del fragmento (Ishizaka *et al*, 1970). Hoy en día se sabe que las secuencias de aminoácidos implicadas en la unión a los dos tipos de receptores, son diferentes. La región de la molécula que se une al receptor de alta afinidad,

ha sido identificada muy recientemente, mediante técnicas de DNA recombinante (Geha *et al*, 1985; Ishizaka *et al*, 1986; y Helm *et al*, 1988). Los datos experimentales indican que esta región es una secuencia de 76 aminoácidos, desde Gln-301 a Arg-376, situada entre los dominios C 2 y C 3. No se conoce con tanta exactitud la porción molecular responsable de la unión al receptor de baja afinidad, pero se sabe que se sitúa en la zona de unión de los dominios C 3 y C 4.

1.1.2 Síntesis IgE

El conocimiento de los mecanismos de síntesis de la IgE así como su regulación en los individuos sanos, permitirá conocer las alteraciones que se producen en las personas alérgicas y diseñar la terapia adecuada para evitar la enfermedad.

Durante los últimos años, este tema de estudio ha sido prioritario para muchos laboratorios, disponiéndose hoy en día de resultados experimentales que han permitido conocer algunos aspectos de la síntesis de IgE y su regulación. Los trabajos más interesantes en este campo han sido revisados recientemente por varios autores (Zubler *et al*, 1987; Snapper *et al*, 1988; Coffman *et al*, 1988; Mosmann y Coffman, 1989; Ishizaka, 1989; Vercelli y Geha, 1989; Esser y Radbruch, 1990; Romagnani y Ricci, 1990; Romagnani, 1990; Finkelman *et al*, 1990; Ricci y Rossi, 1990; Heusser *et al*, 1991).

De estos estudios se concluye que existen procesos comunes a la síntesis de las demás inmunoglobulinas y otros específicos para la clase en estudio. También se ha observado que existe gran dificultad de inducir experimentalmente, una síntesis mantenida de IgE. Aunque se ha observado que en la inmunización de animales se produce una respuesta de IgE

INTRODUCCION

paralelamente a la síntesis de IgG, esta respuesta es transitoria desapareciendo a las 3-4 semanas, sin ser estimulada nuevamente en sucesivas inoculaciones del antígeno. Solamente se puede obtener una respuesta mantenida en animales genéticamente predispuestos para ello, inmunizados con dosis muy pequeñas de un potente inmunógeno y con el apropiado adyuvante.

Todas las inmunoglobulinas son sintetizadas por células plasmáticas, procedentes de la diferenciación de linfocitos B. Los genes que codifican las cadenas ligeras del tipo κ se localizan en el cromosoma 2 y las de tipo λ en el 22 y son los mismos para todas las clases. Los genes para los distintos isotipos de las cadenas pesadas se encuentran localizados en el cromosoma 14, activándose unos u otros en función de las señales recibidas por la célula.

Experimentalmente se ha observado que el linfocito B se transforma y prolifera convirtiéndose en célula secretora de IgE mediante dos tipos de estímulos. La primera señal la recibe la célula a través de un contacto físico con un linfocito T colaborador (Claman *et al*, 1966; Davies *et al*, 1967; Vercelli *et al*, 1989). La segunda se produce cuando interacciona con la interleucina 4 (IL-4), (Bergstedt-Lindquist *et al*, 1988; Del Petre *et al*, 1988; Pene *et al*, 1988; Finkelman *et al*, 1988).

A pesar de que este mecanismo de inducción de síntesis de IgE es aceptado de manera general, nuevas investigaciones sugieren que no es éste el único, existiendo vías de síntesis independientes de las células T (Brown *et al*, 1987; Wodnar-Filipowicz *et al*, 1989; Gordon *et al*, 1990; Sarfati *et al*, 1989) otras independientes de la IL-4 (Heusser *et al*, 1989; Smith *et al*, 1990) e incluso existen evidencias experimentales que indican que los linfocitos B

pueden espontáneamente convertirse en células secretoras de esta clase de inmunoglobulina (Sarfati *et al*, 1984; Delespesse *et al*, 1989 a).

1.1.2.1 Mecanismos de síntesis dependientes de las células T

Se han descrito dos posibles tipos de contactos entre las células B y las T que dan como resultado la inducción de la síntesis de la inmunoglobulina E:

a) El contacto afín, producido entre un receptor de membrana del linfocito T, altamente específico para el antígeno y péptidos de éste último expuestos, en asociación con una proteína de la clase II del MHC, sobre la superficie celular del linfocito B. Este tipo de interacción es común para todos los procesos de inducción de una respuesta inmune humoral y provocan la activación del linfocito. La señal específica para el cambio de clase depende de los mediadores liberados por la célula T que participó en el contacto. Las células T inductoras de la síntesis de IgE son secretoras, entre otros mediadores, de interleucina 4 (Mitchison, 1977; Vitteta *et al*, 1989; Ziegler, 1981)

b) El contacto no afín, en el que la unión de la célula T con el linfocito B se produce a través de un receptor desconocido, quizás relacionado con el antígeno CD40. Aunque este mecanismo no está todavía bien estudiado, se sabe que este tipo de unión se lleva a cabo de forma inespecífica e independiente de la restricción genética (Parronchi *et al*, 1990; Jabara *et al*, 1990).

Cuando el contacto entre los linfocitos es de tipo afín se producen IgEs altamente específicas para el antígeno, mientras que sí el contacto es no afín

INTRODUCCION

se induce una síntesis de IgE policlonal. Esta última forma de inducción se produce en reacciones alérgicas intensas y en parasitosis.

1.1.2.1.1 Síntesis mediante contacto afín

En este tipo de síntesis, es necesario que el antígeno haya sido previamente procesado tanto por el linfocito B que va a ser estimulado, como por las células presentadoras de antígeno que van a activar al linfocito T implicado en el contacto.

Los antígenos son fagocitados por las células presentadoras de antígeno e internalizados en unas vacuolas digestivas donde se fragmentan adecuadamente. Seguidamente los fragmentos son procesados en el interior vacuolar para que puedan asociarse a una molécula del MHC de la clase II y ser expuestos, asociados, sobre la superficie de la célula. Esta unión es posible que se produzca en la misma vacuola digestiva, ya que existen datos experimentales en los que se describe la presencia de la proteína del MHC en la membrana vacuolar (Ziegler y Unanue, 1982; Unanue, 1984; Creswell, 1985; Monaco, 1992.). Tras la asociación, la vacuola se fusiona con la membrana citoplasmática, dejándoles expuestos sobre la superficie celular. El reconocimiento del antígeno por la célula T sobre la célula presentadora de antígeno, se lleva a cabo a través de un receptor específico (TCR), en unión con un complejo proteico formado por cinco proteínas (conocido como CD3) y con otros antígenos de membrana como el CD4, que reconoce la molécula de la clase II. Dentro del receptor existe una zona similar a la zona variable de las inmunoglobulinas, con capacidad para reconocer específicamente al antígeno (fig 1.1). Una vez producida la unión y con intervención de la interleucina 1, se produce la activación y la proliferación de clones de células

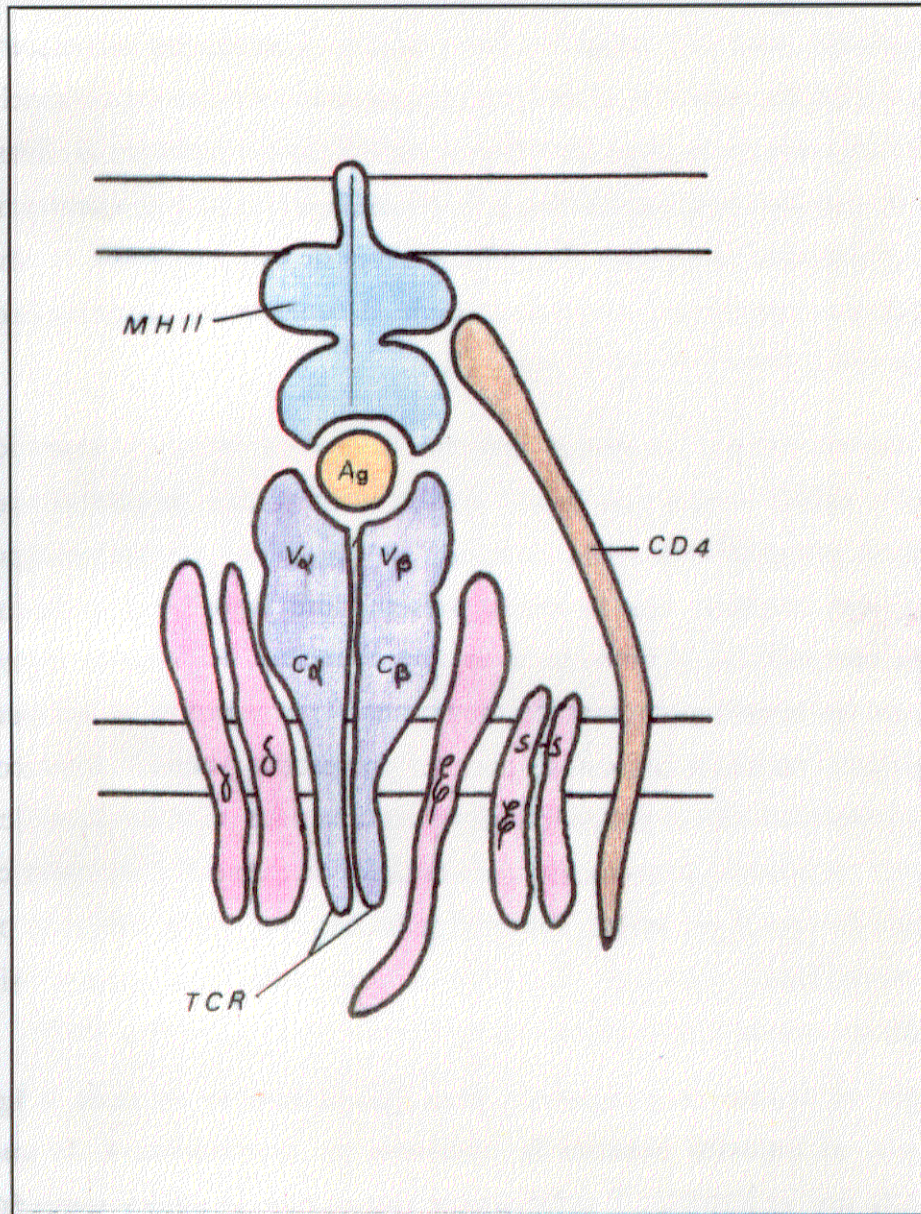


Figura 1.1

Reconocimiento específico de un fragmento del antígeno, expuesto en asociación al MHC II sobre la membrana de la célula presentadora de antígeno, a través del receptor TCR del linfocito T, de las proteínas asociadas del CD3 y del CD4.

INTRODUCCION

T específicos para ese antígeno. Estas células T activadas reconocerán, a través del mismo receptor, al antígeno fragmentado y expuesto en asociación con la molécula de la clase II, sobre la superficie del linfocito B. Tras esta unión se produce la estimulación, y la célula B prolifera y se transforma en célula plasmática secretora. Si la célula T no estuviera activada, la unión a través de este mecanismo induciría su activación, actuando por tanto la célula B como célula presentadora de antígeno.

El mecanismo por el que el linfocito B expone sobre su superficie al antígeno, difiere con el que llevan a cabo otras células presentadoras. La diferencia principal está en la captación del antígeno por ambos tipos de células. Así, mientras que la célula presentadora fagocita al antígeno de manera inespecífica, el linfocito B se une al mismo de manera específica mediante las inmunoglobulinas de membrana. Tras la unión, el antígeno es internalizado mediante pinocitosis para ser procesado. Análogamente con las células presentadoras, el antígeno es fragmentado y los péptidos modificados, mediante un proceso desconocido, para dotarles de capacidad de unión con la molécula de tipo II del MHC. También se ha descrito que el antígeno puede ser internalizado por el linfocito B mediante endósmosis si las concentraciones de éste son elevadas en su entorno (Vitetta *et al* 1989).

Según se expuso anteriormente, para que el cambio de clase a IgE se produzca, el linfocito necesita la presencia de interleucina 4, la cual es secretada por el linfocito T colaborador con el que se unió y también por algunos monocitos y mastocitos.

Se ha determinado, mediante cultivos de linfocitos *in vitro* que el periodo de tiempo transcurrido desde el contacto físico hasta obtenerse una

producción óptima de IgE es de 10 días, teniendo que permanecer la interleucina 4 en el medio al menos 6 días. Este resultado permite especular que una célula T estimularía al linfocito B y otras células lejanas al lugar de contacto, también podrían inducir el cambio de clase a través de la IL-4 (Heusser, 1990).

Otro descubrimiento importante es que, al menos en ratón, el linfocito T es incapaz de producir IL-4 si no existe un contacto previo con la IL-2 y con la propia IL-4 aportada por otro tipo de células (Romagnani, 1991).

1.1.2.2 Mecanismos de síntesis independientes de las células T

Resultados experimentales han puesto de manifiesto que los mastocitos, activados a través del receptor de IgE, son capaces de liberar las mismas interleucinas que producen las células T colaboradoras para la producción de IgE, induciendo de nuevo la formación de este tipo de inmunoglobulina. Esta vía de síntesis representa un círculo vicioso en el mantenimiento de la respuesta alérgica. Por otra parte, se ha observado que las células de bazo No-B-No-T (NBNT) son productoras de IL-4 contribuyendo al mismo proceso. También podrían estar implicadas en la estimulación del linfocito T nativo para convertirlo en linfocito T productor de IL-4 (Ben-Sasson, 1990)

La secreción de IgE por las células B pueden también ser inducidas por monocitos en presencia de IL-4 e hidrocortisona. Este tipo de inducción parece que requiere un contacto físico entre las células implicadas, pero por el momento se desconoce el proceso (Sarfati *et al* 1989).

1.1.3 Regulación de la síntesis de IgE

1.1.3.1 Regulación por antagonistas de la IL-4

Se ha descrito que $IFN\gamma$, $INF\alpha$, TGF, y PGE2 son las sustancias que antagonizan la acción de la IL-4, siendo responsables de la inhibición de la síntesis de IgE inducida por esta interleucina (Pene, 1988). En esta modulación también se regula la expresión del receptor $Fc\epsilon R2$, al cual se le atribuye un papel regulador de los niveles de IgE (Delespesse, 1989 b).

Recientes descubrimientos en el modelo murino, atribuyen la secreción de las diferentes citocinas reguladoras de la IgE a diferentes tipos de células T colaboradoras. En estos modelos se define como célula Th1 aquellas productoras de IL-2 y/o $INF\gamma$ y como célula Th2 a aquellas que producen IL-4, IL-5 e IL-6. La proporción de Th1 frente a Th2 se interpreta como el mecanismo regulador de la síntesis de la IgE. Parece ser que un mecanismo regulador equivalente existiría también en humanos. Ultimamente se ha descrito la existencia de un tercer tipo de célula T colaboradora, a la cual se ha llamado Th0. En esta población de células T la secreción de interleucinas estaría solapada con las otras dos poblaciones, produciendo IL-4 e $IFN\gamma$ (Killar, 1987; Romagnani, 1990a y 1991a).

1.1.3.2 Regulación por autoanticuerpos

Recientemente se ha descrito la existencia de auto-anticuerpos dirigidos contra la IgE, que regularían los niveles de este tipo de inmunoglobulina en el individuo.

En este modelo se propone que la respuesta primaria del sistema inmune a la presencia del alérgeno estaría controlada por el repertorio de células T sin diferencias significativas entre los individuos atópicos y los no atópicos. La producción de IgE y de otros isotipos, induciría la producción de autoanticuerpos anti-idiotipo, iniciando una respuesta autoinmune reguladora de los niveles de inmunoglobulina sintetizada. Se han descrito diferentes tipos de autoanticuerpos, unos considerados como anafilactogénicos provocarían el entrecruzamiento de las IgEs y conducirían a la liberación de mediadores inflamatorios, otros regularían los niveles de IgE por diversos mecanismos (Stadler, 1991).

1.1.3.3 Regulación por factores de unión a la IgE

Ishizaka *et al* (1983), han descrito la existencia en el ratón de un mecanismo de regulación en el que un grupo de células T (aquellas con marcadores de superficie W3/25), liberan dos tipos de factores solubles con capacidad de unión a la IgE. Unos de ellos activarían la síntesis y otros la inhibirían. Aunque se han realizado muchos estudios sobre este mecanismo no se ha encontrado en el hombre ningún proceso equivalente.

1.1.3.4 Regulación a través del receptor de baja afinidad $Fc_{\epsilon}R2$

El receptor de baja afinidad ($Fc_{\epsilon}R2$) existe como dos formas moleculares diferentes las cuales difieren en su porción citoplasmática: el $Fc_{\epsilon}R2a$, expuesto sobre los linfocitos B y el $Fc_{\epsilon}R2b$ sobre monocitos, macrófagos, plaquetas eosinófilos así como sobre los linfocitos B.

INTRODUCCION

El receptor $Fc_{\epsilon}R2a$ se presenta sobre la superficie celular de los linfocitos B desempeñando un papel regulador de la síntesis de IgE. Este receptor solo se expone sobre linfocitos B maduros, no diferenciados a células plasmáticas, que expresen IgM o IgD sobre su superficie. En estas circunstancias el receptor posee capacidad para captar complejos inmunes de IgE, produciéndose un entrecruzamiento de los receptores que parece impedir la activación y diferenciación de esas células y por lo tanto la síntesis de IgE. (Safarti y Delespesse, 1988; Delespesse *et al.*, 1989 c; Mac Donald, 1991)

Además de la multifuncionalidad del receptor de baja afinidad sobre las membranas celulares, el $Fc_{\epsilon}R2$ puede ser separado de éstas mediante un proceso enzimático, convirtiéndose en una proteína soluble con una función de inducción de síntesis de IgE opuesta por tanto a su función sobre la membrana. Cuando la IgE se encuentra aumentada se une al receptor impidiendo la acción enzimática y consecuentemente se inhibe la inducción de la síntesis (Delespesse, 1989 b; Romagnani y Ricci 1990).

Aunque en un principio se trató de asociar los factores solubles descritos por Ishizaka *et al.* (1983) con el receptor de baja afinidad, se ha podido comprobar que son moléculas diferentes (Ishizaka 1989).

1.1.4 Procesos alterados en las enfermedades alérgicas

Paralelamente a los estudios de los mecanismos reguladores de la síntesis de IgE, se han estudiado las posibles alteraciones que se producen en ellos dando lugar a la aparición de los niveles elevados de esta inmunoglobulina en los individuos alérgicos. Al igual que en los mecanismos reguladores, los conocimientos actuales son todavía incompletos y solo se pueden describir conclusiones e hipótesis derivadas de resultados experimentales aislados. Las

evidencias sugieren que las alteraciones pueden ser múltiples, que se producen a diferentes niveles del proceso de la síntesis de IgE, que tienen una base genética y que varias asociaciones entre ellas darán lugar al fenotipo alérgico.

A continuación se describen las principales alteraciones propuestas como responsables de la alergia.

1.1.4.1 Alteraciones a nivel de la presentación de antígeno

Inicialmente se ha tratado de asociar la respuesta anómala contra los alérgenos, con la existencia de alguna característica química común a todos ellos que permitiera un reconocimiento y una presentación selectiva del antígeno. A pesar de los análisis moleculares realizados, no se ha podido demostrar hasta ahora que esta asociación química exista. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que en los individuos alérgicos, las células presentadoras de antígeno poseen unas peculiares moléculas de la clase II, las cuales se unirían preferencialmente a determinados péptidos de las moléculas alérgicas (Marsh, 1982). De esta forma estos péptidos son expuestos sobre las células dendríticas en mayor proporción que el resto de los péptidos procesados y son reconocidos más fácilmente por el receptor específico de las células T, favoreciéndose la aparición de unos niveles altos de IgE específica contra ellos. En este sentido se han descrito asociaciones significativas entre tipos particulares de HLA y respuestas inmunes específicas contra diferentes alérgenos altamente purificados. Así, los pacientes con HLA DR2/DW2 responden contra todos los homólogos del antígeno ambrosía V (Marsh *et al*, 1989) y los DR3/DW3 tienen una respuesta preferente contra *Lolium p I, II y III* (Ansari *et al* 1989 a). Estudios más sofisticados asocian la respuesta contra

INTRODUCCION

los alergenos del lolium pIII a la presencia de una secuencia de aminoácidos (gly-tyr-ser-thr-ser), conocida como EYSTS, en la primera región polimórfica de las cadenas polipeptídicas DR β I del DR3, DR5 y DRW6 (Ansari *et al* 1989 b). Estos resultados sugieren que al igual que la secuencia EYSTS es importante en la presentación del antígeno Lolium pIII, otras secuencias podrían estar implicadas en la presentación de otros epítomos.

1.1.4.2 Alteraciones a nivel de los linfocitos T

Se ha descrito que la hiperproducción de IgE podría estar relacionada con un progresivo desarrollo en favor de los clones del tipo Th2, los cuales producirían mucha IL-4 y muy poco o nada IFN γ , favoreciendo la colaboración Th2-B y aumentando por lo tanto la síntesis de IgE.

Esta teoría se basa en las observaciones de la composición de las células T de los infiltrados conjuntivales de los pacientes con conjuntivitis vernal. Se encontró que todas ellas eran CD4+ y funcionalmente eran secretoras de IL-4 e IL-5 pero no de IFN γ Romagnani (1991 b).

Sobre la base de los conocimientos actuales se ha asumido que en los atópicos las condiciones que favorecen la expansión de clones Th2 debe contemplarse tanto a nivel de las interacciones célula presentadora-alergeno-célula T como a nivel de las citocinas que intervienen en la maduración de las células T, (IL-4, IFN γ , IL1-0/CSIF y otras)

1.1.4.3 Alteraciones en la regulación mediante autoanticuerpos

Según el modelo de regulación de la síntesis de IgE mediante autoanticuerpos, en los individuos atópicos se habría perdido la capacidad de

síntetizar los autoanticuerpos beneficiosos, sintetizando aquellos anafilactogénicos y permitiendo que un grupo de células B secretoras de IgE escapen de esta regulación, y la inmunoglobulina sea sintetizada a niveles elevados sensibilizando a los mastocitos y basófilos. Un nuevo contacto con el alérgeno en el individuo atópico agravaría la situación (Stadler, 1991).

1.1.4.4 Alteraciones en el receptor de baja afinidad

Se ha descrito que los pacientes alérgicos expresan en exceso, sobre las células B y sobre los monocitos, el receptor de baja afinidad de tipo $Fc\epsilon R2b$. También se encuentra elevado y en relación directa con los niveles de IgE el receptor en forma soluble. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en estas circunstancias se favorece la síntesis de IgE. Por otra parte, el aumento de expresión del receptor es reflejo de un desequilibrio en la producción de IL-4 e $IFN\gamma$ (Delespesse, 1989 b).

1.1.5 Células efectoras en las reacciones alérgicas

La IgE liberada por la célula plasmática tiene capacidad para unirse a los receptores de membrana de alta y baja afinidad expuestos sobre los diferentes tipos de células efectoras, iniciándose una cascada de sucesos que conducen a las manifestaciones clínicas de la alergia. Los receptores de alta afinidad se encuentran expuestos sobre la superficie de la membrana celular de mastocitos y basófilos, y los de baja afinidad sobre monocitos, macrófagos, plaquetas y eosinófilos, así como sobre los linfocitos B.

INTRODUCCION

1.1.5.1 Mastocitos y basófilos

Los síntomas clínicos en los procesos alérgicos e inflamatorios son inducidos por potentes mediadores químicos liberados, en su gran mayoría, por los mastocitos y los basófilos. Ambos tipos de células presentan numerosas características morfológicas y funcionales en común.

Cuando una IgE se une a un receptor de alta afinidad ($Fc_\epsilon R1$) del mastocito o del basófilo, se dice que estas células se encuentran sensibilizadas. Si en estas condiciones se les expone a la presencia de un antígeno multivalente, se produce la unión de dos IgEs a través del antígeno y se entrecruzan los receptores de membrana (Ishizaka, 1977; Segal, 1977; Ishizaka, 1984). Como consecuencia del entrecruzamiento se producen una serie de transformaciones bioquímicas y ultraestructurales de las membranas celulares (Ishizaka, 1979, 1980, 1981, 1982, 1984; Lichenstein y Margolis 1968; Winslow y Austen, 1984) que favorecen su fusión con las membranas de los gránulos citoplasmáticos, liberando al exterior los mediadores químicos que contienen (Ho y Orange, 1978; Kennerly *et al.*, 1979). Dentro de éstos se incluyen histamina, proteasas, proteoglicanos y factores quimiotácticos. Tras el estímulo antigénico también se produce la activación de diversas enzimas y se liberan productos metabólicos resultantes de la acción de éstas sobre los lípidos de la membrana celular a través de la ruta del ácido araquidónico. Si este ácido es metabolizado a través de una cicloxigenasa se liberarán prostaglandinas y tromboxano A₂, mientras que si se realiza a través de una lipoxigenasa se liberarán leucotrienos. Estos procesos se conocen como degranulación anafiláctica o exocitosis, y pueden ser también inducidos por una gran variedad de agentes no específicos inmunológicamente tales como

fragmentos del complemento, neuropéptidos, neurotransmisores, citokinas, lectinas, etc.. (Adelman, 1991).

A pesar de las similitudes, existen diferencias claras entre el mastocito y el basófilo a nivel morfológico, funcional e incluso en los productos liberados.

Respecto a su origen biológico, ambos tipos de células se originan en la médula ósea, pero mientras que los basófilos maduran en ella pasando posteriormente al sistema circulatorio, los mastocitos maduran en el tejido conjuntivo y en las cavidades serosas, donde permanecen una vez maduros. Mediante microscopía electrónica se han podido detectar diferencias morfológicas entre estos dos tipos de células, no detectables a nivel óptico. Estas diferencias afectan a tamaño, forma, aspecto y disposición del núcleo y contenido granular. Por otra parte, se ha descrito una variabilidad morfológica de los mastocitos dependiente del microentorno en el que se localice, propiedad que no poseen los basófilos. Con respecto a liberación de mediadores, las diferencias son cuantitativas a excepción de las prostanglandinas 2, que no son sintetizadas por los basófilos (Gleich, 1991).

1.1.5.2 Eosinófilos

Estas células se encuentran en proporciones muy aumentadas durante los procesos alérgicos, en las zonas de contacto con el antígeno. Esto es debido, entre otras causas, a que durante la hiperproducción de IgE se liberan IL-5 en altas proporciones por el linfocito Th2, estimulando la diferenciación de eosinófilos y atrayéndoles al lugar de la reacción. También son atraídos por diversos factores quimiotácticos liberados por los mastocitos y los basófilos.

INTRODUCCION

Su papel efector consiste en liberar, tras su estimulación, el contenido de sus gránulos, destinados a destruir dianas grandes no fagocitables (los parásitos por ejemplo). Estas sustancias liberadas contienen proteínas que inactivan la histamina y otras sustancias liberadas por los mastocitos y basófilos, por lo que se le ha asignado un papel amortiguador de la inflamación. Se ha demostrado recientemente que el eosinófilo también libera una proteína (proteína básica principal), la cual daña claramente el epitelio pulmonar, por lo que la función efectora de esta célula representa para el individuo alérgico un daño más que un beneficio (Gleich, 1991).

1.1.5.3 Otras células efectoras

El receptor de baja afinidad expresado sobre monocitos, macrófagos y plaquetas se encuentra implicado en los mecanismos de citotoxicidad mediados por IgE, en la liberación de mediadores y en la fagocitosis de partículas unidas a IgE. También es capaz de unir complejos IgE-alergeno sobre algunas de estas células siendo después internalizado el complejo y el alergeno procesado para ser presentado a la célula T. Este mecanismo es por lo tanto selectivo para la presentación del alergeno y puede representar una potenciación de la respuesta de IgE específica para ese antígeno (Ballou, 1991).

1.1.6 Los alergenos

Se conoce con el nombre de alergenos a aquellas sustancias antigénicas capaces de inducir la síntesis mantenida de IgE y de unirse a ella provocando una reacción alérgica. Resultados experimentales han puesto de manifiesto que todas las sustancias antigénicas para un individuo pueden potencialmente

provocar una respuesta de IgE si se exponen al sistema inmune de forma apropiada. Se ha comprobado que son factores determinantes para que esto se produzca las características genéticas del individuo, bajas dosis de exposición al antígeno y la ruta de entrada en el organismo (Marsh *et al*, 1972; Levine *et al*, 1973; Marsh, 1975).

Las sustancias identificadas como alergenios proceden de muy diversas fuentes tales como hongos, pólenes, ácaros, alimentos, insectos, epitelios, heces, venenos, bacterias, invertebrados marinos etc.. y representan un pequeño porcentaje del total de sus componentes (Baldo y Donovan, 1988).

Ante la gran variedad de moléculas alergénicas que existen en la naturaleza, surge la necesidad de conocer sus características fisicoquímicas, para analizar si existen características comunes a todas ellas que sean responsables de la aparición de la enfermedad. Uno de los objetivos actuales es la identificación de la parte de la molécula implicada en la reacción (determinante alergénico), hecho que permitirá saber si existen determinantes alergénicos comunes a varios alergenios de distintas fuentes, si solo son comunes entre los alergenios de una misma fuente, si cada alergenio posee sus propios determinantes y si la porción molecular del alergenio es a su vez un determinante antigénico. Así mismo permitirá conocer la forma en que la molécula interacciona con el sistema inmune, abriendo nuevas posibilidades en la terapia de la enfermedad. Todos estos estudios requieren que los alergenios sean previamente purificados y bioquímicamente caracterizados.

Hasta el momento se han aislado y caracterizado algunos alergenios, aunque todavía son insuficientes. La recopilación de datos experimentales y

INTRODUCCION

revisiones de diferentes autores, (King, 1976; Marsh, 1975; Marsh *et al*, 1987; Lowenstein H., 1983; Baldo y Donovan, 1988; Baer *et al*, 1988) permite afirmar que los alergenos son en su gran mayoría proteínas, algunas de ellas glicosiladas, con pesos moleculares comprendidos entre 5 y 70 kDa, con una mayor proporción de aquellas con masa molar entre 20 y 45 kDa. Esta característica física de los alergenos está de acuerdo con el hecho de que las mucosas poseen una permeabilidad restringida para las moléculas de gran tamaño.

Con respecto a su carga, la mayor parte de ellos poseen un punto isoeléctrico ácido (entre 3 y 6) o básico (entre 8 y 11), existiendo tan solo un pequeño porcentaje neutro. Muchos alergenos poseen características fisicoquímicas e inmunológicas idénticas difiriendo solamente en su punto isoeléctrico. Estas diferencias pueden deberse al grado de glicosilación que posean, aunque también se ha descrito que las diferencias entre estos alergenos puede residir en el grado de amidación o bien ser diferentes variantes genéticas. Al conjunto de alergenos estructuralmente relacionados se les denomina isoalergenos (Johnsson y Marsh, 1965). También se han estudiado las funciones biológicas de algunos alergenos purificados para detectar si éstas guardaban relación con la alergenicidad de las moléculas pero se han encontrado que poseen muy diversas funciones, muchos de ellos poseen actividad enzimática (fosfolipasas, esterases, amilasas, proteasas, celulasa...etc) otros son proteínas transportadoras, citocromos etc (Hubscher y Eisen, 1972; Stewart *et al*, 1990).

Con el fin de establecer de entre todos los alergenos aquellos de mayor interés se ha definido como alergeno mayoritario a toda sustancia que al menos el 50% de los pacientes sensibles al extracto en el que se encuentran,

poseen IgE específica contra él, reaccionando positivamente si se produce el contacto (Lowenstein, 1978; Weeke, 1973).

1.1.6.1 Nomenclatura de los alergenos

Durante los últimos 20 años se han ido purificando y caracterizando bioquímicamente alergenos de muy diferentes fuentes, recibiendo denominaciones muy variadas lo cual ha creado un cierto confusionismo. Con objeto de clarificar esta situación la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) ha creado un subcomité para desarrollar un sistema de nomenclatura (Marsh *et al*, 1986; Marsh *et al*, 1987). Se propone designar a los alergenos por las tres primeras letras del genero de la fuente de procedencia del alergeno, seguido de la primera letra de la especie y de un número romano que indica el orden en el tiempo de purificación del alergeno. En el caso de denominar a un alergeno no purificado, pero bioquímicamente caracterizado, la denominación es la misma, a excepción del número de orden. Dicha numeración se refiere a su movilidad anódica, si la caracterización se hizo mediante inmunoelectroforesis cruzada, empezando por el alergeno de mayor movilidad. Si la identificación se hizo mediante SDS-PAGE o isoelectroenfoque, la nomenclatura es igual pero cambiando el número de orden o movilidad por el PI y/o el PM (en kilodaltons) de la banda (Bd).

1.2 EL GRANO DE POLEN: ASPECTOS BOTANICOS

En los ciclos ontogénicos de los animales y de algunas algas, las únicas células haploides son los gametos; sin embargo, la gran mayoría de las plantas poseen un ciclo de vida basado en una alternancia de una fase haploide y otra

INTRODUCCION

diploide. El individuo diploide (esporofito) no forma gametos sino esporas, las cuales son células con dotación haploide pero sin capacidad de fertilización. Estas células se dividen mitóticamente dando lugar a una estructura haploide (el gametofito) en la cual se producirá el gameto.

El gametofito y el esporofito pueden ser dos entidades independientes o pueden estar unidos en un mismo individuo (gametofito sobre esporofito o viceversa). En las plantas más primitivas, como los musgos, el gametofito es una estructura perenne compuesta por miles de células, mientras que el esporofito es una estructura temporal formada por solo unos cientos de células las cuales viven y se nutren del gametofito. A medida que se asciende en la escala evolutiva, el gametofito disminuye en tamaño y en número de células, mientras que el esporofito aumenta en tamaño y en complejidad anatómica.

El grano de polen es el gametofito masculino de los espermatofitos (angiospermas y gimnospermas), representando por tanto la generación asexual de este tipo de plantas. La naturaleza del grano del polen es la de una microspora que ha perdido su capacidad de germinar por sí sola para dar lugar a la formación de una planta autónoma.

1.2.1 Morfología del polen de las angiospermas

El polen de las angiospermas está formado por tres capas principales concéntricas.

La capa central: formada por la célula vegetativa con un citoplasma sin significación especial. Esta célula es en principio unicelular y haploide, por haber sufrido una división reduccional. Poco después sufre una división nuclear, sin membranas divisorias, que dará lugar a la aparición de dos

núcleos diferentes: el núcleo vegetativo y el generativo. Dependiendo de la especie a la que pertenezca, éste último puede encontrarse dividido en dos (núcleos espermáticos) antes de ser liberado a la atmósfera, o bien dividirse posteriormente durante la emisión del tubo polínico.

La capa media: es la intina, que envuelve a la célula polínica en su totalidad, de una manera aparentemente uniforme. Su composición química es confusa ya que aunque es totalmente aceptada su composición celulósica, hay discrepancias en cuanto al porcentaje (Sittle, 1960; Brooks y Shaw, 1968). También se han descrito como componentes de la intina determinadas sustancias pécticas, calosa, polisacáridos y proteínas algunas de ellas con función enzimática (Knox y Heslop-Harrison, 1969). Existe una zona engrosada por encima justo de la intina que parece tener una composición química diferente, enriquecida en sustancias pécticas, denominada Zwischenkörper (Fritzsche, 1837), cuya función está relacionada con el desarrollo del tubo polínico.

La capa externa: es la exina formada por una sustancia llamada esporopolenina, la cual es extremadamente resistente. Bioquímicamente Brooks y Shaw (1968) establecen que esta sustancia se forma mediante una polimerización oxidativa de carotenos y ésteres de carotenos.

En una exina típica es posible diferenciar dos capas (Fritzsche, 1837), la capa interna que se le denomina endexina y la externa o ectexina. La separación entre una y otra se establece por sus diferentes capacidades de tinción y resistencia a la acción química, siendo por el momento desconocida la naturaleza bioquímica de tales diferencias.

INTRODUCCION

Morfológicamente la endexina tiene una estructura homogénea, excepto en las zonas de las aperturas polínicas. La ectexina por el contrario está compuesta por pequeños elementos en forma de barras, radialmente distribuidas. El desarrollo y la distribución de éstas es la base de la variabilidad morfológica de la exina (Walker, 1976).

La ectexina podría contemplarse como una estructura formada a su vez por tres capas: la capa externa denominada tectum, la capa media, conocida como columnela o bácula y la capa interna o capa basal que se le llama "foot layer". Geométricamente el tectum y la capa basal pueden ser consideradas como fusiones de las partes distales o proximales de la columnela respectivamente. De acuerdo con Potonié (1934) hay que distinguir entre estructura (textura) y escultura de la exina. El término estructura comprende todos aquellos caracteres que son debidos a la forma y disposición de los elementos de la exina, mientras que el término escultura comprende las características externas sin referencia a su construcción interna. Estas características morfológicas de las exinas ayudan a la identificación de la especie a la que pertenece un grano de polen. En la figura 1.2 están representados los principales tipos de estructuras y esculturas de los diversos pólenes.

1.2.1.1 Aperturas

La mayoría de los pólenes presentan sobre su superficie externa zonas en las que la pared se debilita, a fin de llevar a cabo funciones probablemente de intercambio de sustancias con el exterior, acomodación del volumen del polen o zona de emisión del tubo polínico (Faegri e Iversen, 1989). Colectivamente se les denomina aperturas, pero de acuerdo con su

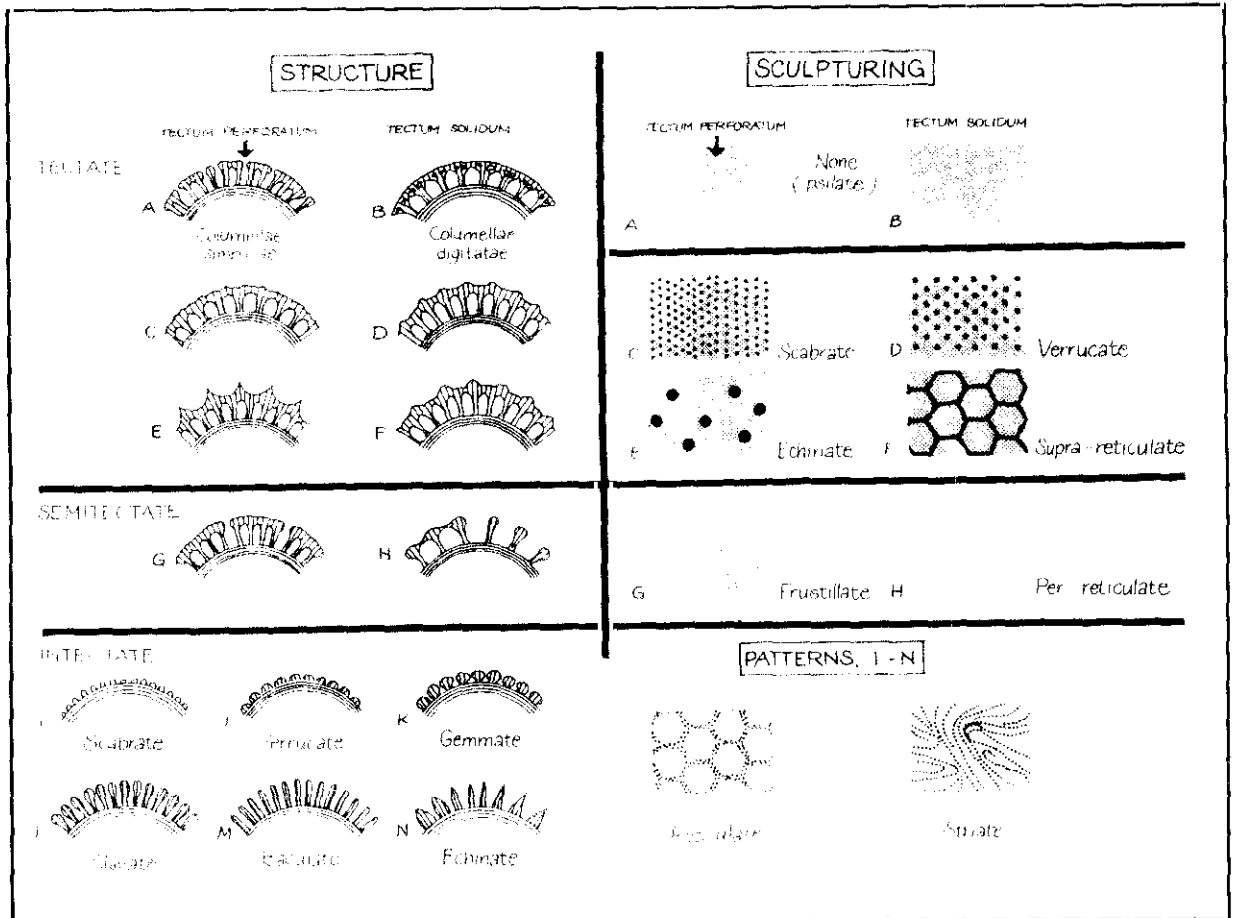


Figura 1.2

Principales tipos de estructuras (izquierda) y de esculpturas (derecha) de los diversos pólenes.

INTRODUCCION

morfología reciben el nombre de: poros, si son formaciones más o menos circulares, incluso elípticas o colpos si son hendiduras. A veces es difícil diferenciar entre un poro elíptico o un colpo existiendo formas posiblemente de transición entre uno y otro ya que filogenéticamente el poro parece ser un colpo evolucionado.

Las aperturas se producen tanto a nivel de la ectexina como de la endexina aunque con diferentes grados. En algunos pólenes la apertura de la ectexina coincide con la de la endexina pero en otros no.

Hay pólenes en los que algunos elementos de la exina quedan aislados en la región de la apertura como rodeados de una fina membrana. A tal estructura se le denomina opérculo. En el poro se presenta como un disco central, mientras que en el colpo forma una franja en el centro de la hendidura. Los extremos de la exina en las aperturas puede encontrarse como el resto de la exina o presentar unos bordes. En pólenes intectados los bordes se observan como un cambio de tamaño o de densidad, mientras que en el tectado y semitectado los bordes de las aperturas son frecuentemente más finos o más gruesos que el resto de la exina. El borde de la ectexina que rodea al poro se le denomina anulus y al que rodea al colpo margo. Un engrosamiento de la endexina acompañando a la apertura se le denomina costal.

El número y disposición de las aperturas varía entre especies siendo ambos importantes para la identificación de la especie a la que pertenece el polen.

En la figura 1.3 se presenta una clasificación de los pólenes atendiendo a las características de las aperturas (Faegri e Iversen, 1964).

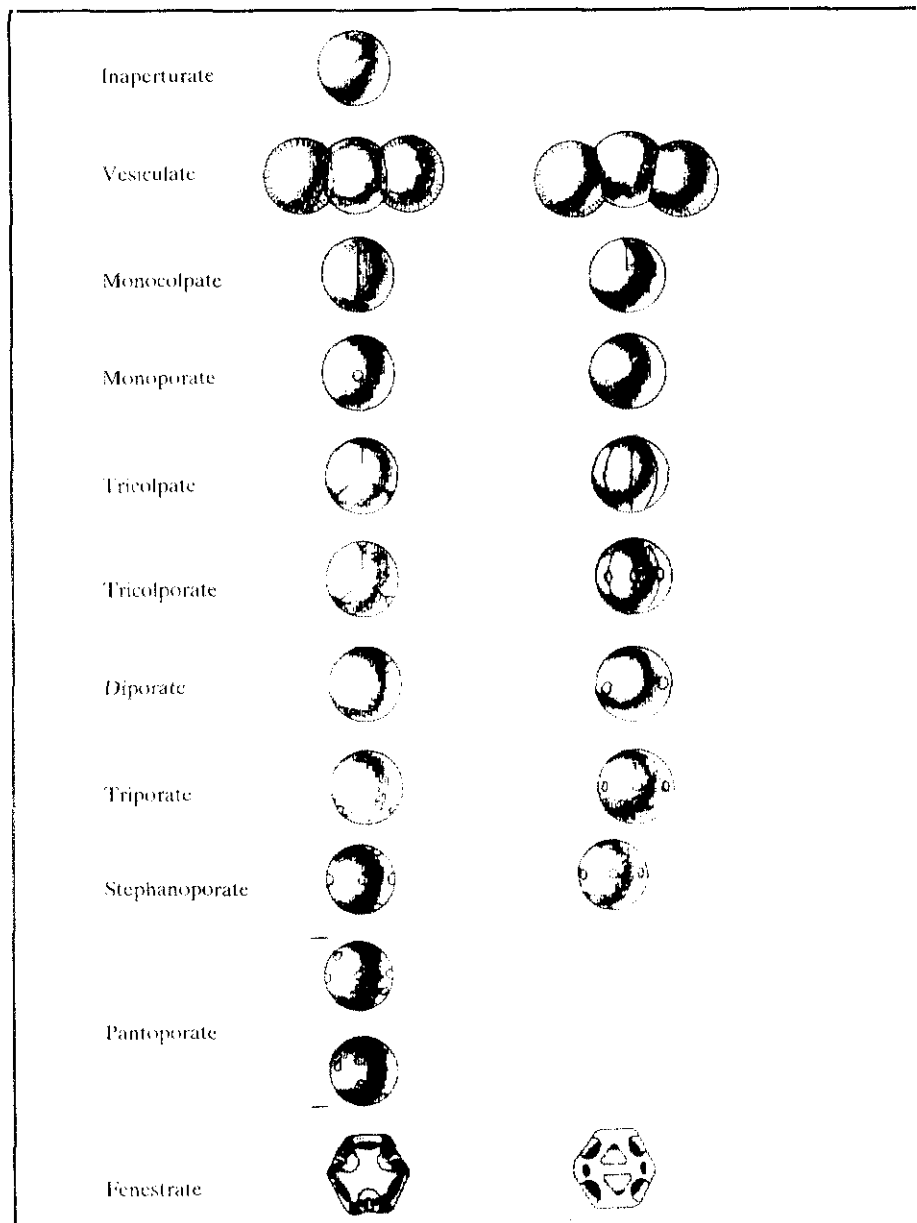


Figura 1.3

Clasificación de los diferentes tipos de pólenes atendiendo a las características de sus aperturas.

1.2.2 Formación del grano de polen de las angiospermas

Los granos de polen de las angiospermas se desarrollan en los sacos polínicos de las anteras.

Una antera joven está formada por una masa de células meristemáticas rodeadas por una epidermis. A medida que la antera se desarrolla, cuatro grupos de células arquesporales, correspondientes a los cuatro microsporangios, se van diferenciando para dar lugar por un lado a las diferentes capas de la pared de la antera (epidermis, endotecio, capa media y tapetum) y por otro lado a cuatro grupos de células precursoras de las microsporas (células madre del polen).

La meiosis de las células madre del polen inicia el proceso de desarrollo del polen. Consiste en dos divisiones que van a dar lugar a cuatro microsporas unidas por una pared de calosa. La formación de la pared de cada una de las microsporas, puede llevarse a cabo durante la división celular o inmediatamente después. Posteriormente la calosa que une a la tetrada es disuelta por enzimas procedentes del tapetum. Una vez liberadas las microsporas, comienzan a desarrollarse creciendo de tamaño y finalizando la formación de sus propias paredes. Sufren así mismo una división asimétrica que va a dar lugar a la célula vegetativa y a la célula generativa, quedando la última en el interior de la primera. En la mayor parte de los pólenes de las angiospermas la célula generativa sufre una nueva división mitótica dando lugar a la formación de dos gametos masculinos antes de que el polen sea liberado. Los nutrientes que las células necesitan para estos procesos lo toman de un fluido que llena el saco polínico, de origen tapetal. Este desarrollo continúa hasta poco antes de su liberación.

Paralelamente al desarrollo del grano del polen, las paredes de la antera, principalmente el tapetum, van sufriendo una serie de transformaciones que facilitan el aporte de sustancias necesarias para la formación del grano de polen y preparan a la antera para su desecación, hecho que permitirá que éste sea liberado a la atmósfera.

1.2.3 Polinización

Para que un grano de polen alcance su estigma necesita ser transportado desde la antera en la que se formó hasta el órgano femenino, recorriendo una cierta distancia más o menos larga. Este fenómeno es conocido como polinización. El vector de transporte puede ser abiótico, generalmente el viento, excepcionalmente el agua, o biótico predominantemente insectos, aunque también pueden transportar el polen otros animales, incluso no voladores.

1.2.4 Germinación del grano de polen

La germinación es el suceso morfogénético más crítico para que el polen ultime su función: liberar el gameto masculino en el saco embrionario. Para que este proceso se lleve a cabo con éxito se requieren unas condiciones determinadas. Así, se necesita que el grano de polen se hidrate de manera adecuada (Heslop-Harrison, 1979; Shivanna *et al.*, 1983; Bar-Shalom y Mattson, 1977), que en el medio existan una fuente de carbohidratos (Tupy, 1960), un nivel óptimo de boro (Schmucker, 1933) y de calcio (Brewbaker y Kwack, 1963). Para que el proceso se finalice con éxito, también son necesarias otras sustancias como hormonas, vitaminas y determinados aminoácidos que son aportadas por el estigma de la planta (Shivanna y Johri,

INTRODUCCION

1989). El pH del medio parece jugar un papel importante en el proceso de germinación, habiéndose descrito que el polen de algunas especies libera sustancias con capacidad tamponante para asegurar el pH necesario en el medio (Shivana y Johri, 1989).

La germinación es por tanto resultado de la intercomunicación que existe entre el polen y su estigma. En función de las sustancias intercambiadas por el polen con el medio húmedo, la célula vegetativa inicia o detiene el crecimiento del tubo polínico. Cuando la hidratación se produce fuera del estigma adecuado, el número de procesos biológicos que se suceden, antes de que se produzca el aborto de la germinación, varían apreciablemente de especie a especie y además es dependiente de los nutrientes del medio en que se encuentre el polen.

El intervalo de tiempo desde que el polen se hidrata hasta que se inicia la emisión del tubo polínico varía mucho entre los distintos pólenes, oscilando entre unos pocos minutos y muchas horas. Esta duración está relacionada con la tasa y el nivel de desarrollo mitocondrial. En los pólenes con mitocondrias más organizadas (pólenes tricelulares) este periodo es corto mientras que en aquellos que están pobremente desarrolladas se requiere espacios de tiempo más prolongados (pólenes bicelulares).

Durante la germinación, el aparato de Golgi pasa de un estado quiescente a otro activo formador de vesículas y aparecen polisomas y vacuolas en el citoplasma (Larson, 1965; Cresti *et al*, 1977).

El tubo polínico emerge a través del poro germinativo, en el cual no existe la exina o se encuentra recubierto por una fina capa de ésta. La emergencia del tubo es generalmente una extensión de la intina, la cual ha perdido su

rigidez debido en parte a la acción de las hidrolasas de la pared y en parte a la debilitación de las uniones entre microfibrillas que se produce tras la hidratación del polen (Heslop-Harrison, 1979). Tan pronto como el tubo

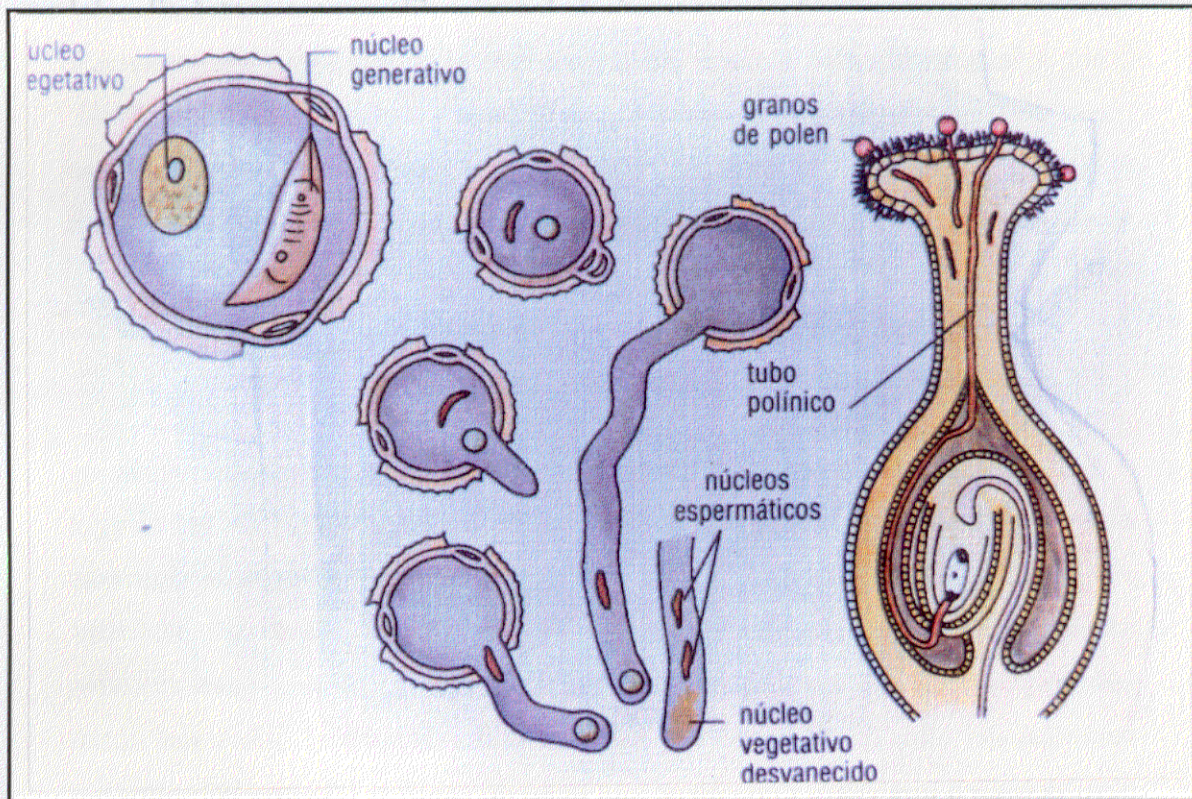


Figura 1.4

Representación esquemática de un grano de polen y del proceso de germinación. A la derecha se observa la penetración del tubo polínico desde el estigma hasta el rudimento seminal.

emerge se va insertando ordenadamente nuevo material para que continúe el crecimiento. Gran parte de éste proviene de vesículas que se fusionan aportando al proceso su material constitutivo, así como los azúcares que contienen (Rosen, 1971).

INTRODUCCION

Una vez formado el tubo polínico la célula generativa (o los dos núcleos espermáticos) y el núcleo vegetativo se desplazan a través de él hasta el ápice del tubo para que puedan ser liberados y alcanzar la ovocélula. Este movimiento parece producirse a través de los microfilamentos contráctiles del tubo, o incluso algunos autores describen que el movimiento se produce a través del establecimiento de un campo eléctrico (Weisenseel y Jaffe, 1976). Durante el proceso de emisión del tubo polínico el polen continúa su intercambio de sustancias con el medio en el que está germinando. (figura 1.4)

1.3 LOS POLENES EN LOS PROCESOS ALERGICOS

Los pólenes que se encuentran en la atmósfera, principalmente los de las plantas anemógamas, son los responsables de la mayor parte de las alergias estacionales. Este tipo de alergia se caracteriza por la presencia de síntomas bronquiales, oculares y nasales asociados en algunos casos con malestar general, pérdida del apetito, irritabilidad y depresión, durante determinados periodos del año. Al conjunto de síntomas se les denominó fiebre del heno, pero debido a que entre ellos no se han descrito cuadros febriles, actualmente se les conoce como polinosis (Falgiani, 1990). Para que un polen alergénico induzca los síntomas se requiere que éste se encuentren en el medio ambiente en concentraciones superiores a 50 granos por metro cúbico, siendo los síntomas más severos a concentraciones elevadas (Davies y Smith, 1973). La cantidad de polen presente en el medio ambiente depende del área geográfica y de sus características climáticas (Solomon, 1984; D'Amato *et al*, 1988; Subiza, 1980). Las plantas de interés alergológico son, por lo tanto,

diferentes según los países y regiones de residencia de los enfermos. Dentro de las plantas alergénicas hay que considerar que aquellas que posean periodos de polinización largos son las más dañinas, ya que prolongan la duración de los síntomas con claro perjuicio para el paciente.

1.3.1 Plantas de interés en alergia

No es fácil determinar cuales son las plantas de interés alergológico, principalmente porque los estudios sobre este tema son todavía incompletos, y quedan posiblemente por describir muchas de ellas. Así históricamente se han considerado a los pólenes de las coníferas como poco reactivos, pero en los últimos años se han incrementado las referencias que implican a estos pólenes en los procesos alérgicos, principalmente entre aquellos de las cupresáceas y las taxodiáceas (Yoo *et al*, 1975; Yasueda *et al*, 1983; Bousquet *et al*, 1984; Bulcholtz *et al*, 1985 y Panzani *et al*, 1986).

Considerando tan solo los pólenes de plantas que causan problemas a una gran parte de la población mundial y que estén bien caracterizados, las plantas de interés alergológico pertenecen a las siguientes familias: Gramíneae, Compositae, Chenopodiaceae, Amarantaceae, Urticaceae, plantaginaceae, oleaceae, Betulaceae, Fabaceae, Moraceae, Ulmaceae y Fagaceae.

1.3.2 Los pólenes de las gramíneas

A escala mundial, las gramíneas son claramente las plantas alergénicas más importantes. Esta familia está formada por alrededor de 10000 especies las cuales crecen abundantemente por todo el mundo excepto en algunas zonas desérticas. Por otra parte son cultivadas en grandes extensiones como

INTRODUCCION

céspedes de jardines y parques, pastos para el ganado y cereales para la alimentación humana. De esta forma, la contribución de las gramíneas a la concentración de pólenes alergénicos ambientales es alta. También hay que considerar que debido a su proximidad evolutiva, la mayor parte de los alérgenos del polen de una gramínea poseen determinantes antigénicos comunes a los de las demás y que teniendo en cuenta que entre ellas existen diferentes periodos de polinización, los síntomas de polinosis debidos a las gramíneas se mantienen durante varios meses.

La clasificación de las gramíneas y el grado de alergenidad de sus pólenes se muestra en la tabla I (Falagiani, 1990).

1.3.2.1 El polen del centeno

De todas las gramíneas mayoritariamente cultivadas, el centeno es una de las pocas que posee una auténtica polinización a través del viento. Este hecho provoca, que durante la época de polinización se acumulen grandes cantidades de éste polen en las zonas próximas a los cultivos, induciendo síntomas agudos en las personas sensibilizadas que habitan a sus alrededores. En otros cereales como trigo, cebada o avena la polinización es autógena, por lo que su contribución al desencadenamiento de los síntomas alérgicos es escasa.

Tradicionalmente se ha considerado que el polen del centeno contiene alérgenos no presentes en otros pólenes de las gramíneas (Benjamins, 1931), por lo que durante muchos años, en algunos países con grandes extensiones de cultivo de este cereal, se ha suplementado la inmunoterapia contra gramíneas con extractos de polen de centeno. Estudios posteriores han

FAMILIA	SUBFAMILIA	GENERO	ALERGENICIDAD
Poaceae (****)	Festucoideae (****)	Agropyron	*
		Agrostis	**
		Alopecurus	**
		Anthoxanthum	*
		Arrhenatherum	*
		Avena	
		Bromus	**
		Dactylis	***
		Festuca	**
		Holcus	*
		Hordeum	
		Lolium	***
		Phalaris	*
		Phleum	***
		Poa	*
		Secale	
		Triticum	
	Eragrostoideae (***)	Bouteloua	
		Cynodon	***
		Distichlis	
	Panicoideae (*)	Eragrostis	
		Andropogon	
		Paspalum	*
		Saccarum	
		Sorghum	
	Arundinoideae (*)	Zea	
		Arundo	
Phragmites		*	
Oryzoideae (*)	Cortaderia	*	
	Oryza	*	

TABLA 1.1

Gramíneas alergénicas y grado de importancia en alergenicidad de sus pólenes:**** = las más alergénica, *** = alergénica, ** = levemente alergénica, * = algo alergénica, sin asterisco = poco alergénica o poco estudiada

discutido esta consideración al no encontrar, en la experimentación inmunológica empleada, diferencias entre sus componentes y los de pólenes de otras gramíneas (Rudolph *et al.* 1978; Lowenstein *et al.* 1984).

INTRODUCCION

Botánicamente, el polen del centeno ha sido muy estudiado por su interés en la producción de este cereal (Heslop Harrison, 1979).

Describimos a continuación algunas características de los pólenes de las gramíneas, resaltando las distintivas del polen del centeno, por ser éste la base de estudio del presente trabajo. En la figura 1.5 se muestra la imagen del polen de centeno observada mediante microscopía electrónica y se describen sus principales características físicas.

1.3.2.2 Aspectos morfológicos y químicos

a) La pared

Los pólenes de las gramíneas poseen una pared en la que se diferencia una exina y una intina. La exina es tectada con una báculo corta. El espacio del lumen representa un 30% del volumen total de la exina. La superficie del tectum es ligeramente esculpturada con un patrón granulado en el que se observan unas pequeñas espínulas, no perforadas. Se pueden diferenciar una ectexina y una endexina ambas perforadas por numerosos canales. La única apertura de la exina es operculada observándose en el opérculo una estructura igual que la del resto de la exina. La naturaleza química de esta estructura sigue siendo en el momento actual objeto de estudio aunque las evidencias citoquímicas sugieren que está formada básicamente por esporopoleninas con una homogeneidad entre sus dos capas. Se ha descrito para la mayoría de las angiospermas que los espacios de la exina se llenan de material proteico procedente del tapetum, sin embargo en las gramíneas estas cavidades aparecen vacías desde el comienzo de la formación de la intina.



Figura 1.5

Imagen tomada mediante microscopía electrónica del polen de centeno. En el centro de la imagen se observa la única apertura de este polen que es operculada y con una dimensión de 5 μ de diámetro. Su estructura es fectada, con un relieve suprategal granuloso de gránulos muy densos, en disposición rugulada, distribuidos homogéneamente por toda la superficie. Es un polen prolado esferoidal con un eje mayor de 48 μ .

INTRODUCCION

Tampoco se ha observado la capa lipídica de origen tapetal que actúa tapando los microporos de las exinas de otros pólenes.

Inmediatamente por debajo de la exina se ha observado una capa que es una prolongación del Zwischenkörper, denominada capa Z la cual es solo visible en las zonas próximas a las aperturas.

La intina, se presenta engrosada en el polo apertural de grano. En esta capa se encuentra un sistema de canales radialmente orientados que van desde el plasmalema de la célula vegetativa hacia la capa Z.

Los componentes químicos mayoritarios de la intina son polisacáridos aunque se han detectado en esta estructura componentes proteicos procedentes del citoplasma de la célula vegetativa que se han ido depositando durante el proceso de formación de la capa. Dentro de estas proteínas se han identificado algunas enzimas con actividad ácido fosfatasa y esterasa (Knox y Heslop-Harrison, 1970 a; Knox, 1971; Heslop-Harrison *et al*, 1975) La mayor concentración proteica se detecta en la zona apertural. Mediante estudios inmunocitoquímicos se visto, en diversos tipos de pólenes incluidos los de gramíneas, que estas proteínas poseen actividad alérgica (Knox *et al*, 1970; Knox, 1971; Howlett *et al*, 1979; Knox, 1980).

b) La célula vegetativa

La membrana de la célula vegetativa del polen deshidratado no posee el aspecto de ningún plasmalema; los límites del protoplasto están marcados por masas opacas con propiedades de tinción de los lípidos. Las envueltas de las mitocondrias y de los amiloplastos no quedan resueltas con claridad, ni se distinguen los perfiles del retículo endoplásmico. Los mismos procedimientos

de tinción para el polen hidratado ponen de manifiesto que las estructuras de las membranas se encuentran reestablecidas.

Los amiloplastos son, con mucho, la estructura mayoritaria del polen de las gramíneas. En el polen del centeno maduro se encuentran localizados formando una gran masa en el polo opuesto a la apertura dejando libre de almidón una franja situada justo debajo de ésta. Además de los amiloplastos, otro componente muy abundante en el citoplasma del polen del centeno es una densa población de partículas esféricas más o menos uniformes denominadas partículas P. Estas partículas poseen componentes proteicos, y se les considera como material de partida en la formación del tubo polínico.

1.3.2.3 Deshidratación

Los granos de polen de las gramíneas experimentan un proceso de desecación 24-48 horas antes de que se produzca la antesis. En esta fase el agua es liberada a través de los microporos de la exina y de la intina, y a través de la apertura de germinación. La tasa de agua liberada depende del grado de humedad de la antera y por lo tanto del grado de humedad de la planta. Una vez liberado a la atmosfera sufre una segunda desecación más rápida y severa. La finalidad biológica de esta desecación es la disminución de la actividad metabólica durante el periodo de tiempo que dura la polinización de forma que quede asegurada la viabilidad del polen. Durante el proceso de desecación, la membrana de la célula vegetativa pierde su estructura lamelar, por lo que sus propiedades de permeabilidad y de barrera osmótica se ven alteradas. Tras su hidratación de forma controlada, las membranas recuperan su estructura inicial así como la capacidad para controlar el paso de los solutos (fig 1.6). En el caso de que la deshidratación sea muy severa se hace

INTRODUCCION

difícil la restauración de las características de las membranas perdiéndose la capacidad germinativa del polen. El grado de desecación debe por lo tanto mantener un equilibrio de forma que se disminuya el metabolismo y se evite la modificación irreversible de la estructura de membrana.

Las gramíneas, en general, retienen un contenido de agua relativamente elevado por lo que sus periodos de viabilidad son muy cortos, tan solo de horas.

1.3.2.4 Germinación

Según lo descrito por Watanabe (1955), cuando un polen de una gramínea se pone en contacto con el medio acuoso del estigma, sufre las siguientes fases: hidratación, expulsión, resorción y germinación. Los nutrientes necesarios para que estas fases se lleven a cabo son sintetizados, en su mayoría, durante el periodo de formación del polen en la antera así como al momento de su liberación al medio ambiente. No se requiere por tanto una gran actividad metabólica en el momento de su realización. Este hecho permite que los pólenes de las gramíneas germinen a velocidades muy altas, la mayor parte de ellas en menos de 5 minutos, y que algunas de las fases se lleven a cabo en cualquier medio húmedo, siendo tan solo el contacto con el agua el factor que desencadena el proceso. Se ha descrito que el tiempo necesario para que germine un polen de centeno, sobre el estigma adecuado, es tan solo de 90 segundos (Heslop-Harrison 1982). De ellos emplea 30 segundos en la fase de hidratación, recuperando el plasmalema su capacidad osmótica 10 segundos después. Se observan modificaciones sobre estos tiempos cuando el polen se encuentra en otros estigmas. En esta fase el agua penetra al interior del polen, hidratando los coloides citoplasmáticos hasta

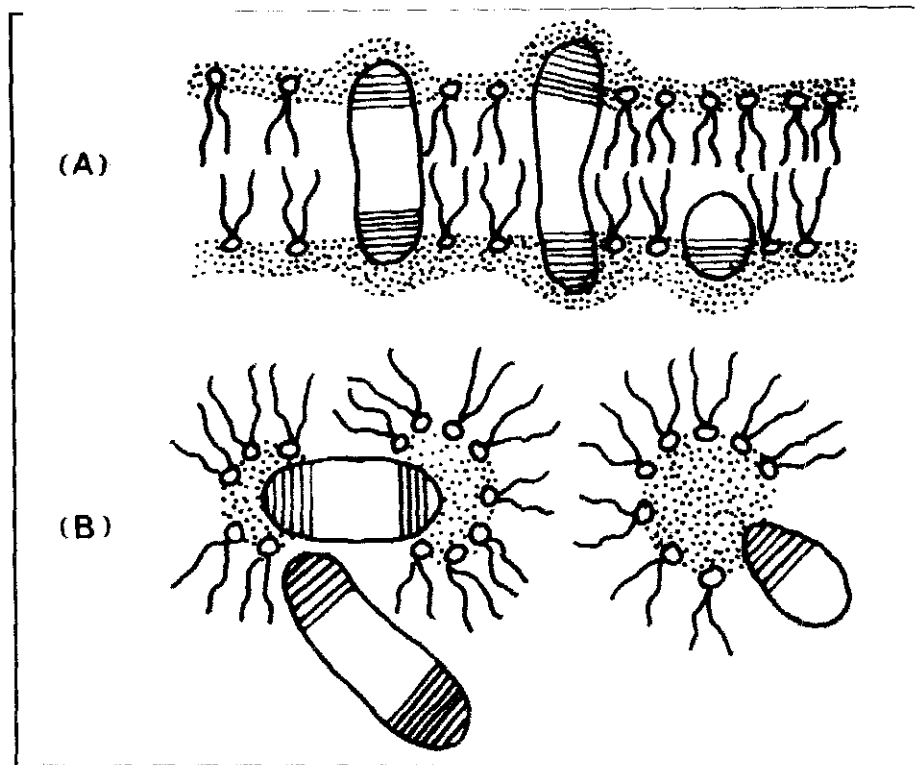


Figura 1.6

Esquema de la organización de los componentes de la membrana de la célula vegetativa en estado hidratado (A) y deshidratado (B).

que la tensión creada por la entrada de agua, es compensada con la tensión de la pared. En este momento la concentración de solutos en el interior celular sigue siendo superior a la del fluido por lo que la tendencia del agua es seguir penetrando. Como debido al proceso de desecación sufrido por el polen, la membrana de la célula vegetativa se encuentra desorganizada y no actúa como una barrera osmótica, la presión hidrostática del interior celular provoca una pérdida de componentes citoplasmáticos para compensar la tensión creada. El agua con los solutos salen del polen a través de los

INTRODUCCION

microporos y de la apertura de germinación. Esta fase (expulsión) finaliza a los 40 segundos de ser alcanzado el estigma. Poco después la membrana citoplasmática ha reestablecido su capacidad osmótica, evitando que el contenido citoplasmático se siga perdiendo y recuperando el agua liberado con parte de los solutos (fase de resorción). Esta nueva entrada de agua aumenta la presión hidrostática en el interior de la célula. Si el polen se encuentra sobre el estigma adecuado, habrá recibido las señales necesarias para que la tensión interior provoque el inicio de la fase de germinación, con el crecimiento del tubo polínico. Si no se encuentra sobre el estigma y el medio de hidratación no contiene solutos que eviten las tensiones, la intina se rompe por su zona más débil (la apertura) produciéndose también la rotura de la membrana celular y la brusca liberación del contenido citoplasmático. Los pólenes no viables son capaces de hidratarse exudar y sufrir choque osmótico como los pólenes viables, pero no se produce la emisión del tubo polínico. (Heslop-Harrison 1979)

1.4 PREPARACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS PARA DIAGNOSTICO Y TERAPIA DE LAS ENFERMEDADES ALERGICAS

En 1911 Noon describió que los pólenes contenían diversas toxinas que eran las responsables de los síntomas de la fiebre del heno. En su concepto erróneo de que la alergia era una enfermedad de tipo infeccioso, preparó unos extractos mediante incubación de los pólenes alergénicos en soluciones acuosas, para ser utilizados como vacunas. Tras la administración en dosis crecientes de estos extractos a un grupo de enfermos, se observó una notable mejoría con una disminución de la respuesta conjuntival al contacto con los pólenes. También se observó que si los incrementos de dosis eran demasiado

grandes, los síntomas se recrudecían durante las siguientes 24 horas. Paralelamente Freeman trabajó continuó estos trabajos, obteniendo un beneficio claro en los 20 pacientes que trató (Freeman, 1911). A pesar del gran desconocimiento de los procesos que daban lugar a la mejoría, los resultados obtenidos, junto con la facilidad de preparación de los extractos, favorecieron la difusión del método. Estos extractos se ha venido utilizando desde entonces, tanto para el tratamiento de la enfermedad como para su diagnóstico. A lo largo de los 80 años que han transcurrido, los conceptos sobre la enfermedad, la finalidad y pautas de la inmunoterapia así como los métodos de diagnóstico han ido evolucionando, y los protocolos de preparación de los extractos alérgicos se han ido modificando según los criterios y conocimientos del momento. Hoy en día se preparan extractos alérgicos para tratamiento y diagnóstico partiendo de muy diversas sustancias. Cada fabricante prepara estos extractos de acuerdo con sus propios diseños de extracción, de forma que se ha descrito la existencia de más de 1000 patentes diferentes, con unos intereses comerciales elevados (Yunginger, 1991).

El desarrollo de nuevas tecnologías y la posibilidad de disponer de anticuerpos monoclonales contra la IgE, ha permitido estimar la gran diversidad de contenido alérgico entre extractos etiquetados con el mismo nombre y destinados para un mismo tratamiento, incluso entre lotes diferentes de un mismo fabricante (Baer *et al*, 1970). Dado que la calidad de los extractos, en términos de potencia y composición, es esencial para la seguridad del tratamiento y del diagnóstico, actualmente se requiere que los extractos estén convenientemente preparados.

INTRODUCCION

1.4.1 Estandarización de extractos alérgicos

Ya en la época de Noon surgió la necesidad de asignar unas unidades a los extractos para regular su uso. Estas unidades iniciales fueron asignadas por el propio Noon y se basaron en el peso seco del material de partida. Posteriormente se definieron las unidades de los extractos como una relación entre el peso seco del material alérgico y volumen de fluido empleado para preparar el extracto.

En 1944, los miembros de la Academia Americana de Alergia establecieron que los trabajos que se realizaran con extractos alérgicos para ser presentados a congresos o publicados en *The Journal of Allergy*, deberían expresar el contenido en proteína que poseían mediante valoración de nitrógeno. La unidad de extractos alérgicos pasó a ser PNU (1 unidad = 0.0001 mg de proteína por valoración de nitrógeno). De esta forma se hablaría en una lengua común a la hora de comparar resultados experimentales. No obstante, la finalidad real que la Academia perseguía con esta normativa, era que los extractos se prepararan de una manera fiable, de forma que su calidad para la aplicación en la inmunoterapia y el diagnóstico estuviera asegurada. Además establecieron que la actividad biológica de los extractos debía ser medida mediante test cutáneos y se resaltó la importancia de la calidad y del origen del material de partida (referenciado por Reed y Yunginger, 1989). Todas estas decisiones supusieron un claro intento de estandarización de los extractos usados diariamente en clínica. A pesar de que los propios miembros de la Academia eran conscientes de que las unidades adoptadas no eran la solución definitiva, se han utilizado hasta muy recientemente ya que, hasta ahora, no se disponía de tecnología adecuada que

permitiera valorar el contenido alergénico de un extracto en relación con su contenido proteico.

En 1978, el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en patrones biológicos, dictó las normas y las pautas para la preparación y el establecimiento de materiales y reactivos de referencia para sustancias biológicas.

En 1981, la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología de la OMS, inicia un programa de estandarización de extractos alergénicos de acuerdo con las pautas establecidas por la OMS, con objeto de que exista una preparación internacional de referencia. El propósito de la preparación de estos estándares de referencia, es que este material biológico sirva de patrón comparativo con los patrones nacionales de los distintos países, fundamentalmente para que se puedan definir, en unidades internacionales, su actividad alergénica. Con todo esto se trata de asegurar al menos la repetitividad de la potencia de los distintos extractos, disminuyendo los riesgos de la inmunoterapia y haciendo más fiables los métodos de diagnóstico (Aukrust, 1981; Brede y Goeing, 1980; Falagiani y Morlacchi, 1980; Creticos y Norman, 1986; Norman, 1986).

El proceso que se sigue para la elaboración de un extracto de referencia consta de dos fases (Yunginger, 1991). En la primera etapa, los miembros del Comité de estandarización de extractos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología establecen unos criterios sobre fuente del material de partida, métodos de extracción y composición de los extractos propuestos como estándares (Anderson y Baer, 1987; Yunginger, 1988; Marsh, 1987; Philips, 1987; Ohman, 1987; Spieksma, 1987; Aukrust, 1987;

INTRODUCCION

Anderson, 1987). En los extractos de pólenes en los que alguno de sus alérgenos hayan sido aislados y caracterizados, se debe especificar a que concentración se encuentran éstos en la mezcla. También se hace un estudio de los componentes individuales del extracto mediante inmunoelectroforesis, CRIE, IEF, PAGE, inmunoblotting, así como de su actividad biológica, mediante inhibición del RAST, pruebas cutáneas y liberación de histamina. Después de este estudio, se preparan lotes de los extractos candidatos y se distribuyen entre los miembros del subcomité para su estudio. Si alguno de ellos reúne condiciones, se propone como estándar de referencia. En la segunda etapa el candidato es aprobado por la OMS; para ello se lleva a cabo un estudio en colaboración internacional para confirmar que el material propuesto reúne los criterios de pureza, actividad, esterilidad y estabilidad para ser utilizado como estándar internacional de referencia. Posteriormente se prepara el extracto en grandes cantidades y se envasa en ampollas asignándosele unas unidades arbitrarias de potencia, IUs.

Durante los últimos 10 años se ha progresado mucho en estandarización de extractos alérgicos; sin embargo se ha creado un cierto confusiónismo principalmente sobre el sentido que tienen las unidades de medida de los extractos y sobre el uso práctico de los estándares (Baer, 1988; Platts- Mills y Chapman, 1991). Dos posturas opuestas han surgido: 1) la de los que piensan que las unidades que se empleen deben de ayudar a predecir la respuesta biológica y que las unidades deben basarse en pruebas cutáneas, y 2) la de los que piensan que debido a que la respuesta de cada paciente es individual, cualquier evaluación de la potencia basada en pruebas cutáneas o en pruebas de RAST depende de los pacientes seleccionados y por lo tanto no es la solución ideal a largo plazo. Por otra parte, se contempla que es el propio

extracto el que se usa para definir a quien se selecciona para probar la potencia del extracto lo cual conduce a un circulo vicioso. Estos últimos consideran que la estandarización debe de tener como objetivo hacer medidas cuantitativas de los constituyentes definidos de un extracto y que las unidades no deben implicar predicción alguna de la respuesta in vivo.

En el momento actual es generalmente aceptado que dos extractos con una potencia alergénica de las mismas unidades internacionales pueden poseer una capacidad hiposensibilizante muy diferente y dar distinto diagnóstico a un mismo paciente. Esto se debe a que la composición y proporción de los alergenicos en la mezcla es variable dependiendo del método de extracción empleado y la forma actual de medir la actividad alergénica no distingue si ésta se debe a la presencia de uno o de varios alergenicos en la mezcla. En este sentido los objetivos de los últimos años para mejorar las preparaciones de los extractos se centran en las siguientes consideraciones (Yunginger, 1991; Malling, H.J., 1988):

- 1) el material de partida debe ser estudiado para mejorar la preparación de los extractos.
- 2) es necesario tener más información sobre los componentes individuales de las mezclas y sobre su importancia en la reacción alérgicas.
- 3) se deben hacer medidas cuantitativas de los componentes alergénicos que posea el extracto.
- 4) para que todos los pacientes queden cubiertos por la inmunoterapia y para que el diagnóstico sea completamente seguro, todas las

INTRODUCCION

sustancias potencialmente alergénicas deben de estar incluidas en los extractos.

- 5) la purificación de alergenios facilita los trabajos de estandarización y ayudan al diseño de nuevos tratamientos.

1.4.1.1 Criterios de la IUIS y de la OMS sobre preparaciones de extractos de referencia de pólenes

Una serie de criterios escritos han sido formulados por el grupo de trabajo para la estandarización de extractos de esta unión de sociedades los cuales han sido distribuidos entre aquellos productores de extractos que deseen que éstos sean candidatos extractos de referencia (Yunginger, 1988; Anderson y Baer, 1987; Malling, H.J., 1988). Con respecto a la preparación de extractos a partir de los pólenes se valoran los siguientes aspectos:

En cuanto al origen de la materia prima se establece que los pólenes deben de proceder de fuentes de establecida consistencia y ser recolectados y seleccionados por personas expertas en botánica. No deben de contener pólenes extraños u otros contaminantes en un porcentaje superior al 1%, ni fragmentos de plantas por encima de un 5%. Para su conservación el polen debe de estar seco y almacenado bajo ambiente de nitrógeno a o por debajo de +4 °C. Los pólenes deben de ser delipidados antes de la extracción con eter-petroleo en un aparato Soxhler.

En cuanto al método de extracción se aconseja la utilización de agua destilada apirógena para la incubación. Esta debe realizarse con continuo movimiento a 4 °C durante 18-24 horas. El pH del extracto debe de ser monitorizado durante la extracción con adición de NaOH de forma que el pH del medio se mantenga entre 7 y 7.5.

INTRODUCCION

Los patrones electroforéticos, de IEF, o de CRIE deben de ser comparables con los ya publicados en los diferentes estudios previos.

OBJETIVOS

Uno de los principales problemas que presenta hoy en día la preparación de extractos alergénicos es la falta de homogeneidad entre extractos preparados por diferentes laboratorios a partir de una misma fuente de alérgenos. Las causas de esta variabilidad no han sido suficientemente estudiadas, considerándose que pueden deberse a diferencias botánicas entre pólenes recolectados en diferentes áreas geográficas, o quizás a las diferentes metodologías empleadas para su preparación.

El diseño de estas metodologías se ha basado desde hace 80 años, en la obtención de un alto contenido proteico. Las condiciones de incubación y el tiempo de extracción se ajustan de forma que se evite el deterioro de los componentes extraídos, así como el crecimiento bacteriano. La tecnología actual ha puesto en evidencia que no siempre se corresponde una buena potencia alérgica de un extracto, con un alto contenido proteico. Por esta razón, entre otras, actualmente se considera que un conocimiento biológico del material de partida puede contribuir a la optimización de la metodología de preparación de los extractos alergénicos empleados en el diagnóstico y tratamiento de las alergias.

En el presente trabajo, hemos considerado que un grano de polen alérgico es un ser vivo que se encuentra en la atmósfera inactivo debido a su desecación, pero que recupera toda su capacidad biológica cuando entra en contacto con un medio húmedo. Según esto, la humedad del órgano de choque podría ser suficiente para el inicio de una serie de procesos iguales a los que ocurren cuando el polen alcanza el estigma. Dentro de éstos se incluirían hidratación, exudación, reabsorción e inclusive emisión del tubo

OBJETIVOS

polínico, dependiendo de la especie a la que pertenezca el polen. Los pólenes por tanto, podrían liberar sus alérgenos no por simple difusión sino dependiendo de procesos más complejos regulados por las condiciones del tejido alcanzado. También hemos tenido en cuenta, la alta resistencia de los pólenes a la degradación, hecho que permite que algunos de ellos puedan encontrarse intactos en heces. Según estas consideraciones, las proteínas alérgicas serían aquellas que el polen libere durante los procesos que ocurran en el tiempo de permanencia en el órgano de choque, ya que aquellas que quedan en su interior no llegarían nunca a entrar en contacto con el sistema inmune.

La base de las diferencias que se observan entre los extractos preparados a partir de un mismo tipo de polen, mediante diferentes tecnologías, pudiera encontrarse en los distintos comportamientos que el polen puede manifestar dependiendo del medio en el que se encuentre.

Por todo ello, nuestros objetivos en el presente trabajo fueron:

- 1) Estudiar si la emisión de los componentes del polen de centeno, durante los procesos de incubación, se produce por simple difusión o guarda relación con los procesos botánicos que ocurren en este polen, cuando entra contacto con el agua. Para ello nuestro planteamiento de trabajo fue el siguiente:
 - a) Incubar el polen de centeno retirando los componentes extraídos a diferentes intervalos de tiempo, seleccionados en función de los procesos botánicos descritos por Heslop-Harrison (1979), previos a la germinación de este polen.

- b) Analizar, a nivel cuantitativo y cualitativo, los componentes liberados a los distintos intervalos.
- 2) Una vez conocido cómo se liberan los componentes, nuestro segundo objetivo fue identificar cuáles eran los alergénicos, determinando los periodos de máxima emisión de cada uno de ellos.
- 3) Teniendo en cuenta que los procesos botánicos pueden ser variables dependiendo del medio en el que se encuentra el polen, y los estudios sobre influencia del pH en la extracción de algunos alérgenos, nuestro siguiente objetivo fue conocer cómo influían las condiciones de pH del medio de incubación sobre las características de la cinética de emisión de los diferentes componentes.
- 3) Una vez conocidos cómo y cuando se liberan los componentes alergénicos, nuestro interés se centró en la aplicación de la información obtenida para la búsqueda de unas condiciones y tiempos de incubación que nos permitiera obtener extractos fraccionados, enriquecidos en diferentes alérgenos. Estos extractos serían utilizados como punto de partida para la purificación de alérgenos.

MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

3.1.1 Especificaciones de los pólenes estudiados

- 1) Pólenes de Juan Antonio Jiménez.
 - a) Polen 1987
 - Especie: Secale cereale L.
 - Fecha de recolección: Mayo 1987.
 - Pureza: 97 %.
 - Restos de planta: 2 %.
 - Pólenes extraños: 0,2 %.
 - Partículas extrañas: 0,3 %.
 - Esporas: 0,1 %.
 - Método de recolección: Siega de la planta, colocación en agua de la parte inferior de los tallos, desprendimiento espontáneo del polen sobre papel cristal.
 - Procesamiento: Tamizado y desecado.
 - Almacenado: En nevera con desecante a 5 °C, el primer suministro y el segundo congelado a -30 °C.
 - b) Polen 1989
 - Especie: Secale cereale L.
 - Fecha de recolección: Mayo 1989.
 - Pureza: 97 %.
 - Restos de planta: 2 %.
 - Pólenes extraños: 0,1 %.
 - Partículas extrañas: 0,6 %.
 - Esporas: 0,05 %.

MATERIAL Y METODOS

- Método de recolección: Siega de la planta, colocación en agua de la parte inferior de los tallos, desprendimiento espontáneo del polen sobre papel cristal.
- Procesamiento: Tamizado y desecado.
- Almacenado: En congelador a -30 °C.
- c) Polen 1991
 - Especie: Secale cereale L.
 - Fecha de recolección: Abril 1991.
 - Pureza: 98 %.
 - Restos de planta: 1 %.
 - Pólenes extraños: 0,1 %.
 - Partículas extrañas: 0,7 %.
 - Esporas: 0,05 %.
 - Método de recolección: Siega de la planta, colocación en agua de la parte inferior de los tallos, desprendimiento espontáneo del polen sobre papel cristal.
 - Procesamiento: Tamizado y desecado.
 - Almacenado: En nevera, con desecante a 5 °C.
- 2) Pólenes de Sigma.
 - Especie: Secale cereale .
 - Fecha de recolección: no especificada
 - Pureza: 97 %.
 - Restos de planta: menos del 1 %.
 - Pólenes extraños: menos del 1 %.
 - Partículas extrañas: no determinado.
 - Esporas: menos del 1 %.
 - Método de recolección: Mediante vacío .
 - Procesamiento: Desecado con vacío durante 24 horas a 38 °C.
 - Almacenado: Congelado con desecante.

- 3) Pólenes de Allergon.
 - Especie: Secale cereale.
 - Fecha de recolección: no especificada.
 - Pureza: 90 %.
 - Restos de planta: 10 %.
 - Pólenes extraños: menos de 0,5 %.
 - Partículas extrañas: menos del 1 %.
 - Esporas: menos del 0,3 %.
 - Método de recolección: recolección de la parte floral de la planta y desecado, con separación mecánica del polen.
 - Procesamiento: Tamizado y desecado con aire caliente a 35 °C.
 - Almacenado: En nevera a 2-8 °C.

3.2 REACTIVOS EMPLEADOS

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico y han sido suministrados por las siguientes casas comerciales:

- Reactivos de Merck (Darmstadt Alemania):
Cloruro sódico, ácido clorhídrico, carbonato y bicarbonato sódico, sacarosa, carbonato cálcico, nitrato de plata, ponceau S, ácido tricloroacético, reactivo de Folin, sulfato de cobre pentahidratado, tartrato potásico, carbonato sódico, azul de coomassie R-250
- Reactivos de Sigma (St Missouri, EE. UU.) :
Glicina, Tris (trizma-base), TEMED, azul de bromofenol, tiosulfato sódico, ácido 6-aminohexanoico, tween-20, 4-Cloronaftol, hidróxido sódico, ácido sulfosalicílico, fast-green, n-octil-glucopiranosido, urea, seroalbúmina bovina tipo V

MATERIAL Y METODOS

- Reactivos de Bio-Rad (Richmond, California, EE.UU.):
Kit de valoración de proteínas por el método de Bradford, sodiododecil-sulfato-sódico (SDS),
- Reactivos de Carlo Erba (Milán, Italia):
fosfato sódico monobásico, fosfato potásico bibásico, agua oxigenada
- Reactivos de Pharmacia-LKB (Upsala, Suecia):
Acrilamida, bisacrilamida, amonio persulfato, Gel-Bound
- Probus S.A. (Badalona, España):
Metanol, ácido acético, formaldehido
- Flow (Irvine, Irlanda):
Suero de ternera fetal

3.3 PREPARACION DE EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO

Las primeras preparaciones de extractos del presente estudio se realizaron incubando con tampón fosfato los pólenes de J.A. Jiménez recolectados en 1987.

3.3.1 Extractos totales (ET)

Los extractos totales se prepararon mediante incubación de 50 mg de polen de centeno en un ml de $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM, 150 mM ClNa pH 7.4 (PBS), durante 19 horas a 4-8 °C con rotación suave. Al final de la incubación la suspensión se centrifugó durante 2 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga TM11 de Beckman. El sobrenadante fue filtrado sucesivamente a través de los filtros de HVLP 0.45 μm y GVWP 0.2 μm de Millipore y posteriormente congelado a -40 °C hasta su uso.

3.3.2 Extractos a tiempos parciales

Paralelamente a las extracciones totales se realizaron las extracciones a tiempos parciales. Para ello se resuspendieron 50 mg de polen en 1 ml de PBS, incubándose durante 19 h a 0-4 °C. Esta incubación fue interrumpida a 1,5 y 30 min, 1, 2, 4, y 19h (tiempos considerados desde el inicio del proceso), mediante centrifugación de la suspensión. Cada vez se recogió el sobrenadante y el sedimento fue nuevamente resuspendido en un mililitro de tampón para continuar el proceso. A los extractos así preparados se les denominó respectivamente E1, E5, E30, E1h, E2h, E4h, E19h. Los tiempos de estas extracciones parciales fueron posteriormente modificados, en función de los resultados obtenidos, y los nuevos periodos de incubaciones parciales fueron: 1, 5, 15 minutos, 1h, 4h y 19h, y a los extractos los denominamos E1, E5, E15, E1h, E4h y E19h.

3.3.3 Extracto sonicado (ES)

Este extracto se preparó resuspendiendo 50 mg de polen en un ml de PBS de la misma forma que el extracto total. La suspensión fue puesta en hielo y se sonicó alternando pulsos de 1 minuto de sonicación y periodos de descanso de 30 segundos, para evitar el calentamiento de la muestra. El proceso se finalizó a los 15 minutos, observándose al microscopio óptico que se habían producido una elevada proporción de roturas (92 %). La muestra se centrifugó y el sobrenadante se filtró como en el extracto anterior, congelándose hasta su uso.

3.3.4 Recuento de pólenes rotos

Con el fin de asegurarnos que las proteínas habían sido liberadas por el polen según las características cinéticas de emisión de cada una de ellas y no porque el polen se rompiera, se llevó a cabo un control microscópico del número de pólenes rotos en cada uno de los sedimentos recogidos en las diferentes extracciones totales y parciales.

3.3.5 Pólenes de Sigma y Allergon

El estudio de los componentes de estos pólenes se realizó preparando simultáneamente extractos totales y parciales, en tampón fosfato, con pólenes de Allergon, Sigma y J.A. Jiménez de 1987. Las extracciones se realizaron como con el polen anterior con tiempos de incubación de 19 horas para los extractos totales y las extracciones parciales se recogieron a: 1, 5 y 15 minutos, 1, 4 y 19h, del inicio de la incubación.

3.3.6 Pólenes de diferentes lotes de J.A. Jiménez

Para conocer las diferencias existentes entre pólenes de un mismo suministrador, se prepararon extractos a partir de pólenes recolectados en 1987 (unos congelados y otros conservados en nevera 4 °C), pólenes de 1989, y pólenes recién recolectados (en 1991). El estudio se realizó preparando extractos totales y parciales de forma simultanea de los 4 pólenes. El procedimiento de extracción y los tiempos de incubación fueron los mismos que en el estudio de los pólenes anteriores.

3.4 PREPARACION DE EXTRACTOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE PH

El estudio de la influencia del pH sobre la extracción de los componentes del polen del centeno se realizó obteniendo extractos totales y parciales en tres tampones diferentes, realizándose todas las incubaciones en paralelo. Los tampones empleados fueron: glicina ClH 10 mM, 150 mM ClNa, pH 3, PO₄HNa₂-PO₄H₂K 10 mM , 150 mM ClNa, pH 7.4 y CO₃HNa- CO₃Na₂ 10 mM, 150 mM ClNa, pH 10. El estudio se llevó a cabo con pólenes de 1987 y posteriormente con pólenes de 1991, siguiendo el mismo procedimiento en ambos.

Se pusieron 50 mg de polen en 6 tubos tipo Eppendorf, de 1.5 ml. A tres de ellos se les añadió un ml del correspondiente tampón y se resuspendieron a la vez, *incubándoles con rotación suave durante 20 h a 4 °C*. En los otros tres tubos se añadió, análogamente, un ml de tampón de forma que el polen no se mezclara con el líquido. Una vez añadido en todos los tubos se consideró tiempo cero y se agitaron manualmente los tres a la vez. Al minuto de agitación se centrifugó el polen durante dos minutos en una microcentrífuga Beckman T11, *recogiéndose los tres sobrenadantes y resuspendiendo a continuación cada sedimento en un ml del tampón de incubación*. La centrifugación se repitió a los 5 y 15 minutos, *1, 4 y 20 horas desde el inicio del proceso*. El procedimiento de filtración de los extractos y su conservación se hizo igual que en las extracciones anteriormente descritas.

MATERIAL Y METODOS

3.4.1 Extracciones con cambios consecutivos de tampón

Este tipo de extracción se realizó así mismo con los pólenes de J.A. Jiménez recogidos en 1987 y en 1991.

Con los primeros, 0.5 gramos de polen fueron suspendidos en 10 ml de tampón glicina ClH 10 mM, 150 mM ClNa pH 3, con agitación manual en dos tubos diferentes (1 y 2). La incubación de ambos se realizó en paralelo, con 15 minutos de desfase. Cada suspensión se incubó durante 15 minutos, filtrándose al final de este tiempo mediante succión por vacío, para recoger el sobrenadante y resuspendiendo de nuevo el polen en otros 10 ml de tampón, para continuar la incubación. Las filtraciones y resuspensiones se repitieron a la hora, y a las 20 horas del inicio del proceso, de la misma forma en las dos suspensiones de polen. A este último tiempo se lavó el polen del tubo 1 añadiendo, una vez seco por filtración, 10 ml de tampón de incubación mientras se mantenía la succión por vacío. El polen fue después resuspendido en el mismo tampón para continuar la incubación. En el polen del tubo 2 se realizó el mismo lavado y resuspensión pero el tampón que se utilizó fue $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM, 150 mM ClNa, pH 7.4. Después de 12 horas de incubación en estas condiciones, se paró el proceso mediante filtración. El polen del tubo 1 se lavó nuevamente y se resuspendió en el tampón de partida, mientras que el polen del tubo 2 se lavó y resuspendió en tampón $\text{CO}_3\text{HNa- CO}_3\text{Na}_2$ 10 mM, 150 mM ClNa, pH 10. Después de 12 horas se finalizó la incubación recogiendo de nuevo los fluidos mediante filtración. Todos los sobrenadantes recogidos en este proceso fueron filtrados sucesivamente a través de los filtros de HVLP 0.45 μm y GVWP 0.2 μm de Millipore congelándoles después a -40°C .

Con el polen de 1991 el procedimiento fue modificado en los tiempos de extracción debido a las diferencias observadas en las cinéticas de emisión de este polen. Los tiempos de filtración fueron 1, 5, y 15 min 1, 4, 20, 32 y 44h. El método seguido y los tiempos a los que se realizó el cambio de tampón fueron iguales que los del polen de 1987.

3.4.1.1 Pruebas de alergenicidad in vitro.

La comprobación de la alergenicidad de los extractos obtenidos con cambios consecutivos de tampón a partir del polen de 1987 fue realizada mediante la técnica de RAST, utilizando el kit de Pharmacia Phadebast.

Se prepararon discos de nitrocelulosa de 5 mm de diámetro y se añadieron 20 de ellos en un ml de cada uno de los extractos obtenidos, diluidos a una concentración de 0,48 mg/ml. Después de 24 horas de incubación a temperatura ambiente, los filtros se saturaron con BSA al 2% en PBS, incubando a 37 °C durante una hora. A continuación se quitó el exceso de proteína no unida mediante tres lavados consecutivos de los filtros, de 10 minutos cada uno. Un filtro de cada extracto fue incubado con 50 µl de suero de paciente a temperatura ambiente durante 3 horas. El ensayo se llevó a cabo, individualmente, con suero de 10 pacientes. Finalizada la incubación, se lavaron los filtros abundantemente con PBS que contenía Tween 20 a 0.5 %. Posteriormente se añadieron 50 µl de IgG anti IgE marcada con I¹²⁵ incubándose 18 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados abundantes de 10 minutos de duración, se aspiró el líquido y se midió la radiactividad unida. El calculo de la IgE específica ligada se hizo a partir de la curva de calibración del kit que compara la radiactividad detectada en los filtros con la que se une a 0.35, 0.70, 3.5 y 17.5 PRU/ml de IgE.

3.5 TECNICAS ELECTROFORETICAS

3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de detergente Sodiodecil lauril sulfato (PAGE-SDS)

Las electroforesis en este tipo de geles se realizaron empleando un sistema discontinuo de acuerdo con lo descrito por Laemmli (1970), utilizando un microsistema de electroforesis vertical de Hoefer Scientific Instruments (cubeta SE-250). Las placas se montaron de acuerdo con las descripciones del fabricante del sistema electroforético, sellando la parte inferior con agarosa al 2 %. El gel concentrador se realizó a una concentración p/v de acrilamida del 6 %, (T=6 %) y una concentración p/v de bisacrilamida de 0.32 %, (C=2.15 %), en tampón Tris- ClH 0.125 M, pH 6.8 con un contenido de detergente del 1 % (p/v). Los geles distanciadores se prepararon con un porcentaje del 12 ó 13 % de acrilamida y con la misma relación de bisacrilamida que los anteriores, en tampón Tris ClH 0.375 M, pH 8.9 con un 1 % (p/v) de SDS. La polimerización de los geles se llevó a cabo añadiendo 12.5 μ l de TEMED y 7.5 mg de persulfato amónico por cada 10 ml de gel preparado.

En los geles que se tiñeron con azul de coomassie, se puso un volumen de muestra que contuviera 60 μ g de proteína. Previamente se precipitó con ácido tricloroacético la proteína, recogiendo el precipitado mediante centrifugación y resuspendiéndose en tampón de electroforesis.

En los geles teñidos con plata la cantidad de proteína analizada de cada muestra fue de 10 μ g (valores calculados a partir de los datos del método de Lowry), sin precipitación ácida. En los extractos obtenidos durante el primer minuto, la cantidad de proteína estimada no permitía ver bandas con la misma

intensidad que en los otros extractos por lo que se incrementó la cantidad puesta hasta su visualización. En los estudios electroforéticos de las proteínas de los picos cromatográficos se pusieron de 10 a 15 μ l de cada fracción.

En cada gel, para que el proceso fuera homogéneo, se igualaron los volúmenes de las diferentes muestras al mayor de los requeridos añadiendo 0.062 M Tris-ClH pH 6 a las de menor volumen. A todas ellas se les añadió un volumen de medio de muestra (6 % SDS, 40 % p/v de sacarosa, 0,02 % de azul de bromofenol en 0.125 M Tris-ClH pH 6) que fue la mitad del volumen de muestra preparado y se pusieron al baño María a 90-100 °C durante 3 minutos. Posteriormente fueron aplicadas a los geles para iniciar el proceso. El tampón de electroforesis empleado fue Tris 0.025 M, glicina 0.192 M pH 8.5, con un 0.1 % de SDS. Todos los reactivos utilizados en los procesos electroforéticos se prepararon utilizando agua para inyección bidestilada, apirógena, de la casa comercial IBYS.

El proceso electroforético se realizó utilizando una fuente de alimentación no estabilizada. La intensidad fue de 25 mA y 50 V por gel, regulándose manualmente periódicamente. El proceso se mantuvo hasta que el azul de bromofenol se visualizó al final del gel (una hora y media de proceso).

3.5.1.1 Tinción de geles con azul de coomassie R-250

Una vez finalizado el proceso electroforético los geles se pusieron en una cubeta de plástico y se añadió 250 ml de una solución fijadora que contenía el colorante: metanol/acético/agua (40:50:10 v/v), 1 % de azul de coomassie R-250. Los geles se dejaron en esta solución, con agitación suave, durante 20 horas y posteriormente se destiñeron con una solución de metanol/acético/agua (10:10:80), hasta que el fondo estuvo transparente.

MATERIAL Y METODOS

3.5.1.2 Tinción de geles con plata

Se cambió de método de tinción por que este nuevo método valoraba con mayor sensibilidad que el anterior y se necesitaba menor cantidad de muestra. El método es muy similar al descrito para proteínas vegetales por (Blum *et al* 1982), los geles sometidos a electroforesis se fijaron en una solución de metanol/acético/agua 50:12:38: v/v, durante 2 horas. Posteriormente se incubaron durante 17 horas en etanol al 30 %. A continuación los geles se sumergieron en una solución de tiosulfato sódico (50 mg/250ml) durante un minuto, lavándose a seguidamente con agua bidestilada durante 20 segundos, repitiendo este proceso tres veces.

Después de los lavados, el gel se incubó durante 20 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.2 % que contenía 0.03 % de formaldehído y finalizada la incubación se lavó tres veces en agua destilada como en el paso anterior.

El revelado del gel se realizó con una solución de carbonato cálcico al 6 % (p/v), 0.018 % de formaldehído y 0.0004 % de tiosulfato sódico, hasta que se visualizaron las bandas, parándose la reacción sumergiendo el gel en una solución de metanol/acético/agua (50:12:38 v/v).

3.5.2 Detección de alérgenos mediante inmunoelectrotransferencia

La identificación de las proteínas alérgicas se realizó transfiriendo las proteínas de los extractos, una vez separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, a unas membranas inertes de nitrocelulosa de 0.45 m μ de

Bio-Rad o de Inmobilón P (membranas de difluoruro de polivinilidieno) de Millipore, empleando para ello un proceso eléctrico. Estas membranas poseen capacidad para unir proteínas de forma permanente. Inicialmente se usaron las membranas de nitrocelulosa, pero posteriormente se utilizaron las de inmobilón porque se obtenía mayor eficacia en la unión así como más nitidez en las bandas transferidas, aunque el comportamiento de ambos es muy similar. La identificación de los componentes que eran alergénicos se llevó a cabo detectando la IgE específica que se unía a ellos en una reacción inmunoquímica con sueros de pacientes alérgicos al polen del centeno.

El proceso seguido fue el siguiente:

- En cada análisis se transfirieron dos geles, realizados en paralelo con las mismas muestras. Las transferencias se llevaron a cabo mediante un sistema semi-seco, utilizando un aparato Milliblot SDE (Millipore). Este sistema, basado en la metodología de Towbin *et al* (1979), emplea como electrodos dos placas de carbono y los tampones se encuentran embebidos en papel Wathman 3 MM. Dos trozos de este papel, de las mismas dimensiones que el gel se empaparon en Tris 0.3 M, Metanol 10 %, pH 10.4 (tampón 1 del ánodo) y otros dos papeles del mismo tamaño se empaparon en Tris 0.025 M, Metanol 10 %, pH 10.4 (tampón 2 del ánodo). Los papeles con el tampón 1 y 2 se pusieron alineados sobre el ánodo y con una pipeta a modo de rodillo, se ejerció una presión sobre ellos para producir un contacto máximo con el electrodo. A continuación se puso una membrana del mismo tamaño que los papeles, mojada en agua destilada (si la membrana era de inmobilón se sumergió previamente en metanol al 100 % durante un minuto y posteriormente en agua destilada para que se hidratase) y

MATERIAL Y METODOS

sobre ella se colocó el gel, alineándole con los papeles y colocando encima otros tres papeles, de igual tamaño que los anteriores, que contenían el tampón del cátodo: 0.025M Tris 0.040 M ácido 6-aminohexanoico, Metanol 20 %, pH 9.4. Después de formar el sandwich se cerró el circuito eléctrico y se estableció una corriente de 2.5 mA/cm² (para geles de 8x10, 200 mA y 10-20 V) durante 2.5 horas. Una vez finalizado el proceso se visualizó si las proteínas habían sido transferidas tiñendo la membrana con una solución de Ponceau S (Hawkes, R 1986). Esta solución contiene 0.2 % de Ponceau S, un 3 % de ácido tricloroacético y un 3 % de ácido sulfosalicílico.

Posteriormente las membranas se lavaron en agua destilada hasta que desapareció la tinción en su totalidad y se realizaron los siguientes procesos:

- 1) Estabilización de la membrana en Tris ClH 20 mM pH 7.5, 500 mM ClNa (TBS) durante 10 minutos.
- 2) Saturación de la membrana con una solución de suero de ternera fetal al 5 % en TBS, durante dos horas.
- 3) Incubación de una de las membranas durante 18 horas a temperatura ambiente, con una dilución 1/12 de una mezcla de sueros de pacientes (o de cada uno de ellos individualmente, según el análisis) en TTBS (TBS con un 0.05 % Tween 20). Como control de especificidad de la reacción, la otra membrana se incubó de la misma forma, pero utilizando sueros de personas clínicamente no sensibilizadas.
- 4) Dos lavados rápidos y dos lavados de 10 minutos en TTBS
- 5) Incubación durante 6 horas IgG de cabra anti-cadena épsilon de IgE, marcada con peroxidasa (de Tago Inc.).

- 6) Dos lavados rápidos y dos lentos como antes.
- 7) Revelado de la reacción de acuerdo con (Young 1989). La solución de revelado se preparó de la siguiente forma: 10 mg de Diaminobencidina fueron disueltos en 5 ml de metanol (5-15 minutos con agitación) y se mezclaron con 30 mg de 4-Cloronaftol disueltos en 5 ml de metanol. Se añadieron 40 ml de PBS y 10 μ l de H₂O₂, preparado al momento de su uso. Se mantuvieron las membranas en esta solución hasta la visualización de las bandas.

3.5.3 Isoelectroenfoque

Esta técnica se realizó empleando placas de agarosa (Isogel), comercialmente preparadas por FMC, que contenían un rango de anfolitos de 3 a 10. Para el proceso se utilizó un aparato de electroforesis Multiphor II de Pharmacia LKB y una fuente de alimentación Multidrive XL de Pharmacia LKB, estabilizada.

El proceso se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante:

Los geles se pusieron sobre la placa refrigerada del aparato de electroforesis y se secaron con papel de filtro.

Las muestras se prepararon a una concentración de 1-2 mg/ml y se pusieron 15 μ l de muestra, en cada uno de los pocillos del aplicador.

Se empleó ácido acético 0.5 M como anolito y 1M NaOH como catolito, embebidos sobre tiras de papel de electrodo de FMC, específicas para ello.

MATERIAL Y METODOS

El proceso eléctrico se realizó limitando inicialmente la potencia a 1 W durante 10 minutos y posteriormente se limitó la potencia a 25 W y la diferencia de potencial a 1000 V (20 mA de partida), durante 40 minutos.

Una vez finalizado el enfoque las placas se sumergieron en una solución de metanol al 30 %, ácido sulfosalicílico (34.5 g/l) y ácido tricloroacético (115 g/l), durante 1 hora, para precipitar las proteínas. Posteriormente se lavó el gel con agua destilada y se secó poniendo encima varias capas de papel de filtro y un peso de aproximadamente un Kg, durante unos minutos. Después el gel se tiñó durante 5 minutos en una solución de Fast-green (0.1 % Fast-green, 25 % metanol, 10 % ácido acético, 65 % agua destilada), destiñéndose después con la misma solución pero sin el colorante, hasta que el fondo fue transparente. Una vez desteñidas las placas se secaron con papel de filtro y peso encima como antes se explicó y finalmente se secaron totalmente con aire caliente.

3.5.3.1 Isoelectroenfoque en presencia de detergente y urea

El análisis de los componentes integrantes de la bandas de 48, 30 y 33 kDas, obtenidas a partir del polen de 1987 se llevó a cabo mediante isoelectroenfoque en presencia de detergente (n-octil-glucopiranosido) y urea. El proceso se realizó de acuerdo con las siguientes instrucciones del fabricante de las placas: se prepara una solución con 1.38 g de urea y 0.02 % detergente en 2 ml de agua destilada calentándose al baño María hasta su disolución. Se ponen 500 μ l de esta solución en el centro de la placa de agarosa. Con un trozo de "Gel-Bound", ligeramente mayor que la placa, se distribuye por toda la superficie del agar. Para ello se coge el plástico por los bordes, formando un arco con la cara hidrofóbica hacia abajo, y se apoya ésta

sobre la gota de la solución de urea, desdoblado el film poco a poco para que el líquido se distribuya por toda la superficie evitando que se formen burbujas. Se levanta a continuación el plástico y se repite el proceso dejando el "Gel-Bound" sobre la placa por espacio de 30 minutos. A continuación se levanta el plástico y se seca con un trapo limpio que no deje pelusas, arqueándolo nuevamente y poniéndole sobre el gel para retirar el exceso de líquido, proceso que se repite dos veces. A continuación se sigue el protocolo de siempre.

Las muestras contenían un 1 % urea y un 0.06 % de detergente antes de ser aplicadas.

El resto del proceso se realizó siguiendo el protocolo anterior.

3.5.3.2 Inmunodetección de alergen

La identificación de proteínas reactivas, entre las separadas mediante isoelectroenfoque, se realizó transfiriendo éstas a una membrana de Nitrocelulosa o de Immobilon por presión durante al menos dos horas. Sobre las placas se pusieron las membranas, previamente hidratadas, a continuación varias capas de papel de filtro 3MM y finalmente un vidrio con un peso de aproximadamente un Kg encima. Posteriormente las membranas se incubaron con sueros de pacientes sensibilizados al polen del estudio y se revelaron de la misma forma que se describió en la inmunoelectrotransferencia. En cada incubación se realizó el control correspondiente con sueros de personas clínicamente no sensibilizadas

3.6 IDENTIFICACION DE ALERGENOS MEDIANTE LA TECNICA DE "DOT-IMMUNOBINDING"

Esta técnica se ha realizado con un aparato Bio Dot de la casa Bio-Rad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se describen a continuación:

- 1) Se mojó en agua destilada una membrana de nitrocelulosa o de Inmobilon (ésta última previamente sumergida unos instantes en metanol al 100 %), se colocó en el aparato y se puso la tapa, que contiene 96 pocillos abiertos. Se cerró ésta herméticamente, de forma que la membrana quedaba formando el fondo de cada pocillo. Se conectó un sistema de vacío y se ajustó en estas condiciones el cierre para evitar que se produjeran pérdidas de líquido en los pocillos. Con el sistema de vacío desconectado se hidrató de nuevo la membrana añadiendo 200 μ l de TBS a cada pocillo, y succionando posteriormente.
- 2) Se pusieron 300 μ l de TTBS que contenían 3 μ g de proteína del extracto a valorar. La cámara se dejó abierta a la presión atmosférica, para que el líquido pasara a través de la membrana por gravedad y se produjera una unión eficaz de las proteínas.
- 3) Cuando hubo pasado todo el volumen de la muestra, se lavó 4 veces con 300 μ l de TTBS, succionando con vacío.
- 4) Bajo estas condiciones de succión se abrió la cámara y después se cerró el vacío recogiendo la membrana la cual se llevó a una solución saturante (TTBS 5 % suero de ternera fetal) para evitar uniones inespecíficas, y se mantuvo en esta solución durante dos horas.

- 5) Posteriormente se incubó durante 18 horas con una mezcla de sueros de pacientes, clínicamente diagnosticado como sensibilizados al polen de centeno, o con cada uno de ellos individualmente, disueltos 1/12 en TTBS y 5 % suero de ternera fetal.
- 6) Se lavaron las membranas con TTBS, dos lavados cortos y otros dos de 10 minutos con agitación suave.
- 7) A continuación se incubaron las membranas con IgG de cabra anti IgE humana (específica contra cadena épsilon), marcada con peroxidasa (de Tago Inc) diluida 1/1500, en TTBS.
- 8) Se lavó con TBS dos periodos cortos y dos de 10 minutos cada uno, con agitación.
- 9) Se revela según el protocolo de Young (1989), anteriormente descrito.

3.7 VALORACIONES DE PROTEINA

3.7.1 Método de Lowry (1951)

Este método se basa en la reacción colorimétrica (color azulado con un máximo de absorción a 745-750 nm) que se produce cuando una proteína induce la reducción de la mezcla de ácidos del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico y tungstico).

Para la elaboración de la curva patrón se preparó una dilución de seroalbúmina bovina a 1mg/ml, calculando la concentración preparada de forma exacta a partir de la absorvancia de la solución a 280 nm. Las concentraciones de los tampones empleados no producen interferencias con

MATERIAL Y METODOS

el método de valoración, por lo que la curva se calculó diluyendo en agua destilada la proteína.

Se pipetearon 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μl de la solución de albúmina y 25 ó 50 μl de la muestra a valorar, en diferentes tubos y se completa el volumen a 200 μl con agua destilada.

Se mezcló 1 ml de sulfato de cobre, pentahidratado, al 2 % con un ml de tartrato potásico al 4 % y 48 ml de carbonato sódico al 5 % en 0.2 M hidróxido sódico.

Se añadió, con agitación en vortex, un ml de la mezcla a cada uno de los tubos que contenían las proteínas a valorar y de la curva, incubando la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se diluyó el reactivo de Folin al 50 % con agua destilada y se añadieron a cada tubo, con agitación en vortex, 100 μl de la dilución, al final de los 10 minutos de incubación en la solución anterior. Se dejó reaccionar la mezcla durante 30-50 minutos y se midió el color producido mediante absorvancia a 750 nm. Los valores de las muestras se calculan a partir de los obtenidos en la curva patrón.

3.7.2 Método de Bradford (1976)

Este método se basa en la medición por absorvancia a 465- 595 de la reacción colorimétrica que se produce cuando el Coomassie Brilliant Blue se une a la proteína.

Los reactivos para la valoración de proteínas por este método se compraron a Bio-Rad, siguiéndose el protocolo descrito por el fabricante. Se empleó albumina bobina para la obtención de la curva patrón.

3.7.3 Método de Warburg y Christian (1942)

Este Método valora la cantidad de proteína en función de una relación matemática entre la absorvancia de la muestra a valorar a 260 nm y a 280 nm. La relación matemática es :

Concentración (en mg/ml) = 1.55 x absorvancia a 280nm - 0.77 x absorvancia a 260nm.

3.7.4 Método de Kalb y Bernlohr (1977)

Análogamente al Método anterior este método se basa en una relación matemática entre las absorvancias de la muestra a dos longitudes de onda en el espectro de Ultra-Violeta. La lectura se realiza a 230 y a 260 nm y la relación para el calculo de la concentración es la siguiente:

Concentración (en $\mu\text{g/ml}$) = 184 x absorvancia a 230nm - 81.7 x absorvancia a 260nm.

3.8 PROCESOS CROMATOGRÁFICOS

3.8.1 Cromatografía de intercambio aniónico

Esta cromatografía se ha realizado con extractos obtenidos a partir de pólenes recolectados en 1987.

Tres gramos de polen se resuspendieron en 60 ml de PBS y se incubaron con rotación suave durante 30 minutos a 4-8 °C. A este tiempo la suspensión se centrifugó a 8500 rpm en un rotor SS 34 de Sorvall, recogándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en otros 60 ml de tampón. La incubación se continuó durante 18.5 horas, recogándose el sobrenadante

MATERIAL Y METODOS

mediante centrifugación de la suspensión de forma análoga a la anterior. Los dos sobrenadantes recogidos se filtraron sucesivamente a través de los filtros HVLP 0.45 μ m y GVWP 0.2 μ m de Millipore . Al primero de ellos se le denominó extracto E30 y al segundo E30-19.

Ambos extractos fueron dializados contra Tris-ClH 150 mM pH 8. Una vez equilibrados en este tampón se fraccionaron 60mg del primer extracto y 100 mg del segundo, en una columna de celulosa DEAE-32 de Whatman, de 1.8 x 19 cm equilibrada con el mismo tampón. La elución de las proteínas se realizó con incrementos sucesivos de la concentración de ClNa en el tampón (10mM, 50mM, 100mM, 200m y 500mM). El flujo fue de 50 ml/hora y se mantuvo constante con una bomba peristáltica Peristaltic Pump P-1 de Pharmacia. Las fracciones contenían 1.5 ml, si el eluido contenía proteína y de 5 ml si la absorbancia a 280nm era inferior al 3 %. Los cambios en la concentración del tampón se realizaron cuando la absorbancia del eluido con el tampón anterior llegaba a cero.

3.8.2 Cromatografía de exclusión molecular

Todos los procesos cromatográficos realizados mediante exclusión molecular se han llevado a cabo en un sistema de alta resolución FPLC de Pharmacia utilizando una columna de Superosa TM 6 de 1 x 30 cm.

3.8.2.1 Purificación de la banda de 48 kDa, a partir del polen de 1987.

La muestra de la que se partió para la purificación de esta banda fue la obtenida entre 1 hora y 20 horas de incubación ácida en la preparación de extractos con cambios sucesivos de tampón antes descrita. Los 10 ml de extracto obtenido se encontraban a una concentración de 1.04 mg/ml. Se le

añadieron 40 ml de $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM , 500 mM ClNa , pH 7.4 y se concentro de nuevo hasta 10 ml mediante un sistema de concentración de Amicon con capacidad de 50 ml y empleando un filtro PM 10. De nuevo se añadieron otros 40 ml de tampón fosfato y se volvió a concentrar hasta 5 ml. En este cambio de tampón y concentración de la muestra se observó una precipitación importante de ésta. Se concentraron posteriormente estos 5 ml mediante centrifugación en un Centricon 10 de la casa Amicon hasta reducirlos a un volumen de 150 μl , que contenían 4.5 mg de proteína.

Una vez concentrada y cambiada de tampón se aplicaron 100 μl (3 mg) de la muestra en la columna de exclusión molecular. La elución del proceso se realizó con tampón $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM , 500 mM ClNa , pH 7.4 a un flujo de 0.3 ml/mínuto. Las fracciones recogidas contenían 0.3 ml.

El proceso se escaló a nivel preparativo partiendo de 5 gramos de polen y 100 ml de tampón glicina ClH 10 mM, 150 mM ClNa pH 3. Análogamente se obtuvieron extractos parciales de 15 minutos 1h y 20h. Este último extracto se concentro en un sistema Amicon con una membrana PM 10 hasta un volumen de 3.5 ml, esta vez sin cambio de tampón, observándose que aunque se producía algo de precipitación era menor. Se cargaron 400 μl de esta muestra (11 UO) sobre la columna, eluyendose con el tampón ácido en el que se había preparado la muestra, a un flujo de 0.3 ml/min recogándose fracciones de 0.3 ml. El proceso cromatográfico se realizó 4 veces más.

3.8.2.2 Purificación de la banda de 48 kDa a partir de pólenes recolectados en 1991.

Teniendo en cuenta las diferencias en las cinéticas de emisión del nuevo polen se realizó una extracción preparativa recogiendo extractos parciales a

MATERIAL Y METODOS

los siguientes tiempos: 1,5,30 minutos 1, 4, 20 horas. La cantidad de polen fue de 20 gramos y se incubaron en 400 ml de tampón glicina ClH 10 mM, 150 mM ClNa pH 3, en un frasco de 500 ml con boca ancha y tapón hermético, con agitación manual en los 5 primeros minutos de extracción, el resto de la incubación se realizó mediante rotación suave. La succión por vacío se llevó a cabo sobre papel de filtro en un embudo büchner de 15 cm de diámetro, empleándose en la filtración tiempos inferiores a un minuto.

La muestra seleccionada para la cromatografía fue el extracto recogido entre 1 y 4 horas de incubación ácida. Una alícuota de 100 ml de los 400 preparados en esta extracción (a 0.35 mg/ml) se concentraron hasta 5 ml (a 2.35 mg/ml) sin cambio de tampón, apreciándose precipitación importante. Tras la centrifugación de la muestra se sometieron a cromatografía 500 µl de muestra (1,2 UO) realizándose la elución con el mismo tampón ácido, a un flujo de 0.3 ml/min y recogiendo fracciones de 0.3 ml. El proceso se realizó 6 veces.

3.8.3 Cromatografía de intercambio catiónico

Los procesos cromatográficos de intercambio catiónico se han realizado en un sistema de alta resolución FPLC de Pharmacia utilizando una columna de vidrio SP-5PW de Waters, con unas dimensiones de 8.0 x 75.0 mm.

3.8.3.1 Muestras del polen de 1987

Las fracciones que contenían los componentes de 30 kDa, recogidas en la cromatografía de exclusión molecular de la fracción ácida obtenida del polen de 1987 a nivel preparativo, fueron mezcladas y sometidas a cromatografía de intercambio catiónico. De 6 procesos preparativos se cogieron las fracciones

comprendidas entre la 58 y la 64 (ambas inclusive), obteniéndose un volumen de 10 ml de muestra con una DO a 280 nm de 1.311 U.O. Se cambiaron de tampón mediante dos lavados consecutivos de 40 ml de tampón acetato-acético 10 mM pH 4.85 en un sistema de concentración Amicon, utilizando una membrana PM 10, concentrando cada vez la muestra a 10 ml. Se ponen en la columna 1,8 unidades ópticas en 1.5 ml de muestra, y se comienza la elución que se realiza con 45 ml de un gradiente lineal de ClNa de 0 a 500mM. El flujo fue de 0.3 ml/min recogiendo fracciones de 0.5 ml.

3.8.3.2 *Extracto de 4 horas en medio ácido del polen de 1991.*

De la extracción preparativa realizada con el polen de 1991 en medio ácido, descrita anteriormente, se toman 20 ml del extracto de 4 horas. Se cambia de tampón ácido a acetato-acético 10 mM pH 4.8, en un sistema de concentración Amicon y una membrana MP 10 como en otros procesos descritos.

Se aplican a la columna SP-5PW, 20 ml de muestra (dos veces 10 ml). La elución se realizó con 40 ml de un gradiente lineal de ClNa de 0 a 500 mM. A continuación se pasaron 5 ml de tampón a una concentración de ClNa 500 mM y posteriormente 10 ml de 1 M. El flujo del proceso fue de 0.5 ml/min, recogiendo fracciones cada minuto.

3.9 PRUEBAS DE ALERGENICIDAD IN VIVO

La comprobación in vivo de la alergenidad de los componentes purificados en el presente estudio, se ha llevado a cabo mediante la realización de pruebas cutáneas por el método del "Prick-test".

MATERIAL Y METODOS

La banda de 48 kDa, separada del polen de 1987 mediante exclusión molecular, fue ensayada a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ en PBS.

Los componentes separados a partir del polen de 1991, se ensayaron a dos concentraciones diferentes:

Fracciones recogidas mediante intercambio iónico:

- Fracción 56 (componente de 27 kDa) se ensayó a 35 $\mu\text{g/ml}$ y a 3,5 $\mu\text{g/ml}$.
- Fracción 59 (componente de 48 kDa) se ensayó a 30 $\mu\text{g/ml}$ y a 3 $\mu\text{g/ml}$.
- Fracción 65 (componente de 30 kDa) se ensayó a 26.5 $\mu\text{g/ml}$ y a 2.6 $\mu\text{g/ml}$.

El componente de 48 kDa, recogido en las fracciones 57, 58 y 59 en la cromatografía de exclusión molecular, fue ensayado a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$.

Las muestras se concentraron y cambiaron de solvente ácido a PBS con un 0,2 % de albúmina humana, mediante centrifugación, empleando un sistema concentrador de la casa Amicon (centricon 30) que posee una membrana del tipo YM.

En todos los casos se utilizó como control positivo clorhidrato de histamina (de Bencard) a una concentración de 10 mg/ml y como control negativo una solución salina al 0,9 %.

El test se llevó a cabo por duplicado (ambos brazos del paciente), valorándose el resultado a los 15 minutos de evolución de la reacción. Se midió el tamaño de las pápulas desarrolladas, aplicando sobre éstas una cinta

MATERIAL Y METODOS

adhesiva y marcando el contorno de las mismas con un rotulador. El área fue estimado sobreponiendo las marcas en un papel milimetrado y contando los milímetros cuadrados incluidos en los contornos. Los valores expresados en los resultados son la media de las valoraciones de ambos brazos.

RESULTADOS

Para conocer cómo libera el polen del centeno sus proteínas y alérgenos durante el proceso de incubación, se han realizado en el presente trabajo varios estudios. Todos ellos se basan en la comparación de los componentes extraídos mediante una incubación continuada (extracto total) con los que se recogen, a tiempos intermedios, en otro proceso de incubación realizado en paralelo (extractos a tiempos parciales). La selección de los tiempos de extracción se hizo teniendo en cuenta las características botánicas del polen de centeno y su comportamiento en un medio acuoso.

Las incubaciones se han realizado con diferentes tampones y se ha analizado el comportamiento de pólenes recogidos por un mismo recolector en diferentes años y de pólenes de diferentes suministradores.

4.1 INCUBACIONES EN TAMPON FOSFATO

4.1.1 Pólenes de J. A. Jiménez, recolectados en 1987

De acuerdo con lo descrito en material y métodos, los extractos totales (ET) de estos primeros estudios se prepararon incubando el polen de centeno durante 19 horas. Los extractos parciales se obtuvieron recogiendo la proteína extraída mediante centrifugación, y resuspendiendo de nuevo el polen, a los siguientes tiempos: 1, 5 y 30 minutos, 1, 2, 4, y 19 horas (extractos E1, E5, E30, E1h, E2h, E4h, y E19h respectivamente).

Se obtuvo además un tercer extracto, rompiendo el polen mediante sonicación (ES), con objeto de comparar las proteínas solubles que contenía el polen y las que se extraían durante las incubaciones. Para ello se preparó

RESULTADOS

una suspensión de la misma forma que las anteriores, e inmediatamente después fue sonicada y centrifugada recogándose en el sobrenadante las proteínas liberadas.

4.1.1.1 Recuento de pólenes rotos

En el estudio se ha tenido en cuenta la potencial ruptura de los pólenes durante el proceso de incubación, hecho que produciría la liberación de sus proteínas citoplasmáticas al medio, modificando por lo tanto los resultados. Por esta razón, al final de cada extracción se realizó, mediante microscopía óptica, un recuento de los pólenes rotos que había en el sedimento recogido.

En la tabla 4.I se muestran los resultados del recuento en cada una de las extracciones realizadas. La baja proporción de roturas refleja que las proteínas han sido liberadas al medio según su cinética de emisión y no porque los pólenes se hayan abierto. También se observa que a lo largo de las incubaciones a tiempos parciales, la proporción de pólenes rotos es similar a la que se produce durante la incubación continuada. Este resultado indica que el proceso de obtención de extractos parciales, no incrementa el número de roturas de pólenes.

El recuento realizado en el sedimento obtenido en la extracción mediante sonicación, mostró un alto porcentaje de pólenes rotos. Según esta observación, se habrían extraído la mayor parte de las proteínas solubles del polen incluidas las localizadas en el citoplasma.

RESULTADOS

Extracto valorado	Proteína extraída (en mg)	Porcentaje respecto al total	Porcentaje de pólenes rotos
ES	5.37 ± 1.10	—	92%
ET	5.05 ± 0.80	100 %	8%
E1	1.15 ± 0.20	22.8%	2%
E5	0.81 ± 0.09	16.0%	2%
E30	0.76 ± 0.13	15.0%	6%
E1h	0.40 ± 0.05	8.0%	6%
E2h	0.40 ± 0.03	7.9%	7%
E4h	0.34 ± 0.08	6.7%	7%
E19h	0.87 ± 0.18	17.2%	7%

TABLA 4.I

Resultados de la valoración de proteína en los extractos obtenidos mediante incubación ininterrumpida del polen del centeno (ET) y a tiempos parciales (E1, E5, E30, E1h, E2h, E4h y E19h), y mediante sonicación del polen(ES). Los resultados son la media de 8 experimentos ± desviación estandar media. En cada uno de los extractos se muestra el resultado del recuento de pólenes rotos realizado en el correspondiente sedimento, expresado en %.

4.1.1.2 Liberación de proteínas al medio de incubación

Los resultados de la valoración de proteína en los diferentes extractos del estudio, se describen en la tabla 4.I. Se observa que la cantidad de proteína liberada por el polen durante 19 horas de incubación ininterrumpida (ET), es la misma que la obtenida por ruptura del polen mediante sonicación (ES).

Cuando se comparan las cantidades de proteína que se han ido recogiendo durante las incubaciones a tiempos parciales con la extraída en la incubación continuada, observamos que: el 38.8 % del total se libera durante los cinco

RESULTADOS

primeros minutos de incubación, un 15% se libera durante los siguientes 25 minutos y la restante proteína emitida (39.8%) sale del polen entre 30 minutos y 19 horas, cada vez en menor proporción. Debe hacerse notar que se recoge un 6.4% menos de proteína mediante extracciones parciales que en la extracción no interrumpida.

El estudio analítico de los componentes proteicos de los extractos, se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de detergente (SDS). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1. Comparando el perfil electroforético del extracto total, con el de cada uno de

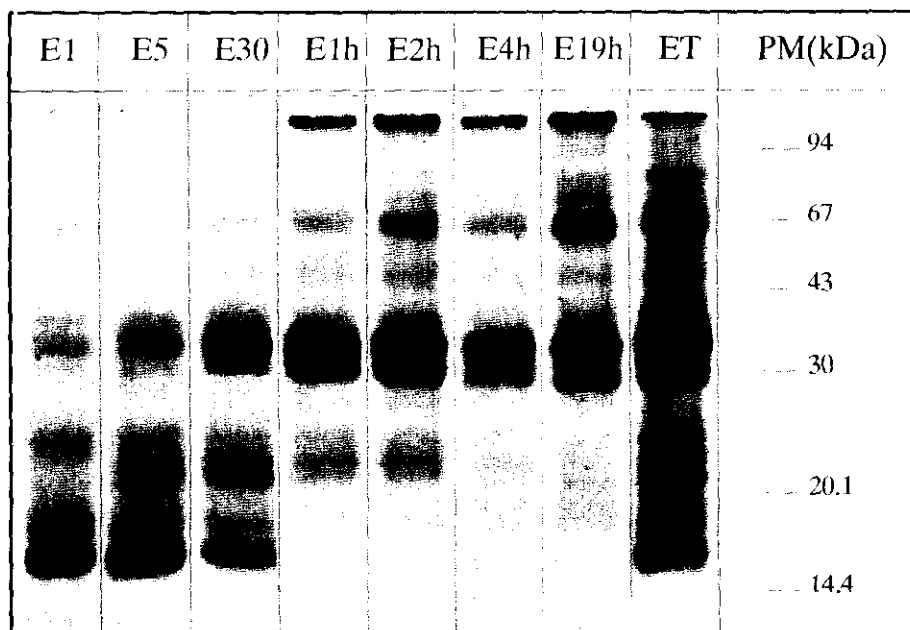


Figura 4.1

Estudio comparativo mediante SDS-PAGE de las proteínas de los extractos parciales (E1, E5, E30, E1h, E2h, E4h y E19h) y del extracto total (ET). Se sometieron a electroforesis 60 μ g de cada fracción y la tinción se realizó con CBB- R250.

los extractos parciales, puede verse que las proteínas mayoritarias del polen de centeno son liberadas en orden creciente de peso molecular. Se observa que la mayor parte de las proteínas inferiores a 20 kDa, se liberan durante los 30 primeros minutos de incubación. Las proteínas con pesos moleculares entre 28 y 20 kDa se liberan mayoritariamente durante los primeros 30 minutos, pero su extracción continúa hasta las dos horas de incubación. En el extracto de 30 minutos se comienza a recoger una alta proporción de proteínas de 28 y 33 kDa, manteniéndose alto el porcentaje hasta el final del proceso. El componente de 67 kDa muestra su máxima proporción de extracción en la última incubación.

La comparación de los perfiles electroforéticos del extracto total y el del extracto sonicado, puso de manifiesto que existe una distribución de bandas similar en los dos extractos, pero la proporción de proteínas de pesos moleculares cercanos a 30 kDa es, sin embargo, muy inferior en el extracto sonicado (figura 4.2).

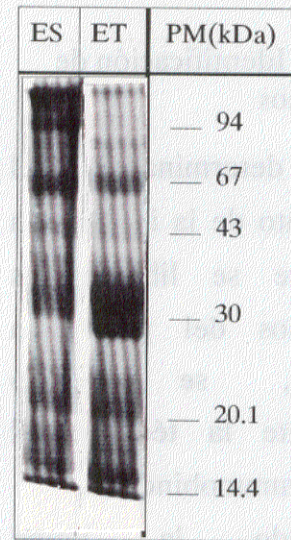


Figura 4.2

Perfiles electroforéticos de las proteínas de los extractos obtenidos mediante 19 horas de incubación ininterrumpida del polen de centeno (ET) y mediante sonicación del mismo (ES). Tinción realizada con CBB-R250

RESULTADOS

4.1.1.3 Identificación de alérgenos

La determinación del momento de la incubación en que se liberan los alérgenos del polen en estudio, se realizó mediante la técnica del "Dot-immunobinding",

valorando la unión específica de IgE a las proteínas de cada uno de los extractos parciales obtenidos. En el estudio se ensayaron individualmente 18 sueros de pacientes alérgicos al polen de centeno. Los resultados (figura 4.3), ponen de manifiesto que a pesar del alto porcentaje de proteína

extraída durante los 5 primeros minutos, el contenido alérgénico en los extractos es bajo. Esto podría suponer que las proteínas de peso molecular inferior a 28 kDa, que son los componentes mayoritarios liberados en los primeros periodos, no fueran alérgicas. El incremento en reactividad de las

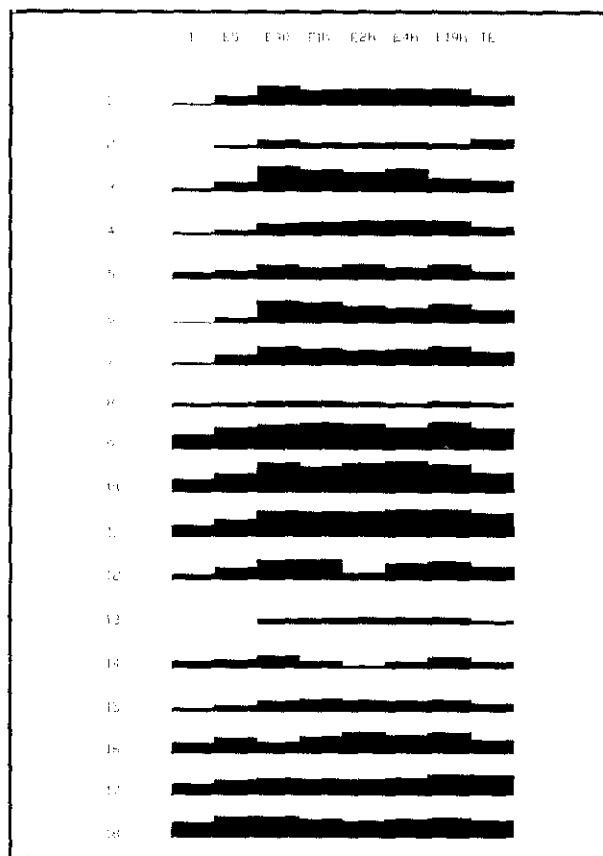


Figura 4.3

Representación gráfica de la unión específica de IgE a las proteínas de los extractos parciales y total, obtenidos por incubación del polen de centeno. La valoración se realizó mediante la técnica de Dot-immunobinding

RESULTADOS

extracciones a tiempos más largos, es coincidente con el aumento de intensidad en las bandas de 28 y 33 kDa, lo cual sugiere que éstas incluyen algún alérgeno.

La determinación del peso molecular de los componentes reactivos del polen se hizo mediante inmunoelectrotransferencia. Las proteínas de los distintos extractos parciales y del extracto total, separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, detectándose posteriormente a cuáles de ellas se unía específicamente la IgE. Los

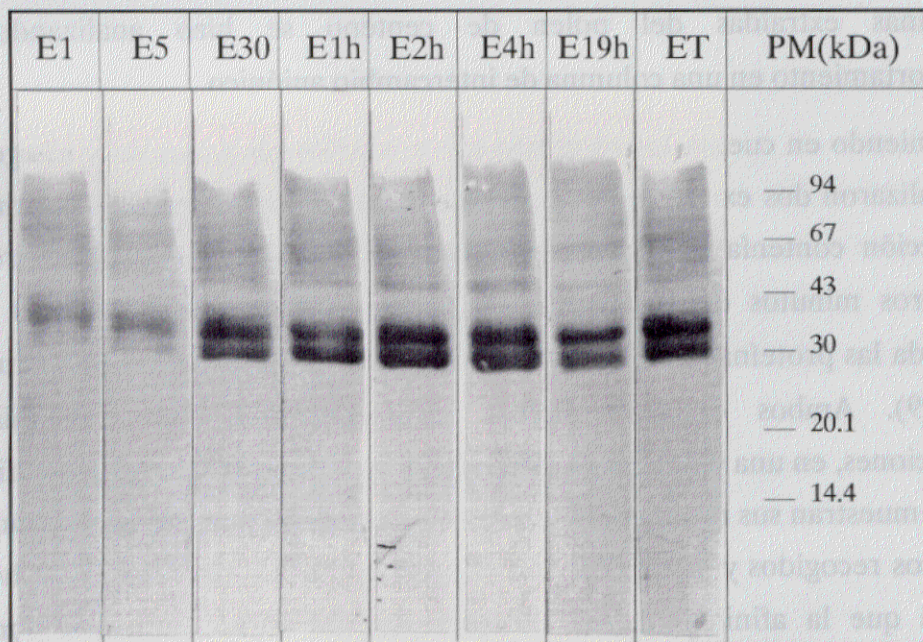


Figura 4.4

Identificación, mediante inmunoelectrotransferencia, de los componentes alérgicos de los extractos parciales y del extracto total del polen de centeno.

RESULTADOS

resultados (figura 4.4) confirmaron la suposición: los componentes de bajo peso molecular no fueron reactivos, mientras que aquellos de 28, 33, 48 y 67 kDa unieron IgE de forma específica.

De acuerdo con todo esto, los alergenicos del polen de centeno son proteínas de peso molecular superior o igual a 28 kDa, las cuales se extraen del polen, en mayor proporción, después de los cinco primeros minutos de incubación.

4.1.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

Los primeros estudios sobre las características de carga molecular de las proteínas extraídas del polen de centeno se hizo analizando su comportamiento en una columna de intercambio aniónico.

Teniendo en cuenta los resultados sobre emisión de proteínas y alergenicos, se realizaron dos extracciones consecutivas con el mismo polen. La primera extracción contenía la proteína liberada por el polen durante los treinta primeros minutos de incubación en tampón fosfato (extracto E30) y la segunda las proteínas que se liberaron entre 30 minutos y 19 horas (extracto E30-19). Ambos extractos fueron subfraccionados, bajo las mismas condiciones, en una columna de celulosa DEAE-32 de Whatman. En la figura 4.5 se muestran sus respectivos perfiles de elución. Se observa que el número de picos recogidos y su distribución es igual en los dos procesos. Este hecho refleja que la afinidad de los componentes de ambos extractos por los radicales de la columna es similar. Sin embargo, la proporción de proteína en los picos 1, 2, 7 y 8 con respecto a los otros picos, es mayor en el extracto E30-19 que en el E30. Si se considera que la cromatografía se realizó en un

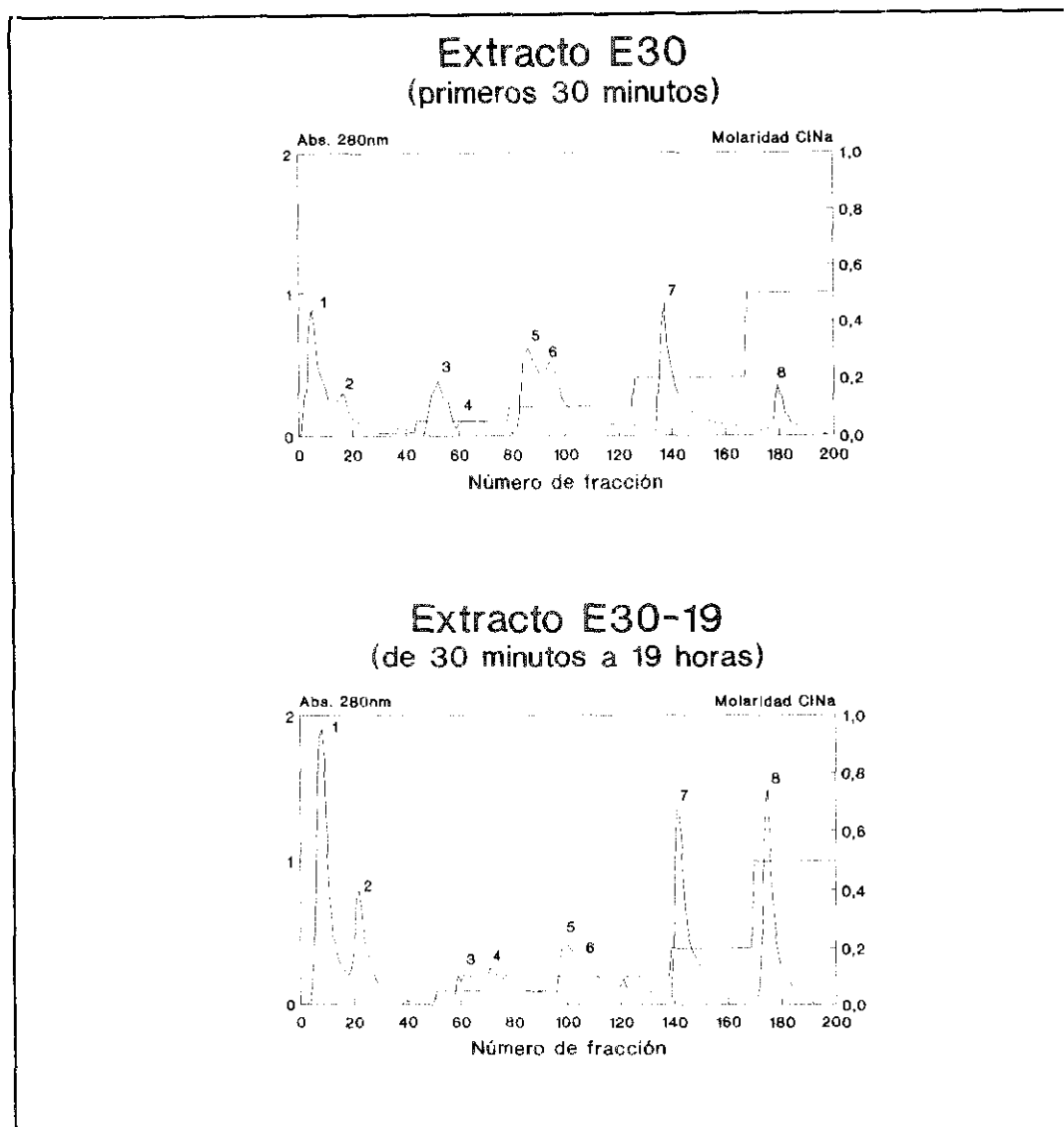


Figura 4.5

Perfiles de elución de las cromatografías de intercambio iónico, realizadas en una columna de DEAE-32 con los extractos E30 y E30-19. Los números identifican aquellos picos posteriormente estudiados.

RESULTADOS

tampón a pH 8, estos resultados indican que después de 30 minutos de incubación, las sustancias liberadas por el polen son mayoritariamente básicas y ácidas, mientras que las neutras se encuentran en un pequeño porcentaje.

La detección de alérgenos en los distintos picos cromatográficos se realizó mediante la técnica del "Dot-immunobinding", valorando la IgE específica que se unía a las proteínas de cada uno de ellos. El ensayo se realizó individualmente, con cada uno de los sueros de los 18 pacientes seleccionados. En este estudio no se consideraron como independientes los picos 5 y 6 eluidos del extracto E30-19 por el alto solapamiento de ambos.

Los resultados indican que la mayor proporción de alérgenos se encuentra en las fracciones más básicas de ambos procesos, aunque son significativamente más reactivas las del segundo extracto (figura 4.6). El pico 7 del primer extracto no unió IgE específica, mientras que en el equivalente del segundo se detectó uno de los valores máximos, particularmente con el suero del paciente número 11. Este dato refleja que hay algún alérgeno ácido que se extrae del polen después de 30 minutos de incubación. Los picos 3, 4, 5 y 6 unen cantidades similares de IgE en los dos extractos, pero siempre con valores muy inferiores a los de los picos básicos.

El estudio analítico de las proteínas de cada pico se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS. Los resultados, se muestran en la figura 4.7. Con respecto a las bandas mayoritarias, se observa que la banda reactiva de peso molecular 67 kDa se recoge en el primer pico de ambos procesos, lo cual indica que es una proteína básica.

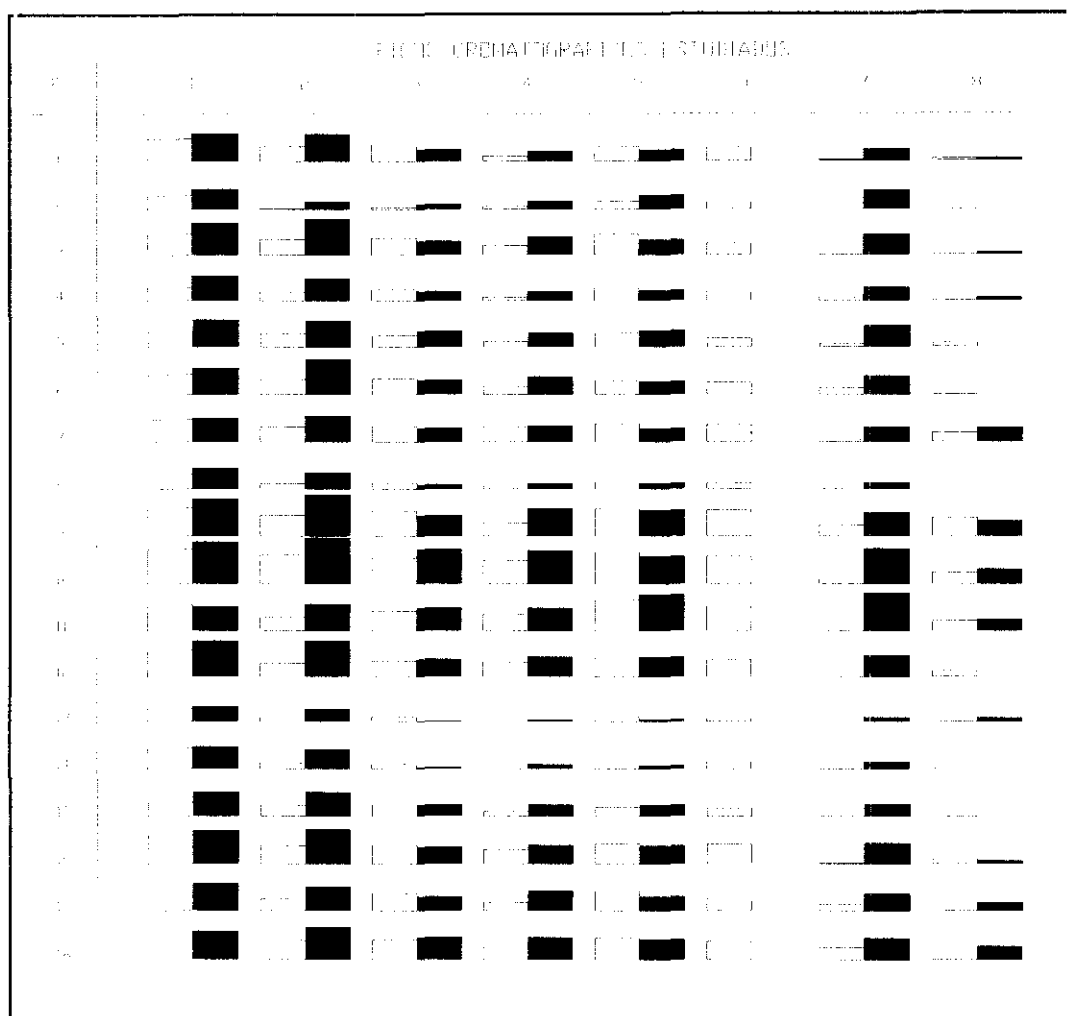


Figura 4.6

Representación esquematizada de la cantidad de IgE específica unida a los componentes de los diferentes picos recogidos en la cromatografía de intercambio aniónico (DAE-32), de los extractos E30 (□) y E30-19 (■). P = N° de paciente estudiado.

RESULTADOS

La banda de 48 kDa no se detecta claramente en ninguno de los picos. Cabe pensar que esta banda esté formada por varias proteínas con el mismo peso molecular y diferente carga, las cuales se recogerían en diferentes picos. Debido a la pequeña proporción en la que se encuentra esta banda en el extracto de partida, el desdoblamiento en varios componentes puede ser la causa de que no se visualice.

Las bandas con movilidad próxima a 30 kDa se encuentran en prácticamente todos los picos de ambos procesos, pero en el primer pico del extracto E30-19, hay dos bandas en una alta proporción, mientras que en el de los demás solo hay una, con diferentes movilidades. Se observa que en el pico 7 del extracto E30-19 hay un aumento de tinción en los componentes de peso molecular 30 kDa, con respecto a la detectada en el mismo pico del extracto E30. Es posible que el incremento pueda estar asociado con el aumento de alergenicidad detectado en el pico 7 del extracto E30-19.

Las proteínas de menor peso molecular se eluyen en una alta proporción en todos los picos del extracto E30.

Todos estos estudios reflejan que la segunda extracción contiene una mayor proporción de alérgenos. El paralelismo encontrado entre los picos de elución y entre los perfiles electroforéticos de los componentes de ambos extractos, sugiere que algunos alérgenos del extracto E30-19 han comenzado a ser extraídos antes de los 30 minutos, por lo que también se encuentran en el extracto E30.

A la vista de estos resultados se realizó un nuevo diseño de extracción para conocer como se liberaban las proteínas entre 5 y 30 minutos. Las interrupciones de la incubación en este nuevo diseño de extracción se

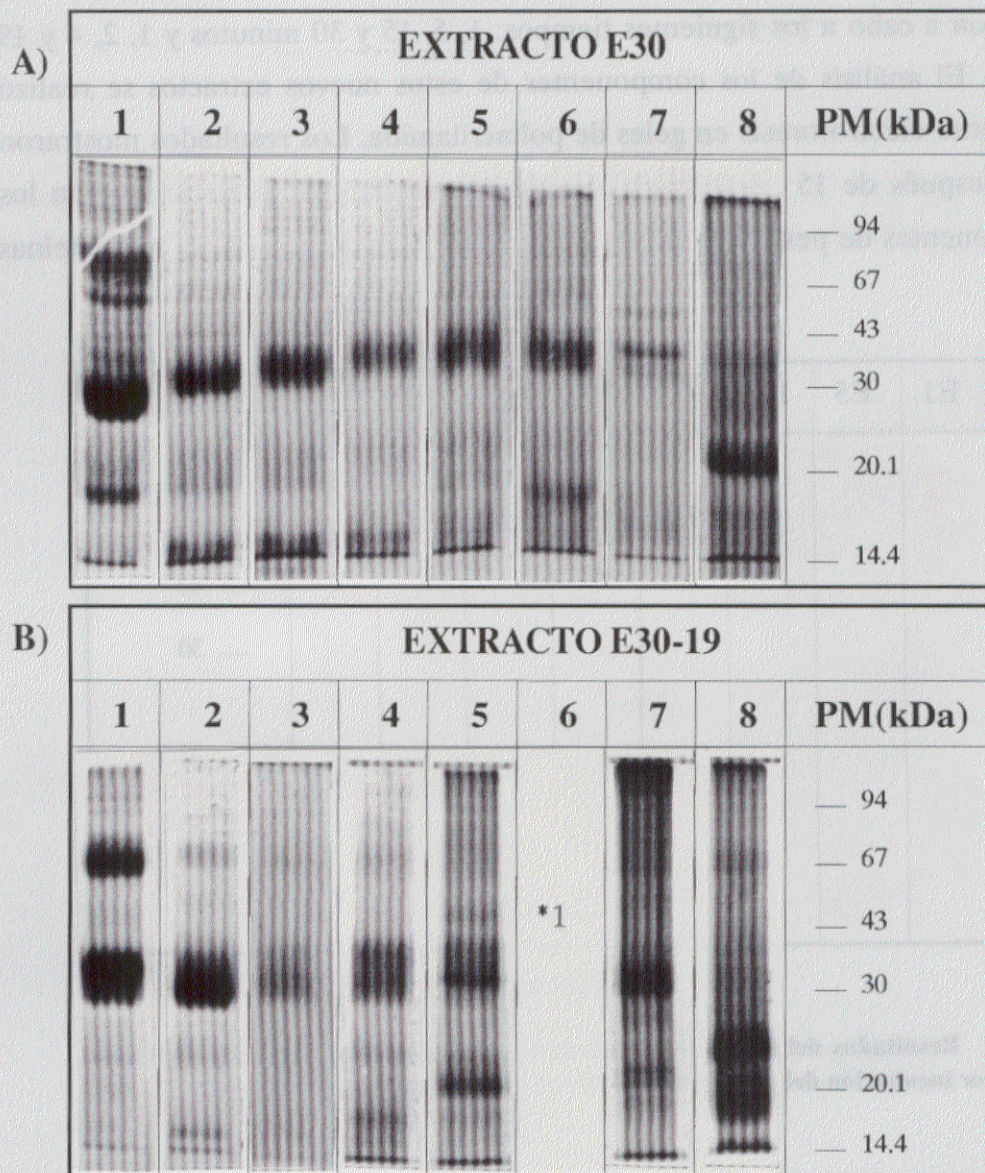


Figura 4.7

Perfiles electroforéticos de los componentes de los picos obtenidos mediante cromatografías de intercambio aniónico (DEAE-32) de los extractos E30 (figura A) y E30-19 (figura B). Los números indican el pico cromatográfico analizado.

*1: Pico no analizado.

RESULTADOS

llevaron a cabo a los siguientes tiempos: 1, 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4 y 19 horas. El análisis de los componentes de estos nuevos extractos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados mostraron que después de 15 minutos de incubación prácticamente no se liberan los componentes de peso molecular inferior a 20 kDa (figura 4.8). Las proteínas

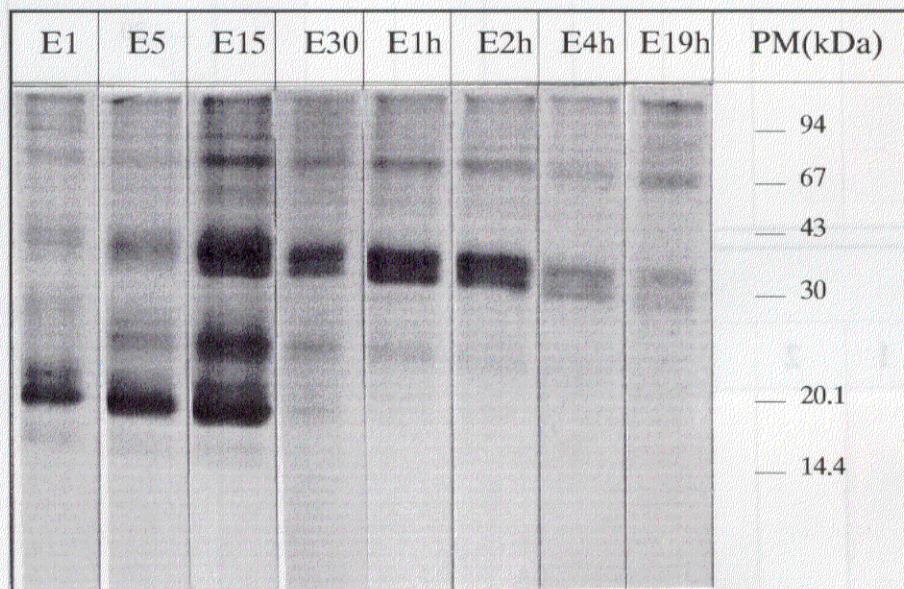


Figura 4.8

Resultados del estudio electroforético de los extractos parciales obtenidos por incubación del polen del centeno con nuevos tiempos de incubación.

extraídas en el extracto de 30 minutos fueron similares a las de una hora, y las recogidas en el extracto de 2 horas eran similares a las 4 horas, por lo que en

sucesivos estudios los tiempos de las extracciones parciales fueron: 1, 5 y 15 minutos y 1, 4 y 19 horas.

4.1.2 Pólenes de Allergon y Sigma

En la fase inicial del presente trabajo, se utilizaron indistintamente pólenes de dos lotes diferentes que no mostraban entre sí diferencias significativas. Ambos pólenes habían sido recolectados en el año 1987 y servidos en el año 1988 con unos meses de diferencia. Ante la imposibilidad de que el mismo suministrador proporcionara la cantidad de polen necesaria para un estudio preparativo, se solicitaron pólenes a dos casas comerciales diferentes: Allergon y Sigma. El primero de ambos, suministra pólenes a una gran parte de los laboratorios farmacéuticos europeos para la preparación de vacunas y extractos de diagnóstico.

El comportamiento de estos pólenes durante el proceso de incubación en tampón fosfato, fue estudiado de forma análoga al polen anterior. Se obtuvieron extractos totales y parciales incubando, simultáneamente, los pólenes de los tres suministradores.

Los resultados de la valoración de proteínas en los extractos así obtenidos (tabla 4.II) muestran diferencias entre las cantidades recogidas de los diferentes pólenes, destacando como muy alto el valor de las primeras extracciones del polen de Allergon. El intenso color amarillo de estas extracciones reflejaba también un alto contenido en pigmentos.

RESULTADOS

Extracto Valorado	Polen de Sigma	Polen de Allergon	Polen de J.A.Jiménez
ET	4.25	7.5	5.1
E1	1.95	4.2	1.6
E5	0.62	0.99	0.63
E15	0.44	0.51	0.48
E1h	0.51	0.51	0.63
E4h	0.50	0.59	0.74
E19h	0.68	0.82	1.15

TABLA 4.II

Resultados de la valoración de proteína, realizada por el método de Lowry, en los extractos parciales y totales obtenidos a partir de pólenes de diferentes suministradores.

El análisis electroforético de los componentes de los extractos preparados en este estudio, puso de manifiesto que existían diferencias significativas en la cinéticas de emisión de sus proteínas (figura 4.9). En el polen de Allergon se observa que aunque las bandas mayoritarias son similares a las de los pólenes del año 1987, no mostraban en cambio diferencias en sus periodos de emisión, liberándose todas a lo largo de todo el proceso. Los resultados del mismo estudio con el polen suministrado por Sigma, indicaron que en este polen las cinéticas de emisión eran muy similares al polen de partida. Estos resultados sugerían que en estos dos pólenes se llevan a cabo los mismos procesos botánicos, mientras que en el de Allergon son diferentes.

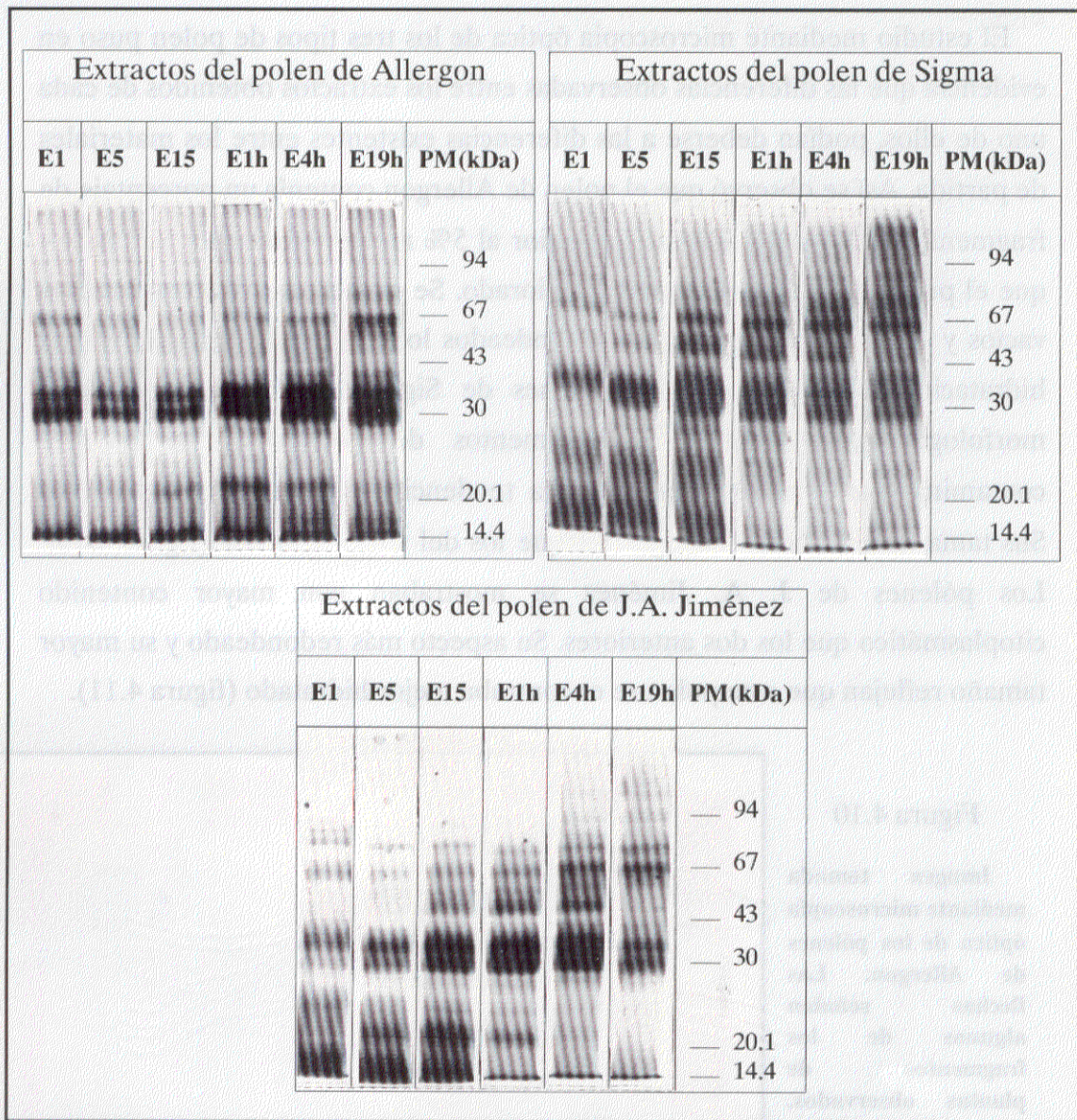


Figura 4.9

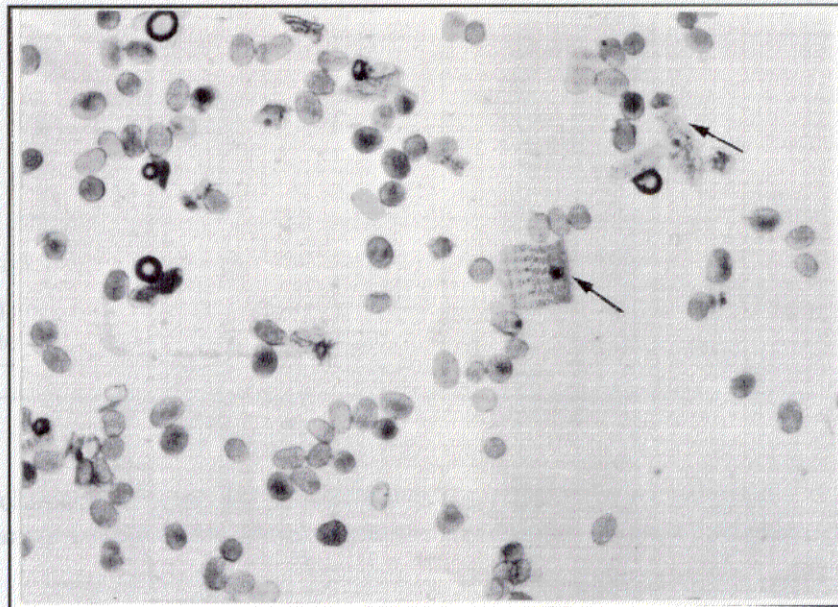
Imágenes de los perfiles electroforéticos de los extractos obtenidos a partir de los pólenes de Allergon, Sigma y J.A. Jiménez mediante incubaciones realizadas en paralelo.

RESULTADOS

El estudio mediante microscopía óptica de los tres tipos de polen puso en evidencia que las diferencias observadas entre los extractos obtenidos de cada uno de ellos, podían deberse a las diferencias existentes entre los materiales de partida. Así se observó que el polen de Allergon contenía un porcentaje de fragmentos de planta del 10%, (superior al 5% recomendado por la IUIS) y que el polen se encontraba muy deteriorado. Se observaron muchos pólenes vacíos y otros con contornos no redondeados lo que implica una deficiente hidratación (figura 4.10). Los pólenes de Sigma mostraban una buena morfología con ausencia de fragmentos de plantas y de pólenes contaminantes, aunque presentaban la tendencia a permanecer agregados. Sus tamaños eran más homogéneos que los del polen anterior (figura 4.12). Los pólenes de J. A. Jiménez se mostraban con mayor contenido citoplasmático que los dos anteriores. Su aspecto más redondeado y su mayor tamaño reflejan que este polen se encontraba mejor hidratado (figura 4.11).

Figura 4.10

Imagen tomada mediante microscopía óptica de los pólenes de Allergon. Las flechas señalan algunos de los fragmentos de plantas observados. Se aprecian contornos irregulares en algunos de los pólenes así como pólenes vacíos.



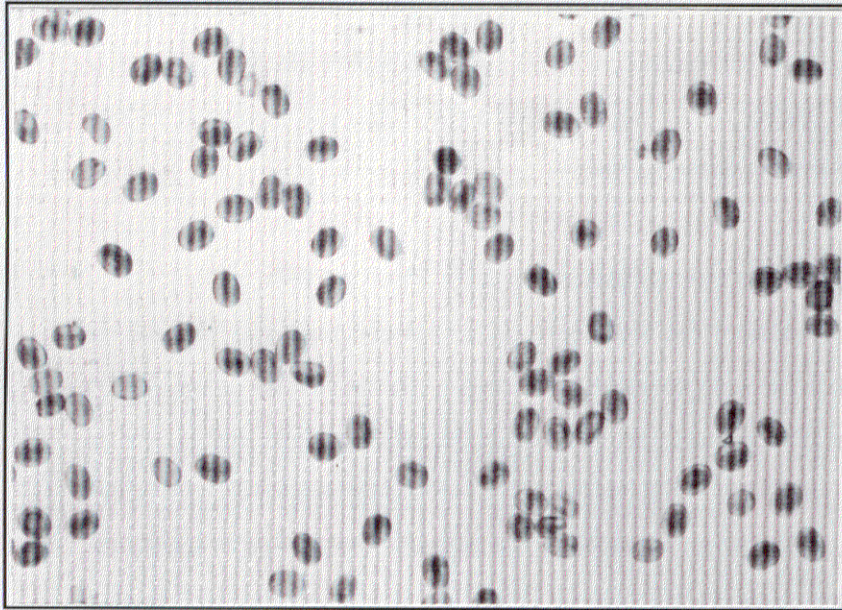


Figura 4.11

Resultados del análisis microscópico de los pólenes de J.A. Jiménez. Se observa una gran homogeneidad de los granos y ausencia de fragmentos de plantas y de pólenes extraños.

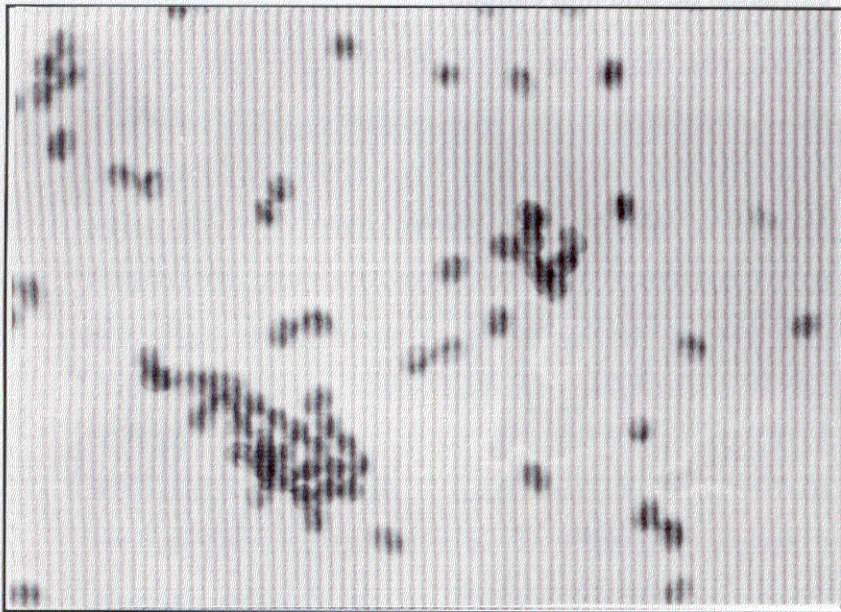


Figura 4.12

Imagen microscópica del polen suministrado por Sigma. Sus características morfológicas y su composición son muy similares a los pólenes de J.A. Jiménez aunque se aprecia una tendencia a su agregación.

RESULTADOS

Las diferencias existentes en el número de pólenes rotos justificaría los altos valores de proteína de los primeros extractos del polen de Allergon y la deficiente hidratación refleja la no recuperación de las características osmóticas de la membrana citoplasmática.

4.1.3 Pólenes de J. A. Jiménez recolectados en 1991, 1989 y 1987

Coincidiendo este momento del estudio con la época de floración de las gramíneas, el suministrador del polen de partida dispuso de las cantidades requeridas. Según el propio recolector, en la preparación de este polen nuevo se había seguido un protocolo diferente de desecación que mejoraría su conservación. Además, sus pólenes cumplían las especificaciones de partes de plantas y contaminantes requeridas por la IUIS. El buen estado del nuevo polen permitió obtener extractos de una alta calidad.

Como más tarde se verá, los extractos obtenidos con el nuevo polen mostraron unos perfiles electroforéticos muy nítidos, apreciándose diferencias en las cantidades de proteína extraída y en su forma de liberación durante la incubación. Esta variabilidad observada entre los extractos obtenidos a partir de diferentes lotes de pólenes podía deberse a diferencias botánicas, normales entre pólenes recogidos en diversos años, o bien a modificaciones producidas durante el proceso de conservación. Teniendo en cuenta que la calidad del material de partida determina la calidad del extracto alergénico preparado, estudiamos el posible origen de estas diferencias. Para ello se hizo un estudio comparativo entre los extractos parciales y totales obtenidos en tampón fosfato, según el protocolo de uso en el laboratorio, de los siguientes pólenes:

- Polen 1, recolectado en 1987 y conservado en nevera con desecante
- Polen 2, recolectado en 1987 y tras un breve periodo en nevera con desecante, congelado por debajo de -20°C
- Polen 3, recolectado en 1989, y conservado como el polen 2
- Polen 4, recién recolectado (1991), y una vez desecado, conservado en la nevera con desecante, durante 15 días

No se pudo disponer de los pólenes de las cosechas de fechas intermedias porque el suministrador solo conserva una pequeña muestra de pólenes de años alternos.

Todos estos pólenes habían sido recogidos y procesados por el mismo recolector, se habían cosechado en zonas próximas y pertenecían a la misma variedad de plantas. Tan solo diferían en que el polen de 1991 se había desecado con un nuevo protocolo. Todo ello podía contribuir a disminuir diferencias botánicas debidas al tipo de polen.

4.1.3.1 Control de roturas de pólenes

Análogamente al primer polen estudiado, se analizaron microscópicamente los sedimentos recogidos sin detectarse roturas por choque osmótico.

Los resultados electroforéticos obtenidos con los extractos del polen nuevo sugerían un buen estado de conservación de éste. Si un polen de centeno conserva las características de sus membranas en buen estado, la hidratación *in vitro* con agua destilada, induce el choque osmótico de la célula vegetativa, y el polen se abre por su zona más débil, la apertura. En la figura 4.13 se

RESULTADOS

observa como la incubación en agua destilada, provocó la rotura de las membranas de los pólenes nuevos, que se inició a los 40 segundos de entrar en contacto con el agua. Los otros pólenes no experimentaron este choque osmótico. El mayor tamaño de los pólenes nuevos, al final de la hidratación,

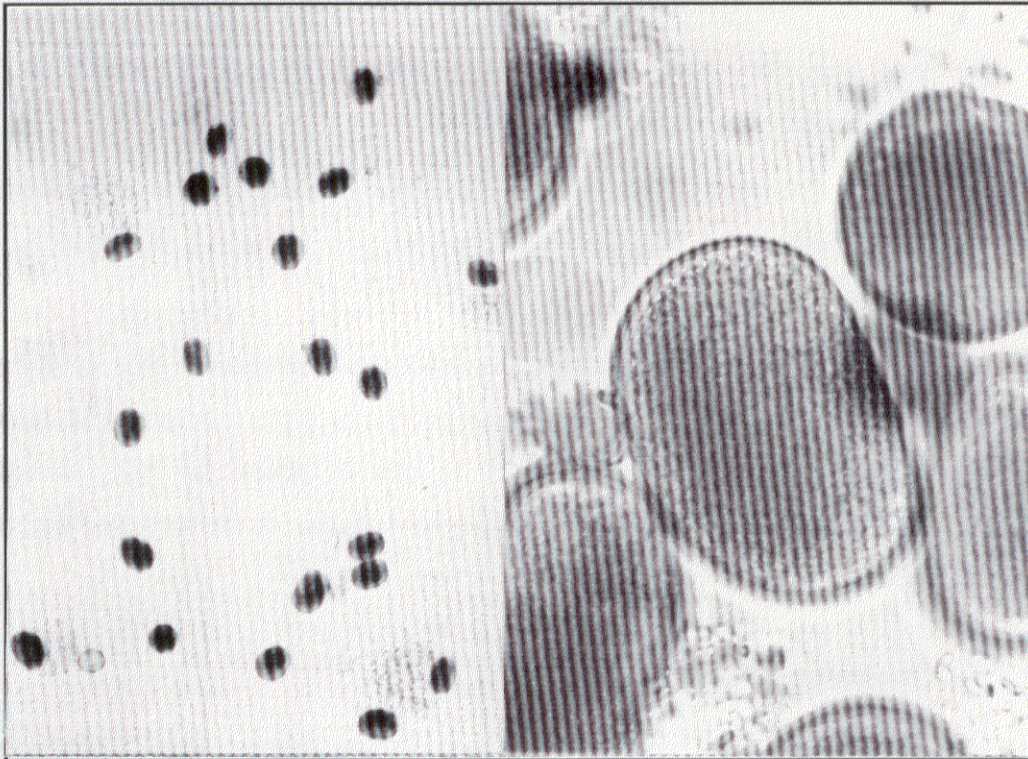


Figura 4.13

Imagen tomada mediante microscopía óptica del choque osmótico inducido por incubación en agua destilada del polen recolectado en 1991.

demuestra que la rotura se produce en ellos porque ha habido una penetración de agua al interior celular superior a la de los otros pólenes. Este resultado confirma que existen diferencias en el estado de conservación entre el polen nuevo y los demás pólenes.

4.1.3.2 Liberación de proteínas y alérgenos

Los resultados de la valoración de proteínas en los diferentes extractos obtenidos en este estudio comparativo (Tabla 4.III), muestran que a nivel cuantitativo, la emisión de proteínas es similar entre los extractos recogidos de los tres pólenes conservados, mientras que el polen nuevo libera sus proteínas de diferente manera. Se observó que con el polen nuevo, es menor la cantidad de proteína recogida en los extractos de 1 minuto, 4h y 19h, mientras que la cantidad se incrementa en las extracciones de 5 y 15 minutos.

Extracto valorado	Polen 1987 (nevera)	Polen 1987 (congelado)	Polen 1989 (congelado)	Polen 1991 (reciente)	Polen 1991 (1 año nev.)
E1	1.57	1.65	1.37	0.72	0.64
E5	0.53	0.50	0.59	0.81	0.71
E15	0.38	0.33	0.43	0.71	0.63
E1h	0.46	0.40	0.44	0.39	0.46
E4h	0.60	0.50	0.45	0.27	0.26
E19h	0.88	0.75	0.71	0.48	0.48

TABLA 4.III

Resultados de la valoración de proteína, realizada por el método de Lowry, en los extractos parciales y totales obtenidos a partir de cuatro lotes de pólenes de un mismo recolector. También se incluyen los resultados de la valoración de los extractos obtenidos, con el mismo protocolo, a partir del polen de 1991, un año después de su recolección.

RESULTADOS

En el estudio electroforético de los extractos recogidos con los cuatro tipos de polen, se observan diferencias en la composición entre aquellos del polen nuevo y los de los conservados (figura 4.14). Así, la banda de 67 kDa no está claramente definida en ninguno de sus extractos y se detectan nuevas bandas entre los componentes de mayor peso molecular. También se observa una mayor nitidez de las bandas que se obtiene con los extractos del polen nuevo, lo cual permite distinguir con más claridad el número de bandas que los componen.

También se detecta una modificación en la cinética de emisión de proteínas. A diferencia del polen conservado, en las primeras extracciones del polen nuevo, hay un mayor porcentaje de las bandas con movilidad cercana a 30 kDa, mientras que en los extractos finales el porcentaje es mínimo.

Los resultados de la valoración de proteínas en los extractos de un minuto de incubación y los perfiles electroforéticos de sus componentes, parecen contradictorios. Así, mientras que los datos del método de Lowry reflejan una menor proporción de proteínas en el extracto del polen nuevo, en el patrón electroforético se observa, en cambio, un mayor número de componentes extraídos. Aunque el método de Lowry ha sido descrito como un buen método para valorar el contenido proteico en extractos de pólenes (Hogne *et al.*, 1989), puede no estar exento de interferencias. Valoramos nuevamente los extractos mediante otros tres métodos diferentes: Bradford, relación densitométrica 280/260 y relación densitométrica 230/260.

En la tabla 4.IV se muestran los resultados de las cuatro valoraciones. En ellos se observa que las mayores diferencias en la valoración de proteínas por los diferentes métodos se producen en los extractos de un minuto de

RESULTADOS

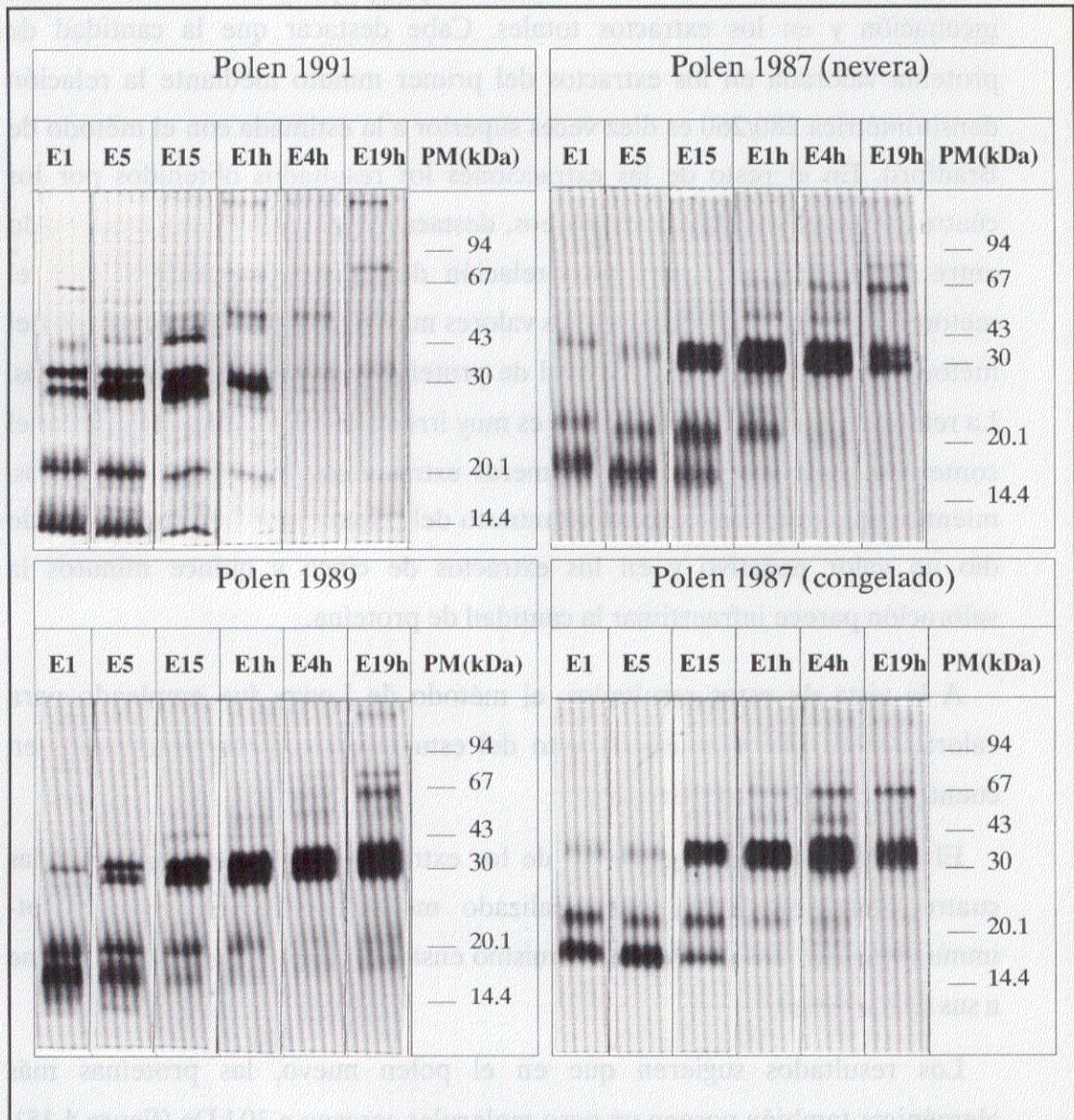


Figura 4.14

Perfiles electroforéticos de los extractos obtenidos mediante incubación en tampón fosfato de pólenes de centeno de cuatro lotes diferentes de un mismo suministrador.

RESULTADOS

incubación y en los extractos totales. Cabe destacar que la cantidad de proteína valorada en los extractos del primer minuto mediante la relación densitométrica 280/260 es diez veces superior a la estimada con el método de Bradford. En el resto de las extracciones los resultados obtenidos por los cuatro métodos son más homogéneos, destacando el paralelismo encontrado entre el método de Lowry y la relación densitométrica 260/230. Con el método de Bradford se obtienen los valores más bajos y podría suponer que el método infravalora la cantidad real de proteína que contienen los extractos. La relación densitométrica 280/260 es muy irregular, así parece sobrestimar el contenido proteico de las tres primeras extracciones de los pólenes viejos, mientras que en el extracto de un minuto del polen nuevo el mismo método dio un valor negativo y en los extractos de cinco y quince minutos la valoración parece infraestimar la cantidad de proteína.

A la vista de estos resultados, el método de Lowry fue empleado para valoración de proteínas en el resto del estudio, pero siempre teniendo en cuenta las posibles interferencias.

El estudio de la alergenicidad de los extractos obtenidos a partir de las cuatro clases de polen, fue realizado mediante la técnica del "Dot-immunobinding" valorando, en un mismo ensayo, la IgE específica que se une a sus componentes.

Los resultados sugieren que en el polen nuevo, las proteínas más alergénicas también poseen un peso molecular cercano a 30 kDa (figura 4.15). Así los extractos más reactivos del polen nuevo fueron los de 15 minutos y 1 hora, que son los que contienen una mayor proporción de bandas con movilidad cercana a 30 kDa y un bajo contenido en las de menor peso

RESULTADOS

Polen 1987					Polen 1987 congelado				
Extracto Valorado	L	DO ₂₃₀	DO ₂₈₀	CBB	Extracto Valorado	L	DO ₂₃₀	DO ₂₈₀	CBB
E1	1.50	1.00	2.39	0.23	E1	1.60	1.39	2.19	0.35
E5	0.58	0.57	0.98	0.31	E5	0.42	0.55	0.85	0.29
E15	0.38	0.37	0.60	0.24	E15	0.34	0.36	0.51	0.26
E1h	0.50	0.43	0.47	0.33	E1h	0.44	0.40	0.40	0.29
E4h	0.72	0.58	0.66	0.38	E4h	0.56	0.55	0.34	0.32
E19h	0.92	0.78	1.04	0.46	E19h	0.72	0.67	0.81	0.37
ET	4.4	2.65	4.66	1.21	ET	4.00	2.58	5.08	1.21

Polen 1989					Polen 1991				
Extracto Valorado	L	DO ₂₃₀	DO ₂₈₀	CBB	Extracto Valorado	L	DO ₂₃₀	DO ₂₈₀	CBB
E1	1.49	1.05	4.82	0.41	E1	0.72	1.08	VN	0.44
E5	0.58	0.55	1.29	0.33	E5	0.80	0.94	0.53	0.47
E15	0.44	0.35	0.80	0.31	E15	0.72	0.79	0.51	0.42
E1h	0.46	0.38	0.59	0.36	E1h	0.42	0.53	0.38	0.31
E4h	0.48	0.47	0.71	0.33	E4h	0.30	0.41	0.32	0.21
E19h	0.50	0.65	1.05	0.37	E19h	0.54	1.04	0.99	0.30
ET	4.28	2.72	6.92	1.36	ET	3.52	4.65	2.54	2.08

TABLA 4.IV

Resultados de la valoración de proteínas en los extractos totales y parciales obtenidos de cuatro lotes diferentes de polen de centeno (suministrado por J. A. Jiménez) mediante los siguientes métodos: L = método de Lowry; DO₂₃₀ = relación densitométrica 230/260; DO₂₈₀ = relación densitométrica 280/260; CBB = método de Bradford. VN = Valor negativo

RESULTADOS

molecular. La reactividad fue menor en el extracto final, que incluye muy pocos componentes de ese peso molecular. Se aprecia una mayor reactividad del extracto total lo cual implica que en este polen hay mayor proporción de alérgenos, bien porque haya mayor porcentaje de los ya identificados, bien porque estén mejor conservados sus determinantes alérgicos o bien porque haya componentes reactivos que se han perdido en los pólenes conservados durante largos periodos. Un estudio más detallado sobre los componentes alérgicos del polen nuevo se expone posteriormente.

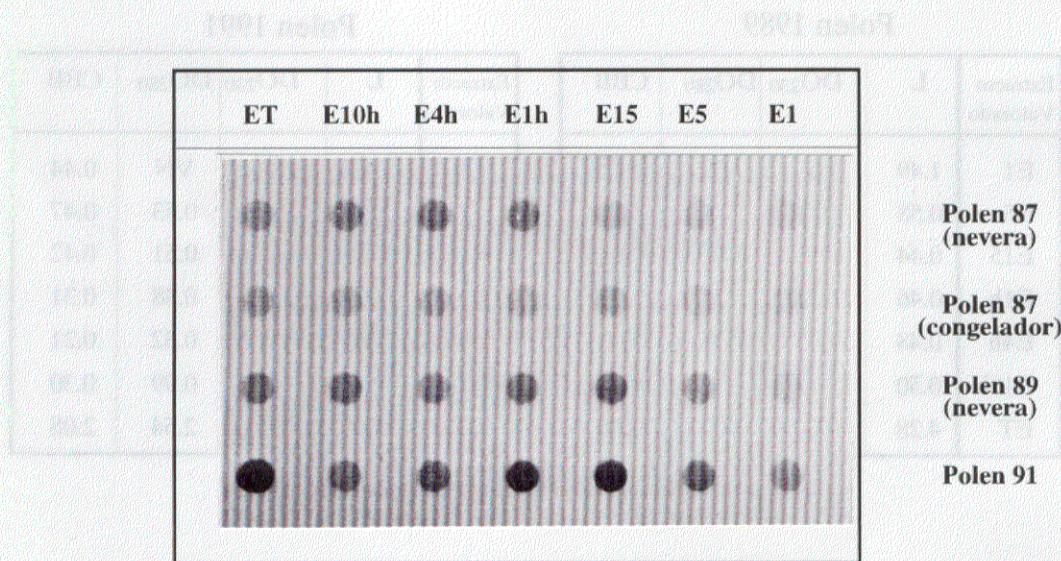


Figura 4.15

Resultado de la valoración mediante "Dot-immunobinding" de la unión específica de IgE a las proteínas de los extratos totales y parciales obtenidos de cuatro lotes de pólenes diferentes de un mismo suministrador.

Aunque los resultados obtenidos con los extractos recogidos a partir de los pólenes conservados muestran entre ellos una alta semejanza, los resultados electroforéticos y del "Dot- immunobinding" de los extractos del polen del año 1989, podrían considerarse como intermedios de los obtenidos con los extractos de los polenes del año 1987 y los del año 1991.

Los pólenes de Allergon y de Sigma proceden de distintos países, y han sido recolectados mediante procedimientos muy diferentes a los de los pólenes españoles. A pesar de ello, los perfiles electroforéticos de sus extractos son parecidos a los obtenidos con extractos de pólenes recolectados en 1987 y 1989, mientras que difieren con los de los extraídos del polen de 1991. Todos estos datos sugieren que las diferencias observadas se deben a modificaciones producidas en los pólenes durante la etapa de conservación y no a variaciones botánicas entre los pólenes de diferentes años.

Después de un año de conservación en la nevera, se repitieron las extracciones del polen recolectado en 1991. Los resultados del contenido proteico (tabla 4.III, mostrada anteriormente) así como los perfiles electroforéticos (figura 4.16), son similares a los primeros que se obtuvieron con este mismo polen nada más ser suministrado. Este resultado pone de manifiesto que el polen no se había alterado durante el periodo de conservación. Teniendo en cuenta que el polen había sido desecado en condiciones más ventajosas, este nuevo dato sugiere que las diferencias observadas pueden deberse al método de desecación seguido para su conservación, más que por el periodo o forma de almacenamiento.

RESULTADOS

Los resultados del estudio comparativo entre los extractos obtenidos de polenes de centeno, conservados de diferentes formas, nos indican por tanto

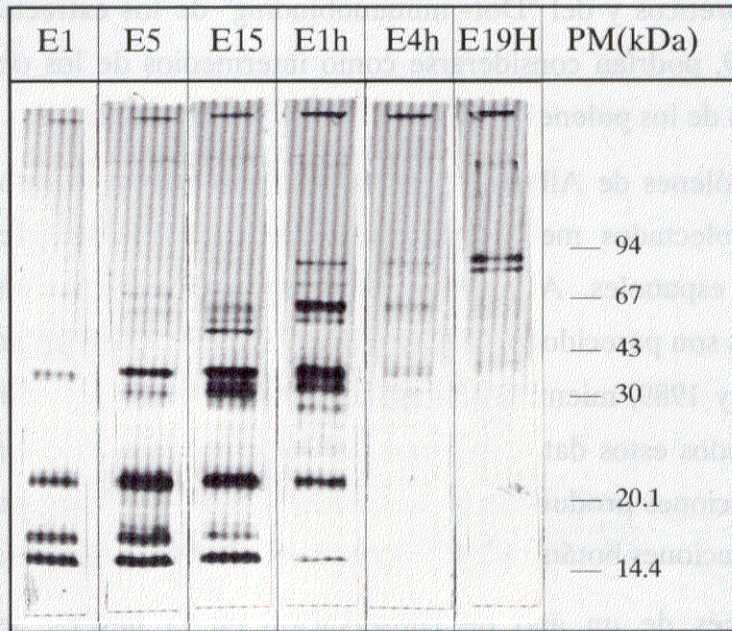


Figura 4.16

Perfiles electroforéticos de los componentes de los extractos obtenidos mediante incubación en tampón fosfato a partir del polen de 1991, un año después de su recolección, conservado en nevera.

que el polen del año 1991 está en mejores condiciones para realizar el estudio sobre sus alergenicos.

4.2 INCUBACIONES BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PH

Se ha descrito que el pH del medio de incubación tiene influencia sobre la proporción de proteínas que se liberan del polen, así como sobre la cinética de emisión de algunos alérgenos (Marsh *et al*, 1981; Larsen, 1991). Los primeros autores encuentran en el polen de la ambrosía, que a pH ácido son extraídos favorablemente algunos alérgenos básicos, mientras que a pH básico se extraen más fácilmente los ácidos.

Los resultados de la cromatografía de intercambio iónico, realizada en el estudio de carga molecular de los alérgenos del polen de 1987, mostraban un bajo porcentaje de componentes neutros. Teniendo en cuenta los resultados de Marsh *et al* (1981) antes citados, la utilización de un tampón neutro en la incubación, podía haber determinado la baja proporción de componentes neutros obtenida.

Para conocer si el pH del medio influía sobre la emisión de proteínas y alérgenos del polen en estudio, se realizaron extracciones totales y parciales mediante incubación del polen en tres condiciones de pH diferentes: ácida (glicina ClH 10 mM, 150 mM ClNa, pH 3), neutra (PO₄HNa₂-PO₄H₂K 10 mM, 150 mM ClNa, pH 7.4) y básica (CO₃HNa- CO₃Na₂ 10 mM, 150 mM ClNa, pH 10).

En el estudio se ha tenido en cuenta que durante la incubación, el polen libera determinadas sustancias tamponantes capaces de modificar el pH del medio. Por esta razón se ha medido el pH en cada uno de los extractos preparados.

RESULTADOS

4.2.1 Estudios realizados con pólenes de 1987

4.2.1.1 Cambios en el pH del medio inducidos por el polen

Los valores de pH de cada uno de los extractos recogidos en este estudio se muestran en la tabla 4.V columna B. Con respecto a los extractos totales, se observa que los pH iniciales de los tampones glicina, fosfato y carbonato (3, 7.4 y 10) han sido modificados a 4.5, 5.4 y 7.6 respectivamente. Las mismas modificaciones se observaron en los extractos parciales de un minuto de incubación. En las extracciones posteriores se observó que el pH del tampón de partida se mantuvo invariable en las incubaciones realizadas con tampón fosfato y carbonato, mientras que en las de glicina fue constantemente cambiado a pH 5. Estos resultados reflejan que el cambio de pH observado en los extractos totales tuvo lugar durante el primer minuto de incubación, permaneciendo en esas condiciones de pH las 20 horas sucesivas. Según esto, el pH medido en los extractos totales debe de ser considerado como el pH real de incubación. Estos resultados muestran, además, que el comportamiento del polen en el extracto total no puede ser comparado con el comportamiento en las extracciones parciales, ya que solamente los extractos de un minuto se incubaron en las mismas condiciones.

4.2.1.2 Liberación de proteínas

La cantidad de proteína liberada por el polen en las extracciones llevadas a cabo en este estudio, se exponen en la tabla 4.V columna A. Los extractos totales obtenidos en tampón ácido y neutro, contienen prácticamente la misma concentración de proteína, mientras que en el tampón básico se

RESULTADOS

Extracto valorado	GLICINA (pH3)		FOSFATO (pH7.4)		CARBONATO (pH10)	
	A	B	A	B	A	B
ET	4.5 ± 0.31	4.5	4.24 ± 0.23	5.4	3.90 ± 0.03	7.6
E1	1.42 ± 0.11	4.5	1.20 ± 0.09	5.4	1.48 ± 0.19	7.6
E5	0.46 ± 0.04	5.0	0.54 ± 0.05	7.3	0.59 ± 0.10	9.5
E15	0.27 ± 0.08	5.0	0.35 ± 0.02	7.3	0.45 ± 0.09	10.
E1h	0.30 ± 0.04	5.0	0.42 ± 0.04	7.3	0.53 ± 0.08	10.
E4h	0.45 ± 0.06	5.0	0.53 ± 0.06	7.3	0.58 ± 0.10	10.
E20h	0.45 ± 0.11	5.0	0.78 ± 0.08	7.3	0.83 ± 0.03	10.
ΣE5-E20h	1.93		2.62		2.98	

TABLA 4.V

Resultados de la valoración de proteína por el método de Lowry (columna A) y de la medición de pH (columna B) en los extractos totales y parciales obtenidos por incubación del polen del centeno en tres tampones diferentes. Los valores son la media de tres experimentos. ± desviación estándar media. ΣE5-E20h representa la suma de la proteína extraída en las extracciones parciales recogidas después de un minuto de incubación.

obtiene la menor cantidad (14.4% menos con respecto a glicina). Durante el primer minuto de incubación se extraen 1.42 mg, 1.20 mg y 1.48 mg en los tampones glicina, fosfato y carbonato respectivamente, representando el 31.5 %, 28.3 % y 37.9% de la proteína extraída en el extracto total del correspondiente tampón. Comparando la cantidad de proteína que se libera después del primer minuto y hasta el final del proceso (ΣE5-E20h), observamos que en las incubaciones con tampón carbonato se recoge 1.05 mg más de proteína que en glicina y 0.360 mg más que en tampón fosfato. Estos resultados reflejan que en condiciones básicas se obtiene, mediante

RESULTADOS

extracciones parciales, un 35% más de proteína que en condiciones ácidas y un 12.1% más que en las neutras.

Los perfiles electroforéticos de los extractos totales se muestran en la figura 4.17. Se observa pequeñas diferencias : en medio ácido, las bandas de 67 y 48 kDa son más intensas que en las de los extractos básico y neutro. Las bandas minoritarias de 81, 88 y 98 kDa no se observan en los extractos ácidos. La distribución de las bandas de los extractos preparados en fosfato y carbonato son similares entre ellos.

Los resultados del análisis electroforético de los extractos parciales se presentan en la figura 4.18. En tampón carbonato se detecta una mayor proporción de los componentes extraídos, principalmente aquellos de pesos moleculares comprendidos entre 28 y 20 KDa. Por el contrario, en tampón glicina se obtiene el menor número de componentes. Analizando las bandas mayoritarias, no se aprecian por este método diferencias significativas en la extracción de componentes de 28 y 33 kDa. La banda de 48 kDa se extrae con mayor eficacia, en condiciones ácidas y básicas, y la de 67 kDa, se extrae con mejor rendimiento en condiciones básicas.

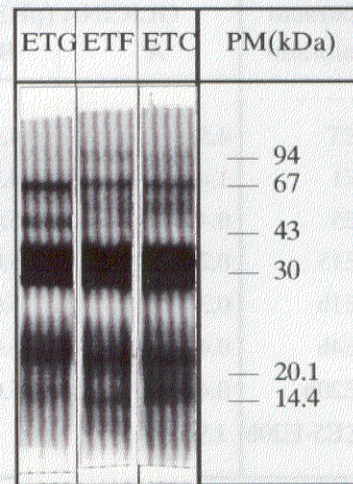


Figura 4.17

Perfiles electroforéticos de las proteínas de los extractos totales obtenidos por incubación del polen de centeno en tampones glicina (ETG), fosfato (ETF) y carbonato (ETC)

RESULTADOS

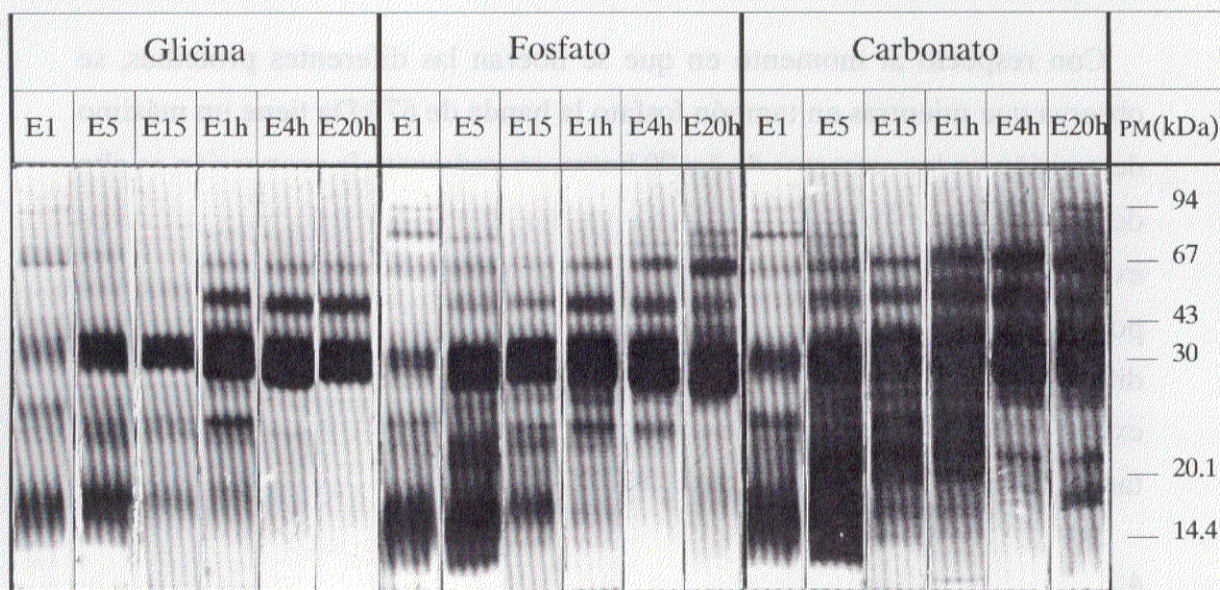


Figura 4-18

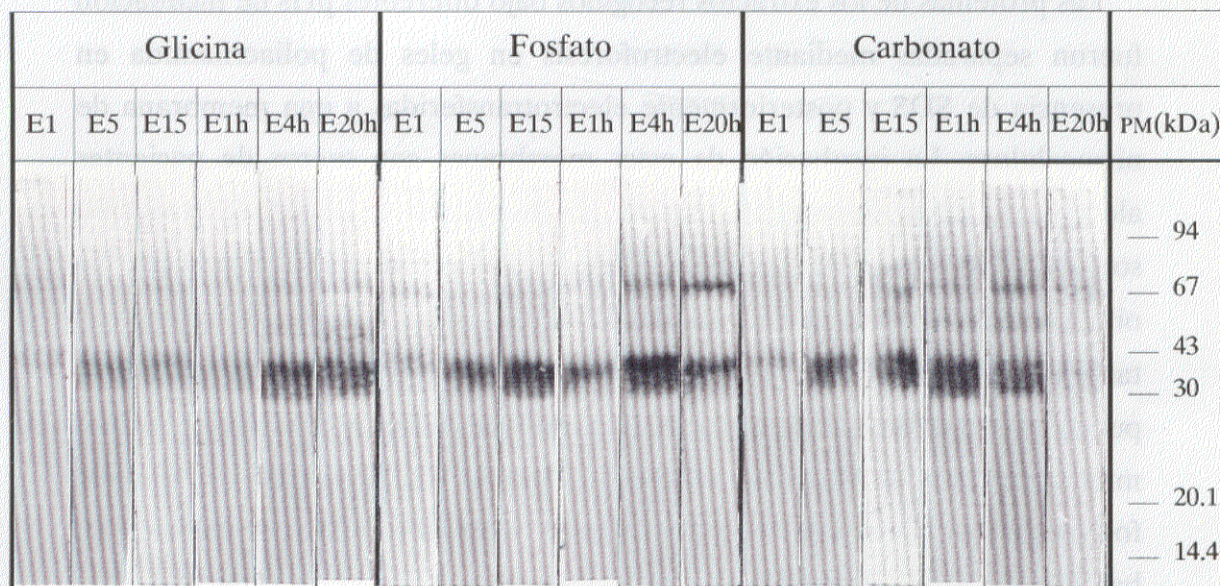


Figura 4.19

Perfiles electroforéticos de las proteínas de los extractos parciales obtenidos por incubación del polen del centeno en tampones glicina, fosfato y carbonato (figura 18). Identificación mediante inmuno-electrotransferencia de las bandas reactivas de cada uno de los extractos (figura 19).

RESULTADOS

Con respecto al momento en que se liberan las diferentes proteínas, se observa que mientras en tampón fosfato la banda de 67 kDa tiene un máximo de emisión en los extractos de 4 y 20 horas, en carbonato la proporción es alta desde el extracto de 1 hora hasta el final del proceso. En tampón glicina se extrae en una proporción muy inferior a la de los anteriores tampones, con un posible máximo en el primer minuto. La banda de 48 kDa también muestra diferencias en su cinética de emisión, observándose un máximo en los extractos de 1, 4 y 20 horas en tampón glicina, y en los de 1 y 4 horas en tampón carbonato y en fosfato.

4.2.1.3 Liberación de alergen

Las proteínas de los extractos recogidos bajo diferentes pHs de incubación fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y posteriormente electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. La incubación de estas membranas con sueros de pacientes alérgicos al polen del estudio, mostró que las bandas de 28, 33, 48, y 67 kDa son reactivas en las diferentes condiciones de extracción (figura 4.19). Se observa también que una banda de 81 kDa muestra algo de reactividad en tampón carbonato. La no detección de esta banda en el patrón electroforético puede representar que se encuentre en una pequeña proporción y que sea muy alergénica. Análogamente con la emisión de alergen en tampón fosfato, los primeros minutos de extracción incluyen la menor proporción de bandas reactivas. A medida que el proceso avanza se va incrementando el número de componentes alergénicos frente a los no alergénicos, observándose que en tampón glicina los extractos recogidos entre 4 y 20 horas solo contienen bandas reactivas. Los extractos equivalentes, preparados en

RESULTADOS

tampón fosfato, contienen más componentes no reactivos que en los del tampón glicina, y en los preparados con tampón carbonato la proporción es todavía mayor.

4.2.1.4 Incubaciones con cambios consecutivos de tampón

Los resultados de extracción de proteínas y alérgenos, bajo diferentes condiciones de incubación, sugieren que hay proteínas que no han sido liberadas por el polen durante la extracción a tiempos parciales en medio ácido. El diseño de un nuevo protocolo de extracción, confirmó la suposición. En este nuevo método el polen es incubado a tiempos parciales en tampón ácido en dos procesos paralelos. En uno de ellos (polen 1), después de 20 horas de extracciones

ácidas, se realiza una extracción neutra y posteriormente una básica. En el otro polen (polen 2), se realizan las mismas extracciones pero todas ellas con tampón glicina. En la tabla 4.VI se muestran los valores de proteína de los distintos extractos obtenidos en este nuevo protocolo de

	POLEN 1		POLEN 2	
	A	B	A	B
E15	2.12	4.9	2.08	5.0
E1h	0.42	4.6	0.42	4.5
E20h	1.03	4.5	1.04	4.5
E32h	0.48	6.4	0.18	3.6
E44h	0.56	10.0	0.12	3.6

TABLA 4.VI

A) Resultado de las valoraciones de proteínas (en mg/ml) realizadas en los extractos recogidos en la incubación con cambios consecutivos de tampón.

B) Valoración de pH en los mismos extractos.

Los extractos E32h y E44h, del polen 1, se obtuvieron incubando en tampón neutro y básico respectivamente. El resto se obtuvo en tampón ácido.

RESULTADOS

incubación. Mientras que el extracto recogido en la incubación entre 20 h y 32h del polen 1 contiene 0.160 mg/ml de proteína, el equivalente del polen 2 (con cambio del tampón de incubación a fosfato) se encuentra a 0.460 mg/ml. El cambio a tampón carbonato en el polen 2 indujo un nuevo incremento de la proteína extraída (0.56 mg/ml), mientras que la incubación equivalente del polen 1, en medio ácido, experimentó una disminución en la extracción (0.12 mg/ml).

Para comprobar el contenido en alérgenos de los extractos así preparados, se hizo un estudio mediante la técnica del RAST. Solo se probaron las fracciones con mayor contenido de proteína, por ser las únicas que permiten

P	Extracto valorado				
	E15	E1h	E20h	E32h	E44h
1	2.8	9	4.8	5.8	1.25
2	-	1.6	0.88	3.2	0.55
3	-	>17	>17	>17	>17
4	3.8	11.5	>17	>17	7
5	2.5	>17	>17	>17	>17
6	1.1	>17	>17	>17	14
7	0.8	5.4	6.6	9.4	4.4
8	0.48	3	1	3.3	0.86
9	0.98	4.7	6.8	3.3	1.1
10	>17	>17	>17	>17	>17

TABLA 4.VII

Resultados de la valoración, mediante la técnica del RAST de la alérgenicidad de los distintos extractos obtenidos por incubación del polen de centeno con cambios consecutivos del tampón. P = Suero de paciente valorado

estudios posteriores. Los resultados (tabla 4.VII) indican que las fracciones 1h, 20h y 32h eran las más reactivas. Al igual que en los estudios de alergenicidad realizados mediante "Dot-immunobinding, en los extractos obtenidos en tampón fosfato, la proteína extraída en los primeros minutos contiene una baja proporción de alergen. La inmunoelectrotransferencia de las distinta fracciones (figura 4.20) pone de manifiesto que con el cambio a tampón fosfato se extraen alergen con pesos moleculares cercanos a 30 kDa que no se extraerían, o lo harían muy lentamente, en tampón ácido. La

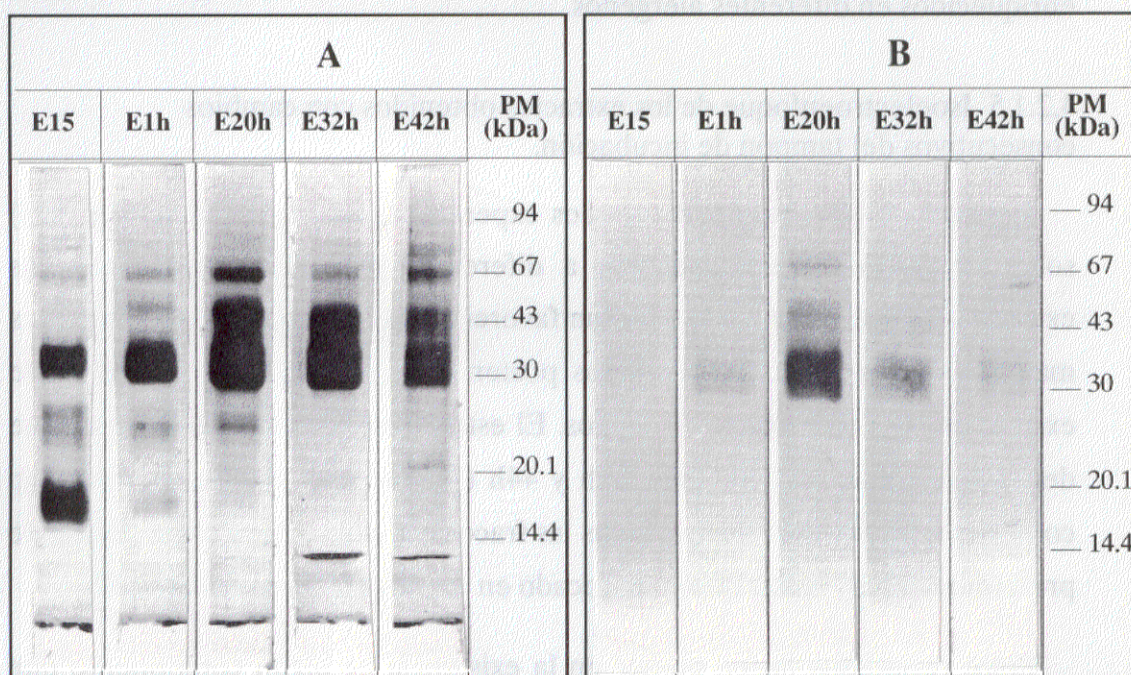


Figura 4.20

A) Resultados del estudio electroforéticos de las proteínas extraídas del polen 1 mediante cambios consecutivos del tampón de incubación.

B) Identificación de las bandas reactivas mediante inmunoelectrotransferencia en los mismos extractos que en A.

RESULTADOS

proteína extraída en el cambio a carbonato contiene una menor proporción de alérgenos, pero también fue muy reactiva.

Queda claro en esta experiencia, que las proteínas y alérgenos del polen de centeno, son liberadas al medio de incubación de diferentes formas dependiendo de las condiciones del medio y del tiempo de incubación. De acuerdo con todo esto, mediante la selección del periodo de incubación del polen así como del tampón empleado, se pueden obtener extractos enriquecidos en diferentes alérgenos.

4.2.1.5 Isoelectroenfoque de los extractos obtenidos con cambios consecutivos del tampón de incubación.

Teniendo en cuenta los resultados experimentales de Marsh *et al* (1981) sobre la extracción de proteínas a diferentes pH, cabía pensar que las extracciones en medio ácido habrían favorecido la salida de los componentes más básicos y que en los extractos posteriores, a pHs neutro y básico, se extraerían favorablemente los ácidos. El estudio mediante isoelectroenfoque de las fracciones 15h, 1h, 20h, 32h y 44h (figura 4.21) no fue sin embargo conclusivo. Se observó que en todas las fracciones había una gran cantidad de proteínas ácidas y material mal enfocado en los diferentes rangos de pH.

Estos resultados hacen pensar en la existencia de algún componente que interfiere en el proceso, impidiendo que se enfoquen los distintos componentes de los extractos.

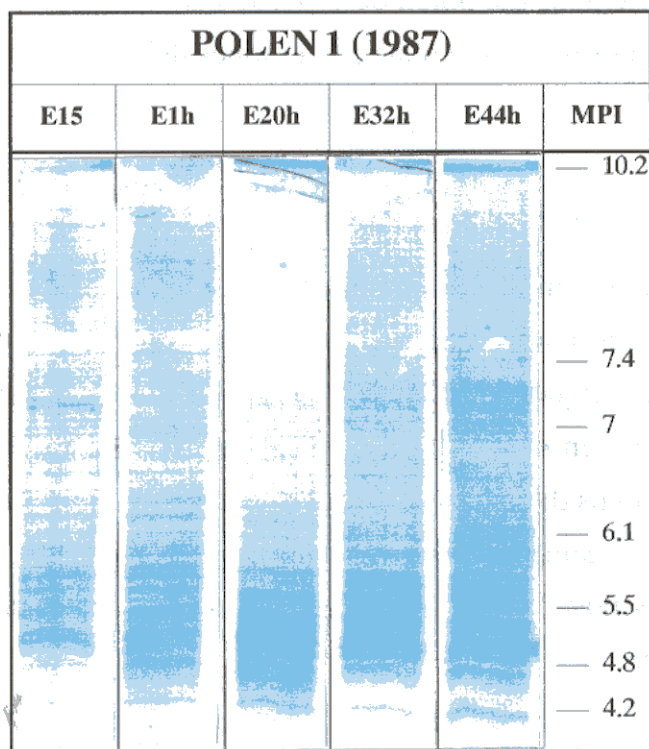


Figura 4.21

Resultados del proceso de isoelectroenfoque de los extractos recogidos del pólen 1 (recolectado en 1987), en el estudio de extracción de proteínas con extracciones con cambios consecutivos del tampón de incubación.

4.2.2 Estudios realizados con pólenes del año 1991

Las diferencias entre los extractos obtenidos en tampón fosfato de pólenes recién recolectados y de los conservados, sugerían el estudio del comportamiento del polen nuevo en las tres condiciones de extracción. El diseño experimental fue el mismo que con el polen conservado. Los resultados de las valoraciones de pH y de proteína recogida en cada uno de

RESULTADOS

los extractos obtenidos del polen de 1991, se han resumido y comparado con los obtenidos anteriormente en las extracciones del polen del año 1987, en la tabla 4.VIII.

4.2.2.1 Cambios en pH del medio inducidos por el polen

Con respecto a la modificación de pH que el polen induce en el medio de incubación, se observa que análogamente el cambio se produce durante el primer minuto, aunque la modificación es diferente. Cabe resaltar que en la incubación del polen nuevo en tampón fosfato y carbonato el cambio de pH producido es menos drástico que en la del polen conservado, mientras que en tampón glicina el cambio fue más intenso. Por otra parte el valor del pH en las extracciones posteriores a un minuto, son muy similares entre el polen nuevo y el viejo.

4.2.2.2 Liberación de proteínas

En las tres condiciones de incubación, la cantidad de proteína liberada por el polen nuevo en los extractos parciales del primer minuto, fue menor que las liberadas en los mismos extractos del polen conservado. En este dato debe de tenerse en cuenta que una parte de las diferencias observadas, pueden deberse a las posibles interferencias del método de valoración anteriormente comentadas.

En cuanto a la cantidad de proteína recogida después de un minuto hasta 20 h de incubación, se observa que en tampón fosfato y en carbonato se extrae prácticamente la misma proteína en los dos tipos de polen, apreciándose diferencias en los periodos de máxima emisión. En tampón glicina los valores

RESULTADOS

Extracto valorado	FOSFATO (pH 7.4)				GLICINA (pH 3)				CARBONATO (pH10)			
	PH		PROTEINA		PH		PROTEINA		PH		PROTEINA	
	87	91	87	91	87	91	87	91	87	91	87	91
ET	5.4	6.5	4.2	4.0	4.5	6.0	4.5	5.5	7.6	7.8	3.9	5.0
E1	5.4	6.5	1.20	0.62	4.5	6.0	1.42	0.55	7.6	8.6	1.48	0.77
E5	7.3	6.8	0.54	0.75	5.0	6.0	0.46	0.67	9.5	8.6	0.59	0.80
E15	7.3	7.4	0.35	0.57	5.0	5.5	0.27	0.72	10.0	10.0	0.45	0.65
E1h	7.3	7.4	0.42	0.42	5.0	5.5	0.30	0.70	10.0	10.0	0.53	0.60
E4h	7.3	6.5	0.53	0.27	5.0	4.5	0.45	0.50	10.0	10.0	0.58	0.50
E20h	7.3	6.5	0.78	0.50	5.0	4.5	0.45	0.45	10.0	10.0	0.83	0.50
ΣE5-E20h			2.62	2.51			1.93	3.04			2.98	3.12

TABLA 4.VIII

Resumen de los valores de proteína (mg/ml) y de pH estimados en los extractos obtenidos mediante incubación del polen de centeno de 1991 en tres tampones diferentes. Cada valor se compara con los obtenidos en los extractos del polen de 1987 mediante el mismo protocolo de extracción. ΣE5-E20h = Suma de la proteína extraída en los extractos recogidos después de un minuto de incubación.

de extracción de proteína, durante este periodo, son en cambio muy superiores en el polen nuevo. También en este tampón se modifica el periodo de máxima extracción de proteína.

Los perfiles electroforéticos de los distintos extractos recogidos en el nuevo estudio de influencia del pH, se muestran en la figura 4.22. Se observa en ellos que la banda de 67 kDa no se recoge en ninguna de las extracciones del polen nuevo; en tampón glicina la banda de 48 kDa se extrae en una alta proporción, con un máximo de emisión durante el mismo periodo que el polen conservado. En tampón fosfato su extracción es en cambio menor que en el polen conservado y solamente se extrae entre 5 y 15 minutos de incubación. En carbonato también disminuye la cantidad extraída de este componente y se modifica su máximo de emisión (entre los extractos de 15

RESULTADOS

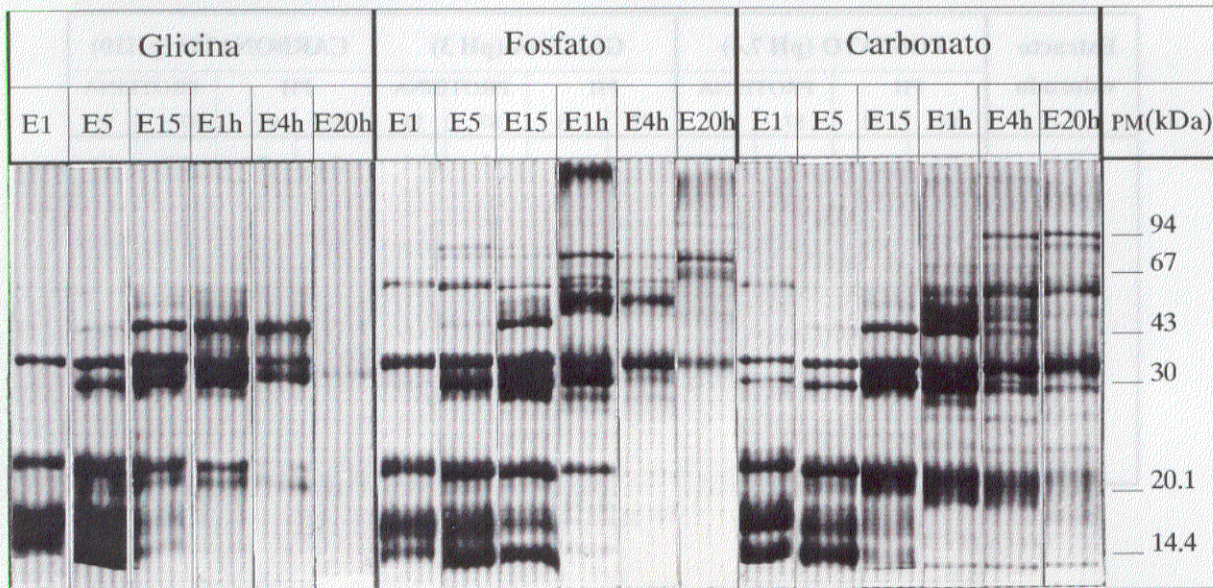


Figura 4.22

Resultados del estudio electroforético del contenido proteico de los extractos obtenidos mediante incubaciones a tiempos parciales del polen de centeno de 1991 en tres tampones diferentes.

minutos y una hora). Se observa, en tampón fosfato y carbonato, que a partir de 15 minutos se extraen un alto número de componentes de pesos moleculares comprendidos entre 40 y 90 kDa, no extraíbles en tampón glicina. También se observa que en tampón carbonato se extrae durante todo el proceso componentes de peso molecular comprendido entre 20 y 28 kDa, en una proporción superior a la extraída en los otros tampones.

4.2.2.3 Estudio con cambios consecutivos de tampón

Análogamente al estudio anterior, el polen nuevo fue incubado con cambios consecutivos de tampón, y las proteínas extraídas analizadas. El protocolo de incubación fue igual al que se siguió con el polen viejo pero,

RESULTADOS

teniendo en cuenta las diferencias observadas entre las cinéticas de emisión de ambos pólenes, los periodos de incubación fueron modificados a: 1, 5, 15 minutos, 1, 4, 20, 32 y 44 horas. Los resultados nuevamente reflejan que una parte de los componentes no extraídos después de 20 horas en tampón ácido, se extraen cambiando el medio de incubación a tampón neutro y una parte no extraída en los tampones anteriores, se extrae cambiando el medio de incubación a un tampón básico. Los resultados de esta incubación están resumidos en la tabla 4.IX. Se observa, sin embargo, que las cantidad de proteína liberada al cambiar de tampón de neutro a básico, es algo menor en

EXTRACTO VALORADO	POLEN 1		POLEN 2	
	A	B	A	B
E1	0.65	6.	0.60	6.
E5	0.86	5.5	0.94	5.5
E15	0.90	4.5	0.85	4.5
E1h	0.72	4.5	0.84	4.5
E4h	0.38	4.5	0.40	4.5
E20h	0.36	4.5	0.37	4.5
E32h	0.42	6.5	0.18	3
E44h	0.30	10	0.10	3

TABLA 4.IX

A) Resultado de las valoraciones de proteínas (en mg/ml) realizadas en los extractos recogidos en la incubación con cambios consecutivos de tampón del polen de 1991.

B) Valoración de pH en los mismos extractos.

Los extractos E32h y E44h, del polen 1, se obtuvieron incubando en tampón neutro y básico respectivamente. El resto se obtuvo en tampón ácido.

RESULTADOS

el polen nuevo que en el conservado (se recogen 0,56 mg/ml en el polen conservado mientras que en el nuevo se extrae 0,3 mg/ml).

Los resultados electroforéticos (figura 4.23) muestran nuevamente que el cambio a fosfato provoca un incremento en los componentes de peso molecular cercano a 30 kDa, fundamentalmente del componente de 27 kDa.

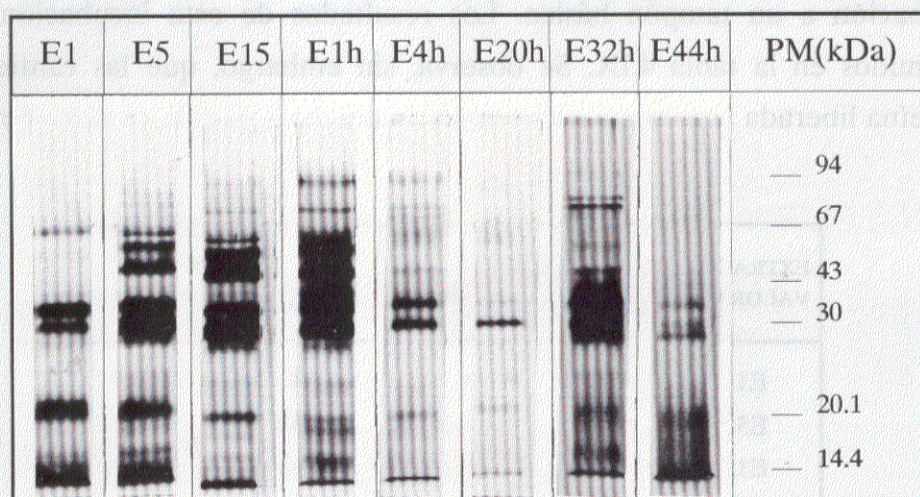


Figura 4.23

Estudio electroforético de las proteínas extraídas del polen de centeno de 1991 con cambios consecutivos de tampón.

4.2.2.4 Isoelectroenfoque de las fracciones ácidas, neutras y básicas

La mayor nitidez de las bandas que mostraban las electroforesis de los extractos del polen nuevo, sugería una menor modificación de las proteínas, así como una disminución de sustancias interferentes. Los resultados del estudio mediante isoelectroenfoque de estas nuevas fracciones (figura 4.24), muestran grandes diferencias con los obtenidos anteriormente con los

RESULTADOS

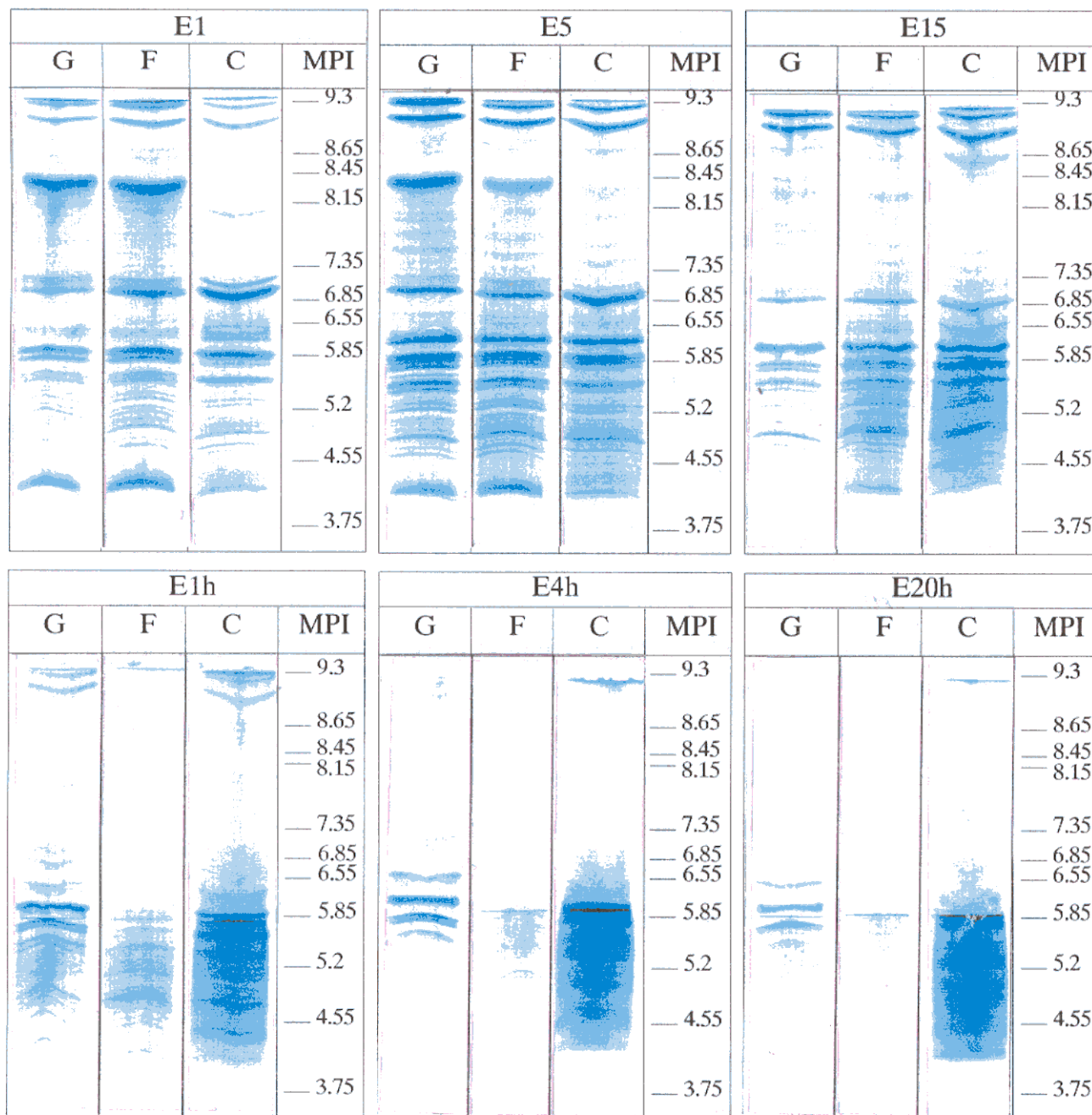


Figura 4.24

Resultados de estudio mediante isoelectroenfoco de las proteínas obtenidas en las extracciones parciales del polen de centeno de 1991, incubando en tres tampones. G = Glicina; F = Fosfato; C = Carbonato

RESULTADOS

extractos del polen conservado. Las bandas se enfocaron nítidamente apreciándose una alta proporción de componentes básicos.

Los resultados reflejan que el pH del medio puede influir sobre la extracción de alguna proteína en particular (banda de PI 8.25 no extraída en tampón carbonato), pero en general las modificaciones en las cinéticas de emisión observadas, no parecen ser función de la carga de los componentes del polen de centeno. Así hay un alto porcentaje de proteínas básicas y ácidas que se extraen por igual en los tres tampones, durante los 15 primeros minutos de incubación. Se pudo comprobar la existencia de una sustancia interferente que se extrae, en mayor proporción, en los tampones básico y neutro a partir de 15 minutos de incubación, que precipita y arrastra claramente a las proteínas hacia la zona ácida e interfiere con su enfoque. Este hecho impide comparar los componentes proteicos extraídos después de 15 minutos por esta técnica, y sugiere que el incremento de bandas de alto peso molecular observado en las extracciones posteriores a 15 minutos de los tampones carbonato y fosfato puedan corresponder a asociaciones moleculares y no a la extracción de nuevos componentes. La interferencia se extrae en una proporción muy inferior en las incubaciones realizadas con tampón ácido, pero en los extractos de 32 y 44 horas, con cambios consecutivos de tampón, su proporción fue tan alta que no permitió su estudio por este método.

Cuando se estudia mediante isoelectroenfoque los extractos totales obtenidos en las tres condiciones de pH, se observa que en los extractos básico y neutro, se produce precipitación en el punto de aplicación y hay una ausencia de enfoque nítido de los componentes, fundamentalmente entre los

más básicos. En el extracto ácido se enfocan en cambio más claramente (figura 4.25). La presencia de la interferencia, extraída después de 15 minutos, puede por lo tanto provocar la distorsión del patrón total, enmascarando la presencia de los componentes básicos.

4.3 CARACTERIZACION DE ALERGENOS DEL POLEN DE 1991

Los resultados obtenidos hasta ahora en los estudios de los diferentes extractos del polen nuevo, sugieren que la extracción en medio ácido facilita el estudio de las características bioquímicas de sus alergenios. La interferencia en los tampones básico y neutro altera el comportamiento eléctrico de sus componentes, por lo que no pueden ser estudiados mediante técnicas electroforéticas sin el empleo de sustancias reductoras o altamente disociantes. Estas sustancias pueden modificar los determinantes alérgicos, por lo que su empleo no es recomendado. Es posible que las extracciones neutras y básicas contengan algún alérgeno diferente, pero su estudio ha sido pospuesto debido a la mayor complejidad tecnológica que se requiere y por el alto número de extractos que habría que estudiar en paralelo.

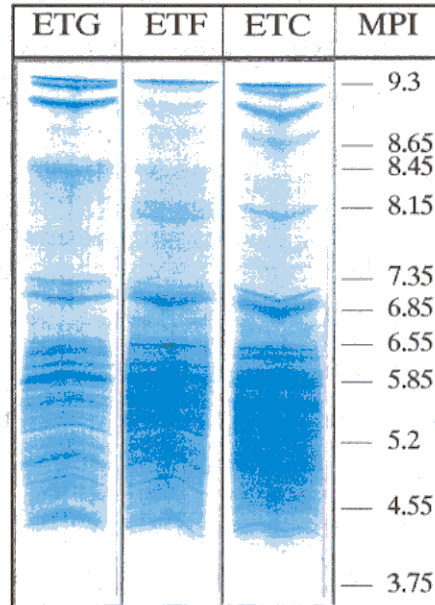


Figura 4.25

Resultados del estudio mediante isoelectroenfoque de los extractos totales obtenidos en glicina (ETG), fosfato (ETF) y carbonato (ETC). MPI = Marcador de Punto Isoeléctrico

RESULTADOS

El estudio se diseñó a nivel preparativo, con tiempos de incubación iguales a los del estudio analítico y recogiendo las proteínas eluidas por filtración mediante succión por vacío. En la tabla 4.X se muestran los resultados de la valoración del contenido proteico. Se observa, con respecto al estudio analítico, un incremento en la concentración del extracto recogido a los cinco minutos. Un resultado similar se observó en el estudio con cambios consecutivos de tampón. En ambos procedimientos la proteína se recoge por succión, mientras que en los estudios analíticos es por centrifugación. La diferente metodología justificaría el incremento observado.

Extracto valorado	Polen 1991
E1	0.90
E5	1.10
E15	0.66
E1h	0.59
E4h	0.38
E20h	0.49

TABLA 4.X

Resultados de la valoración de proteína en los extractos preparativos obtenidos por incubación del polen de 1991 en tampón glicina.

4.3.1 Determinación de pesos moleculares

En la figura 4.26A se observan los patrones electroforéticos de las distintas fracciones obtenidas. En esta nueva extracción se observan más intensas las bandas de 52 y 63 kDa en los patrones electroforéticos de las primeras extracciones, que en las obtenidas en las equivalentes del estudio analítico mediante centrifugación. La estima de los pesos moleculares de los componentes reactivos se llevó a cabo mediante inmunoelectrotransferencia. Las proteínas de los extractos, separadas mediante electroforesis en geles de

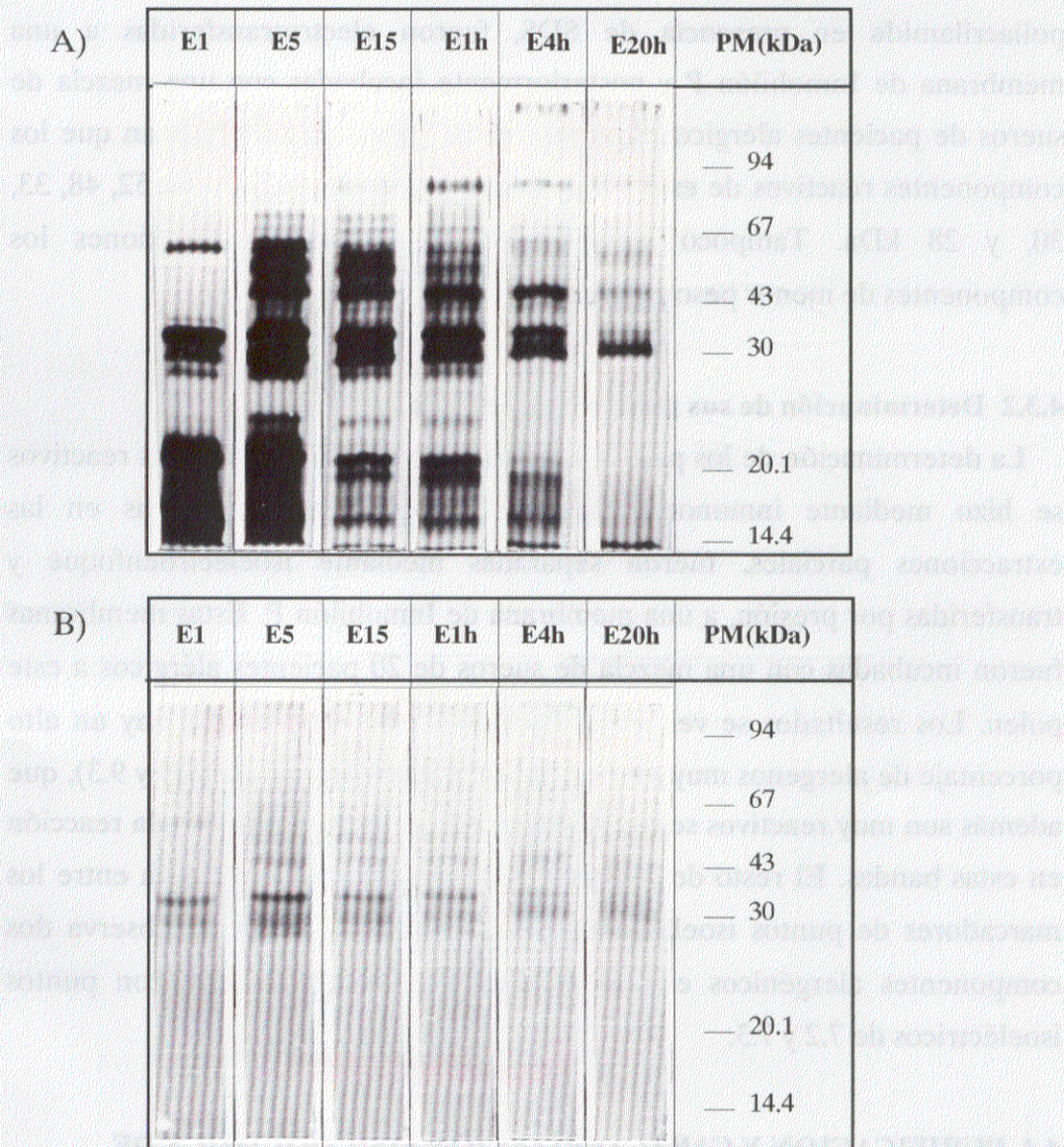


Figura 4.26

Perfiles electroforéticos de los extractos parciales obtenidos, a nivel preparativo, mediante incubación del polen del centeno de 1991 en medio ácido (figura A).

En la figura B se muestran los resultados de la inmunoelectrotransferencia de los mismos extractos.

RESULTADOS

poliacrilamida en presencia de SDS, fueron electrotransferidas a una membrana de Inmobilon P y posteriormente incubadas con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos. Los resultados (figura 4.26B) reflejan que los componentes reactivos de este polen tienen pesos moleculares de 52, 48, 33, 30, y 28 kDa. Tampoco fueron reactivos en estas extracciones los componentes de menor peso molecular.

4.3.2 Determinación de sus puntos isoeléctricos

La determinación de los puntos isoeléctricos de los componentes reactivos se hizo mediante inmunotransferencia. Las proteínas recogidas en las extracciones parciales, fueron separadas mediante isoelectroenfoque y transferidas por presión, a una membrana de Inmobilon P. Estas membranas fueron incubadas con una mezcla de sueros de 20 pacientes alérgicos a este polen. Los resultados se ven en la figura 4.27. Se observa que hay un alto porcentaje de alérgenos muy básicos (entre los marcadores de 8.15 y 9.3), que además son muy reactivos según se desprende de la intensidad de la reacción en estas bandas. El resto de los componentes reactivos se enfocan entre los marcadores de puntos isoeléctricos de 5.2 y 6.55. También se observa dos componentes alérgicos extraídos durante el primer minuto con puntos isoeléctricos de 7.2 y 7.3.

4.4 PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ALERGENOS

Teniendo en cuenta los resultados experimentales, obtenidos sobre liberación de proteínas y alérgenos, se seleccionaron unas condiciones de incubación que permitieron obtener extractos altamente enriquecidos en

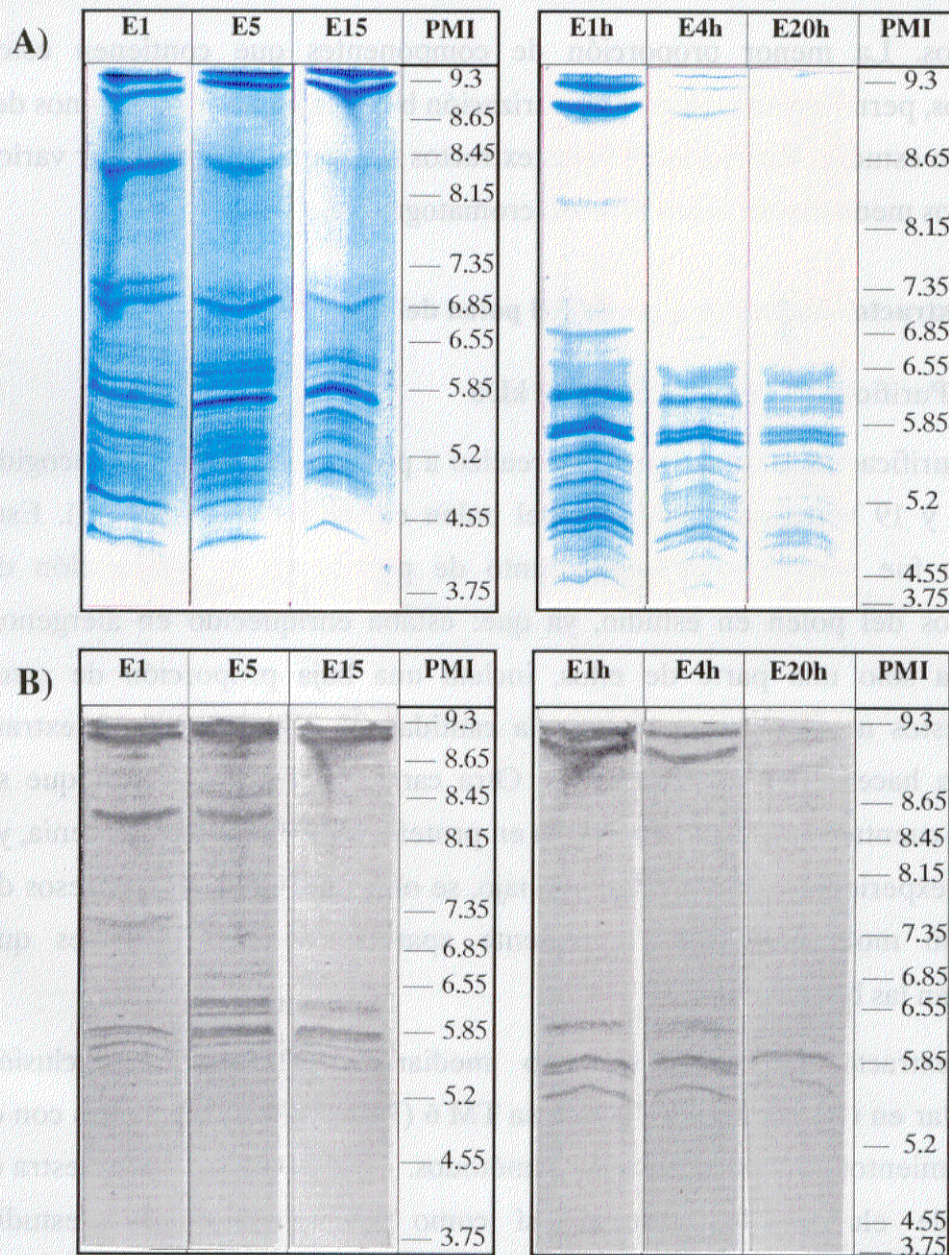


Figura 4.27

A) Análisis mediante isoelectroenfoque de los extractos parciales recogidos en la incubación preparativa en medio ácido del polen del centeno de 1991

B) Inmunodetección en los extractos analizados de los componentes alérgicos.

RESULTADOS

alergenos. La menor proporción de componentes que contienen estos extractos, permiten una mejor caracterización bioquímica de los alergenios del polen en estudio. Partiendo de estos extractos se han podido purificar varios alergenios mediante un único proceso cromatográfico.

4.4.1 Extractos obtenidos a partir del polen del año 1987

4.4.1.1 Purificación de la banda de 48 kDa

La purificación de esta banda se realizó a partir de un extracto, recogido entre 1 y 19 horas de incubación del polen en medio ácido (E1-19). Este extracto fue seleccionado como punto de partida en la purificación de alergenios del polen en estudio, ya que: estaba enriquecido en alergenios, contenía solo una parte de ellos, incluía una baja proporción de otros compuestos no reactivos y además la cantidad de proteína que se extraía permitía hacer estudios posteriores. Otra característica importante que se tuvo en cuenta fue la baja proporción en proteína de 67 kDa que contenía, ya que en experiencias previa a este trabajo, se observó que en los procesos de exclusión molecular, este componente aparecía en las fracciones que contenían las bandas de 30 kDa.

El extracto fue subfraccionado mediante cromatografía exclusión molecular en una columna de superosa TM 6 (Pharmacia), de acuerdo con el procedimiento descrito en material y métodos. En la figura 4.28 se muestra el perfil de elución del proceso así como los resultados del estudio electroforético de las fracciones recogidas. Se ve como el componente de 48 kDa se separa del resto de las proteínas del extracto en las fracciones 52, 53 y 54.

RESULTADOS

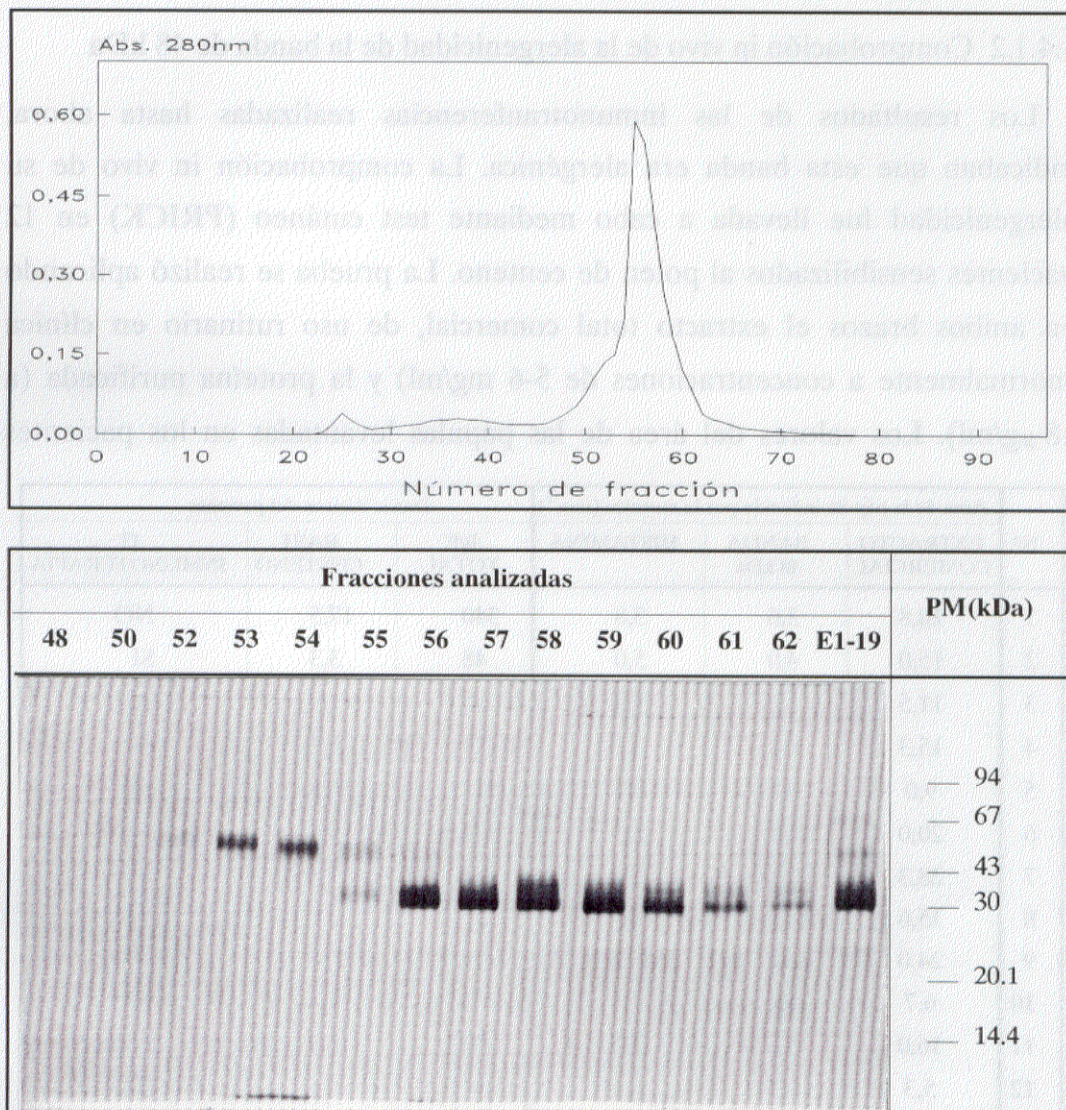


Figura 4.28

Perfil de elución de la cromatografía analítica de exclusión molecular del extracto E1-19h obtenido por incubación ácida del polen de 1987. En la parte inferior se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas

RESULTADOS

4.4.1.2 Comprobación in vivo de la alergenicidad de la banda de 48 kDa

Los resultados de las inmunotransferencias realizadas hasta ahora, indicaban que esta banda era alergénica. La comprobación in vivo de su alergenicidad fue llevada a cabo mediante test cutáneo (PRICK) en 12 pacientes sensibilizados al polen de centeno. La prueba se realizó aplicando en ambos brazos el extracto total comercial, de uso rutinario en clínica (normalmente a concentraciones de 5-6 mg/ml) y la proteína purificada (a 18 µg/ml). Los valores del área de las pápulas levantadas en los pacientes

Nº	Area de la pápula inducida por la muestra (mm ²)			Datos clínicos del paciente		
	EXTRACTO COMERCIAL	BANDA 48 kDa	HISTAMINA	IgE TOTAL	RAST CENTENO	IT INMUNOTERAPIA
1	10,8	3,6	3,8	340	17,5	NO
2	15,0	4,0	5,0	48	3,3	SI
3	11,5	3,5	5,4	216	1,6	SI
4	15,3	6,0	8,0	1.400	9,3	NO
5	9,0	3,5	3,8	282	0,6	SI
6	20,0	13,5	8,0	231	9,4	NO
7	28,3	12,9	6,0	176	9,2	SI
8	15,6	6,5	7,3	235	3,5	NO
9	24,0	11,5	3,5	176	17,5	SI
10	6,7	4,0	3,0	153	0,7	NO
11	16,0	3,3	5,3	199	0,9	NO
12	5,3	5,5	0,8	36		NO

TABLA 4.XI

Resultados de la comprobación mediante test cutáneo (PRICK) de la alergenicidad del componente de 48 kDa. Los valores representados son las áreas en mm² de las pápulas inducidas por el extracto comercial (a 5-6 mg/ml), la proteína purificada (a 18 µg/ml) y el control de histamina. Se muestran así mismo datos clínicos de interés en cada paciente estudiado.

(media del resultado de ambos brazos) se muestran en la tabla 4.XI. Se aprecia que casi en la totalidad de los enfermos el tamaño de la pápula, inducida por el componente de 48 kDa, fue superior a 3 mm^2 y en el 50% de los enfermos el tamaño fue igual o superior a la de la histamina. Estos resultados confirman que el componente purificado es un alergeno.

4.4.1.3 Cromatografía de exclusión molecular a nivel preparativo

El extracto de partida de la cromatografía anterior, había sido cambiado de tampón y concentrado con el fin de obtener un alto rendimiento cromatográfico. Se observó que durante esta fase de preparación de la muestra, se precipitaba una importante cantidad de proteína. Debido a que el componente de 48 kDa se extraía minoritariamente a pH neutro, cabía pensar que el cambio de pH podía favorecer la precipitación de esta proteína. El proceso se escaló a nivel preparativo para poder disponer de la proteína suficiente para su caracterización bioquímica, pero sin cambiar el tampón del extracto para evitar pérdidas. Se observó un incremento de absorvancia en la zona del pico, correspondiente a la elución de la banda (figura 4.29A). El estudio electroforético reveló que el incremento de absorvancia se debía al aumento de una sustancia que interfería el proceso eléctrico (figura 4.29B). El comportamiento electroforético y las características de tinción reflejaban que su naturaleza no era proteica. El tratamiento de la fracción con 2 β -mercaptoetanol corregía la interferencia, lo cual indica que el alergeno se une a dicha sustancia y produce el cambio observado en la electroforesis. (figura 4.30)

RESULTADOS

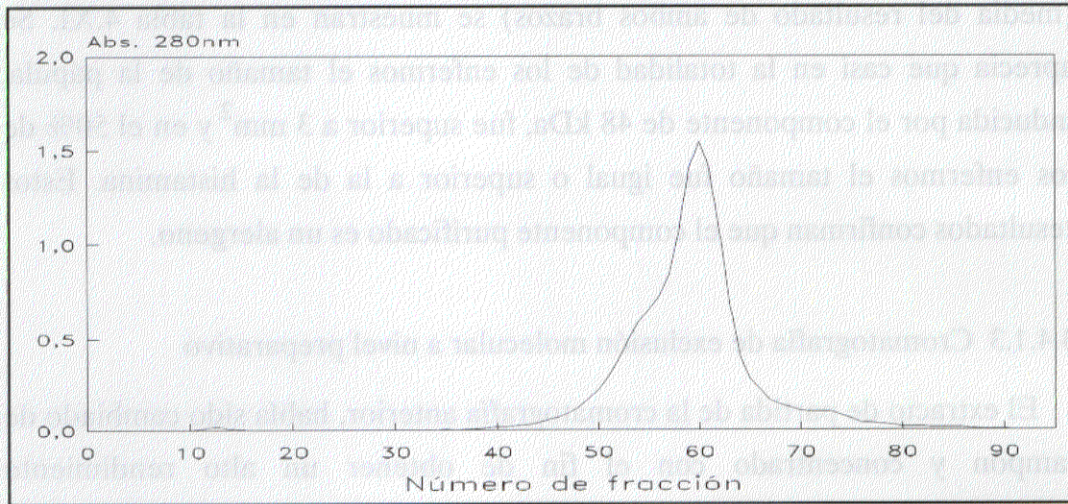


Figura 4.29A

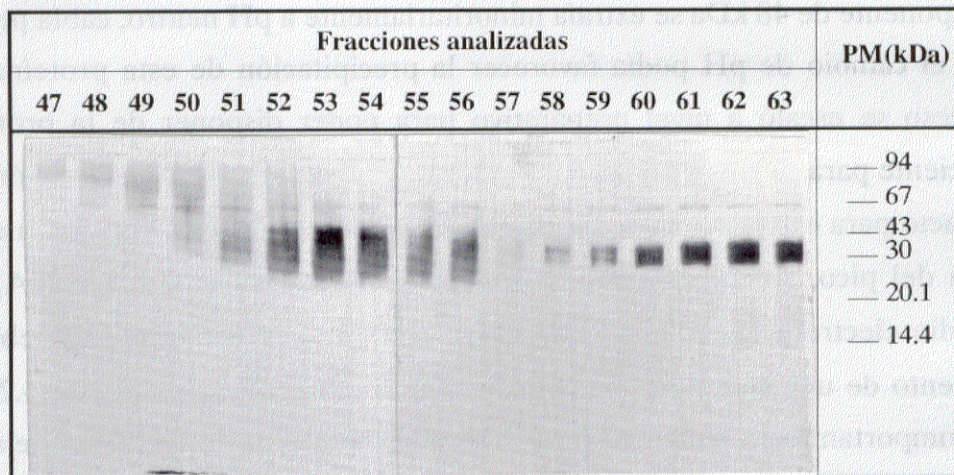


Figura 4.29B

Perfil de elución de la cromatografía preparativa de exclusión molecular del extracto E1-19h, obtenido por incubación ácida del polen de 1987. En la parte inferior se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas

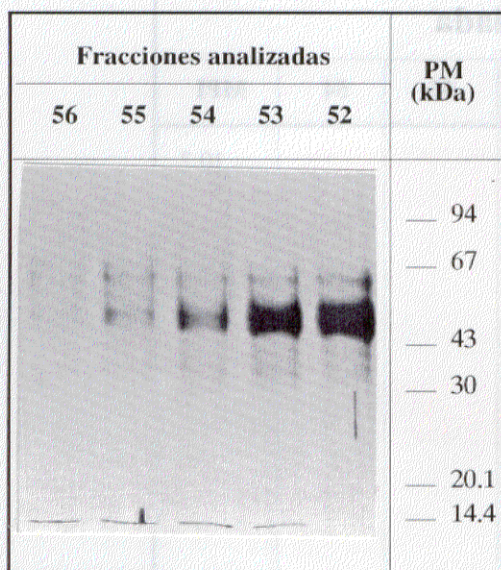


Figura 4.30

Corrección con 2βmercaptoetanol de la interferencia en la electroforesis de las fracciones cromatográficas de exclusión molecular del extracto ácido E1-19h.

4.4.1.4 Determinación del punto isoeléctrico del componente purificado

La determinación de los puntos isoeléctricos de los componentes de las fracciones de la cromatografía anterior, se llevó a cabo mediante isoelectroenfoque de las más representativas (54, 55, 60, 61, 62 y 63). Los resultados de este proceso pueden verse en la figura 4.31. Se observa una precipitación en el punto de aplicación así como una movilidad similar de los componentes de las distintas fracciones hacia la zona ácida. Los puntos isoeléctricos de las proteínas enfocadas se sitúan entre 4 y 6 observándose también material básico mal enfocado. La banda de peso molecular de 48 kDa se desdobra, mediante esta técnica, en cuatro componentes de puntos isoeléctricos 5.4, 5.6, 5.7 y 5.9.

RESULTADOS

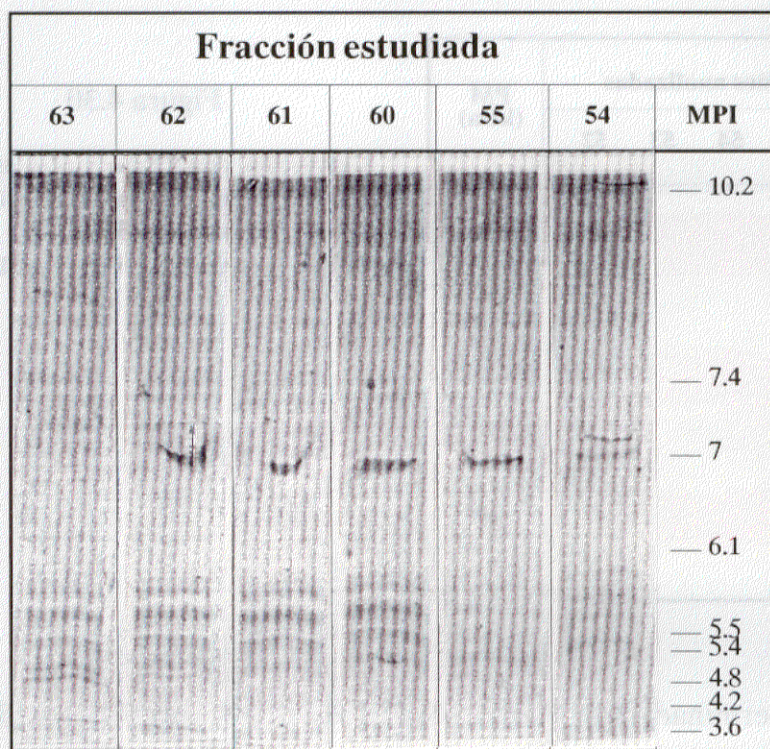


Figura 4.31

Patrón de isoelectroenfoque de las principales fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular preparativa del extrato ácido E1-E19h. El proceso se realizó en presencia de urea y de detergente (N octil β -D glucopiranosido).

4.4.1.5 Cromatografía de intercambio catiónico

Teniendo en cuenta los resultados previos sobre las características de peso molecular de los alérgenos, se mezclaron las fracciones de la exclusión molecular que contenían únicamente componentes de peso molecular cercanos a 30 kDa (fracciones 60, 61, 62 y 63). La mezcla fue sometida a

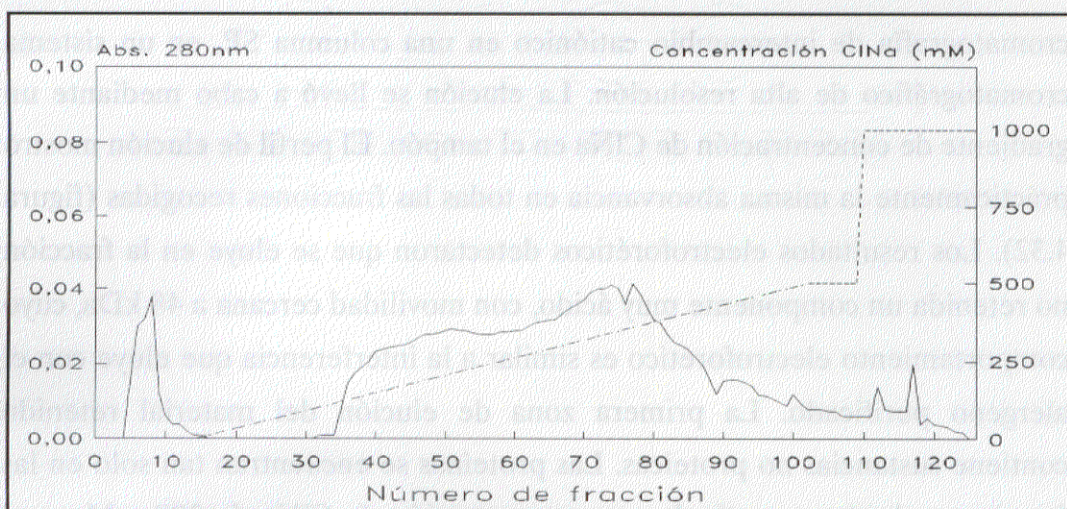


Figura 4.32A

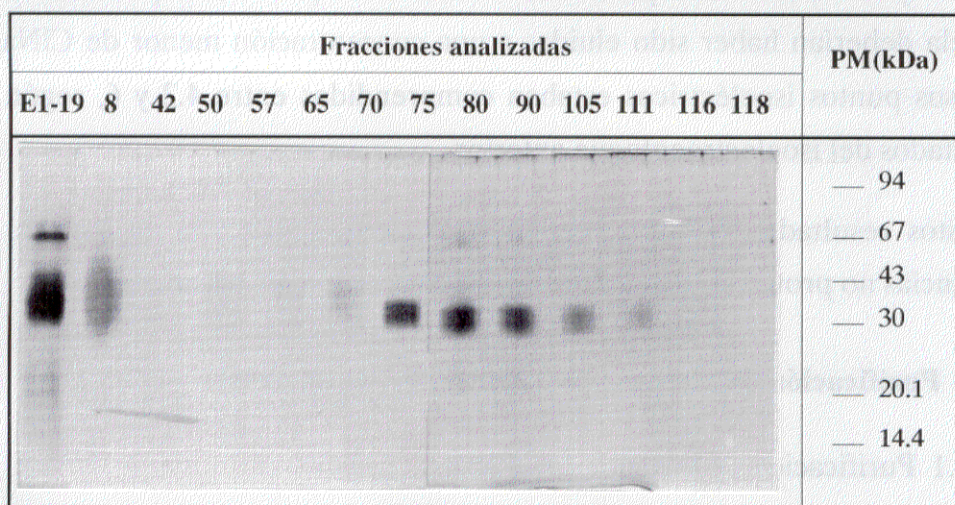


Figura 4.32B

Perfil de la cromatografía de intercambio catiónico realizada con las fracciones, recogidas en la cromatografía de exclusión molecular anterior, que exclusivamente contenían componentes de peso molecular cercano a 30 kDa.

En la figura inferior se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas.

RESULTADOS

cromatografía de intercambio catiónico en una columna SP, en un sistema cromatográfico de alta resolución. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de concentración de ClNa en el tampón. El perfil de elución mostró prácticamente la misma absorbancia en todas las fracciones recogidas (figura 4.32). Los resultados electroforéticos detectaron que se eluye en la fracción no retenida un componente muy ácido, con movilidad cercana a 48 kDa, cuyo comportamiento electroforético es similar a la interferencia que eluye con el alérgeno purificado. La primera zona de elución del material retenido contiene sustancias no proteicas. Las proteínas se encuentran tan solo en las fracciones eluidas a partir de una concentración de ClNa de 300 mM en el tampón de elución, y además se eluyen sin haber sido resueltas. Teniendo en cuenta que la muestra de partida se encontraba a pH 4.8, las proteínas de la mezcla deberían haber sido eluidas a una concentración menor de ClNa, ya que sus puntos isoeléctricos estaban comprendidos entre 4.2 y 6, según los resultados del isoelectroenfoque anterior.

Estos resultados reflejan, por tanto, que en el extracto de partida hay sustancias no proteicas que dificultan el estudio de estas proteínas.

4.4.2 Purificación de alérgenos a partir del polen de 1991

4.4.2.1 Purificación de la banda de 48 kDa

La alta proporción de componentes de 48 kDa que se recogía en la incubación ácida del nuevo polen y la posible ausencia de interferencias, sugería la repetición del estudio de la banda de 48 kDa con extractos de este polen. El extracto de partida contenía las proteínas liberadas por el polen nuevo durante la incubación en tampón glicina entre 1 y 4 horas. No se

RESULTADOS

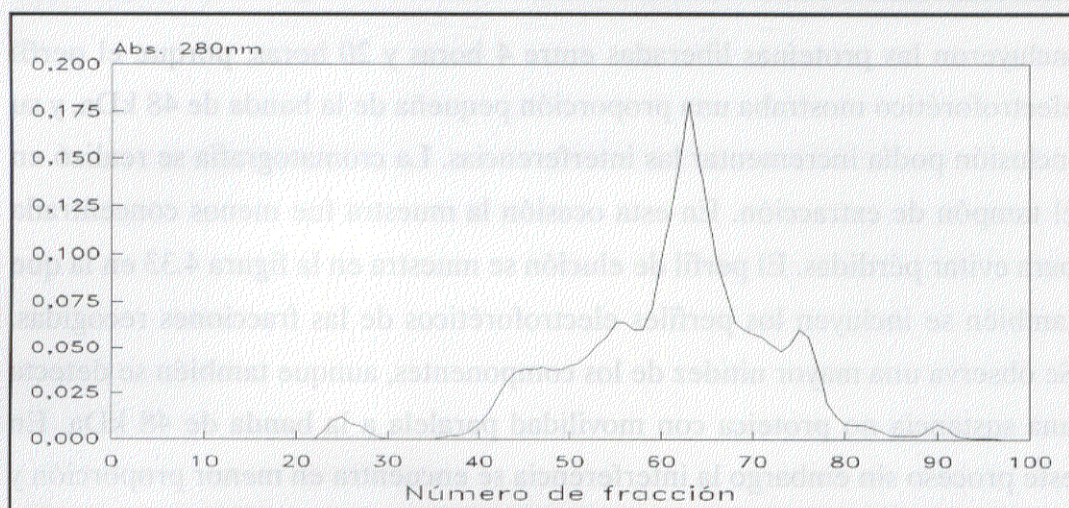


Figura 4.33A

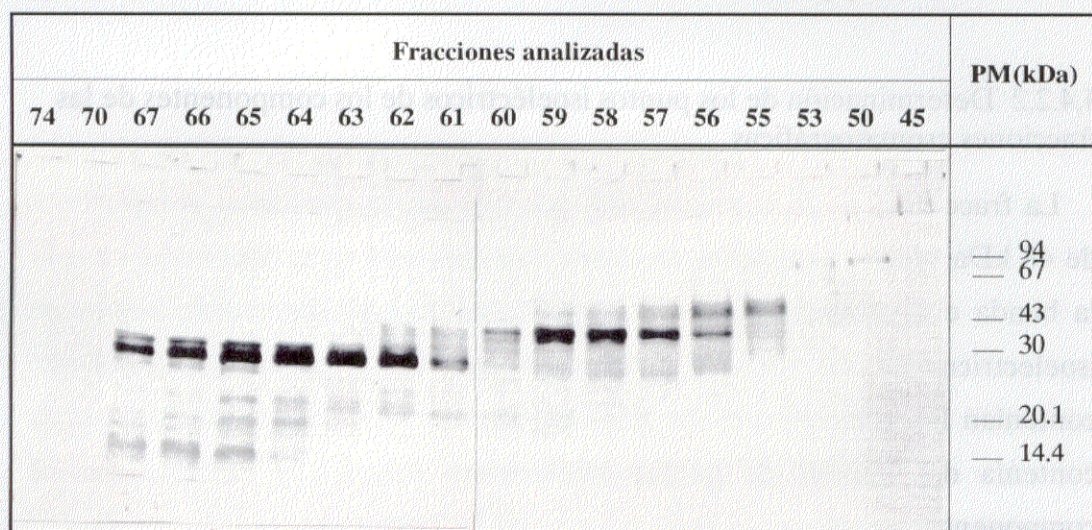


Figura 4.33B

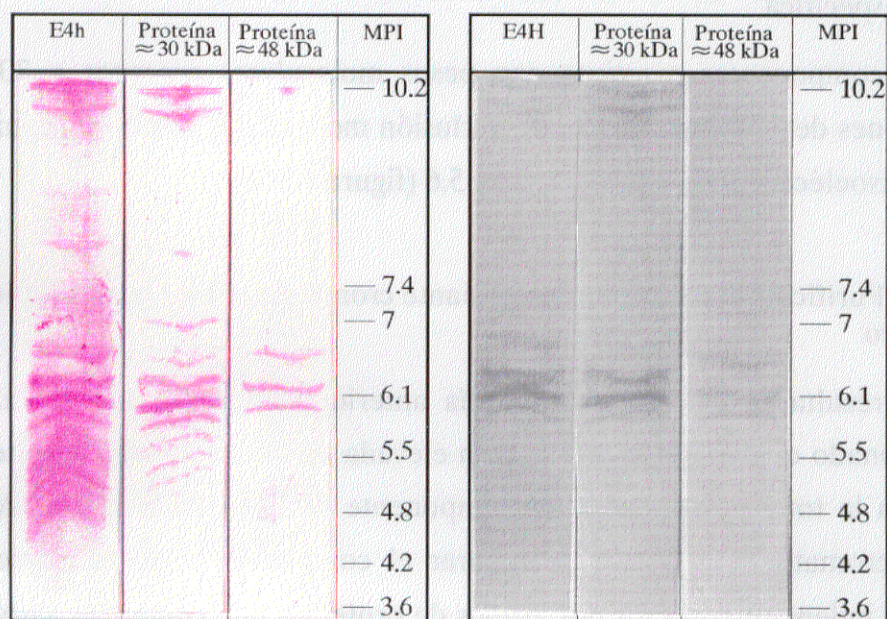
En la figura A se muestra el perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular de las proteínas recogidas entre una y cuatro horas de incubación ácida del polen de 1991. En la figura B se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas en esta cromatografía.

RESULTADOS

incluyeron las proteínas liberadas entre 4 horas y 20 horas, porque el perfil electroforético mostraba una proporción pequeña de la banda de 48 kDa, y su inclusión podía incrementar las interferencias. La cromatografía se realizó en el tampón de extracción. En esta ocasión la muestra fue menos concentrada para evitar pérdidas. El perfil de elución se muestra en la figura 4.33 en la que también se incluyen los perfiles electroforéticos de las fracciones recogidas. Se observa una mayor nitidez de los componentes, aunque también se detecta una sustancia no proteica con movilidad paralela a la banda de 48 kDa. En este proceso sin embargo la interferencia se encuentra en menor proporción y su presencia no distorsiona la movilidad de la proteína. La mayor resolución de las bandas permite apreciar que la banda 48 kDa podría estar desdoblada en dos bandas muy próximas.

4.4.2.2 Determinación de los puntos isoeléctricos de los componentes de las fracciones cromatográficas

La fracciones de la cromatografía anterior que contenían el componente de 48 kDa fueron analizadas mediante isoelectroenfoque, observándose que la banda está mayoritariamente formada por tres componentes de puntos isoeléctricos 5.7, 6.1 y 6.5. El análisis por esta técnica de las fracciones que contenían los componentes de 30 kDa (62, 63 y 64) mostró que la muestra contenía dos bandas de puntos isoeléctricos 9.3, 9.1, y el resto de los componentes se enfocaban entre 6.8 y 5 (ver figura 4.34A).



A

B

Figura 4.34

A) Estudio mediante isoelectroenfoque de las proteínas contenidas en el extracto de cuatro horas de incubación ácida del polen de centeno de 1991, en las fracciones 62, 63 y 64 (proteína ≈ 30 kDa), recogidas en la cromatografía de exclusión molecular del extracto anterior, y en las fracciones que contenían las proteínas de 48 kDa en la misma cromatografía

B) Inmunodetección de los componentes alérgicos de las muestras estudiadas por isoelectroenfoque.

4.4.2.3 Identificación de alérgenos en las fracciones cromatográficas

Una vez separados mediante isoelectroenfoque, los componentes de las fracciones de la cromatografía anterior fueron transferidos mediante presión a una membrana de Inmobilon P. La inmunodetección de componentes

RESULTADOS

reactivos reveló que los tres componentes de la banda de 48, unían IgE de forma específica.

Los componentes reactivos con pesos moleculares cercanos a 30 kDa (fracciones de la cromatografía de exclusión molecular), tenían los siguientes puntos isoeléctricos: 9.3, 9.2, 6.2, 5.8 y 5.6 (figura 4.34B)

4.4.2.4 Purificación de alergenios mediante cromatografía de intercambio catiónico

Los resultados de la cromatografía anterior mostraban que el extracto seleccionado contenía una proporción elevada de sustancia interferente, que impedía la total purificación del componente 48 kDa. La finalidad de esta nueva cromatografía fue la de separar el compuesto ácido interferente y recoger independientes los dos grupos de proteínas que contenían alergenios: proteínas con puntos isoeléctricos básicos por encima de 8 y las proteínas ácidas enfocadas entre 6.5 y 5. En la figura 4.35 se ve el perfil de elución de esta nueva cromatografía, así como los resultados del análisis electroforético de sus fracciones. Análogamente a la cromatografía anterior de intercambio catiónico, realizada con los componentes de 30 kDa del polen antiguo, se eluye una sustancia no proteica en volumen excluido. Esta sustancia representa un porcentaje elevado de la absorvancia total de la muestra, y no es de naturaleza proteica ya que no se tiñe con plata. Las primeras fracciones recogidas, incluyen así mismo sustancias no proteicas. Mediante este tipo de cromatografía se recogen, en las primeras fracciones la mayor parte de los componentes ácidos de 28, 30, 33 y 48 kDa así como un nuevo componente de 43 kDa. Mediante este tipo de cromatografía se logran separar del resto de

RESULTADOS

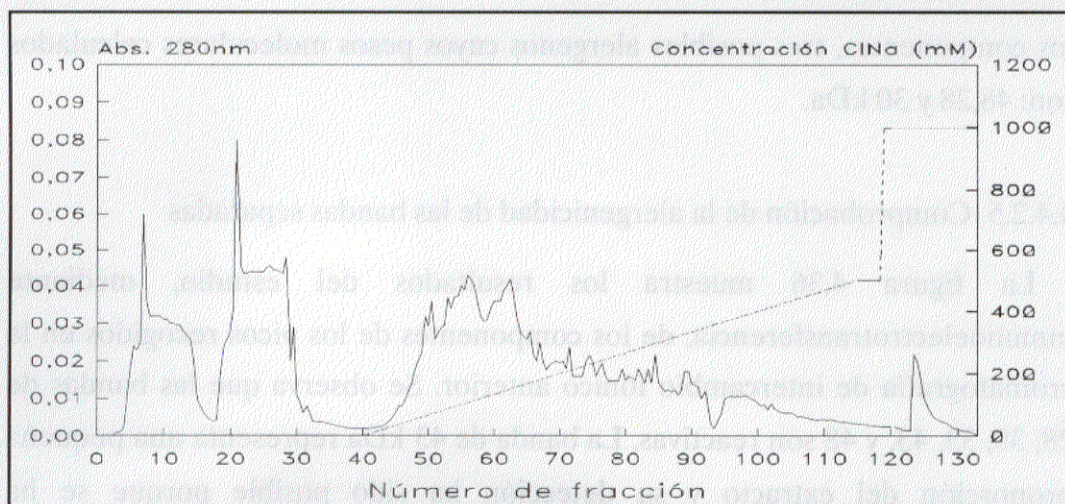


Figura 4.35A

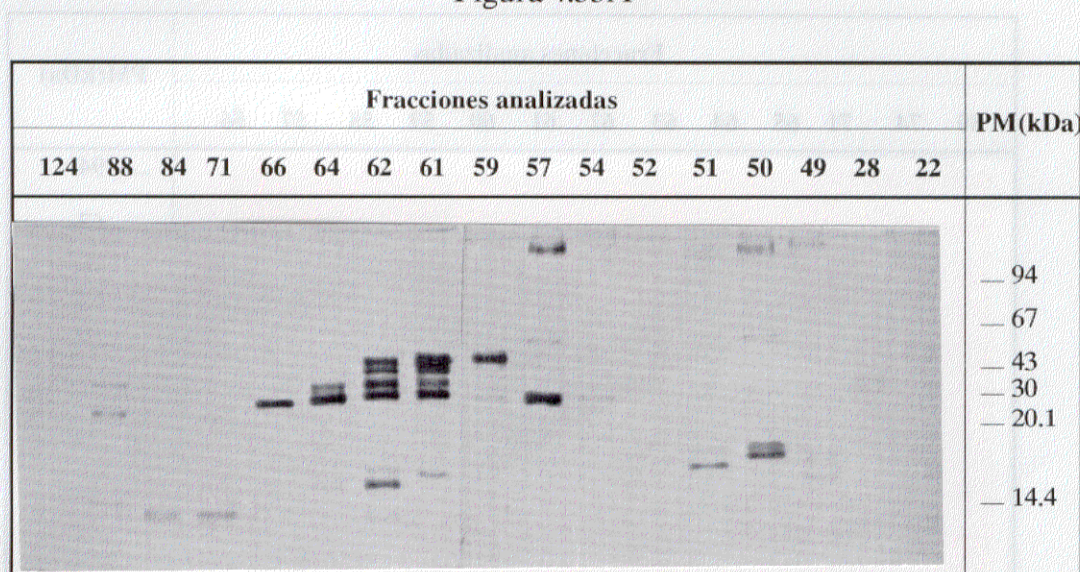


Figura 4.35B

En la figura A se muestra el perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular de las proteínas recogidas entre una y cuatro horas de incubación ácida del polen de 1991. En la figura B se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas en esta cromatografía.

RESULTADOS

los componentes, tres posibles alérgenos cuyos pesos moleculares calculados son: 48,28 y 30 kDa.

4.4.2.5 Comprobación de la alérgenicidad de las bandas separadas

La figura 4.36 muestra los resultados del estudio, mediante inmuno-electrotransferencia, de los componentes de los picos recogidos en la cromatografía de intercambio iónico anterior. Se observa que las bandas de 28, 30, 33, 43, y 48 son reactivas. La banda de 43 kDa representa una pequeña proporción del extracto y su detección ha sido posible porque se ha concentrado en un pico cromatográfico.

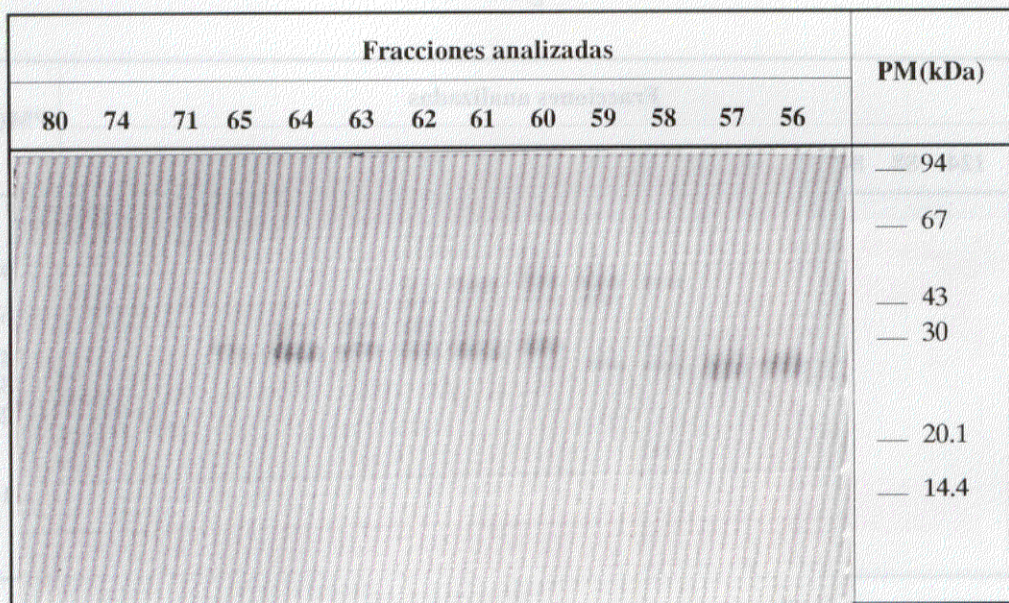


Figura 4.36

Resultados de la identificación de alérgenos, en las distintas fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular de las proteínas extraídas entre una y cuatro horas de incubación ácida del polen de 1991.

RESULTADOS

En la tabla 4.XII se muestran los resultados del prick realizado con los tres componentes purificados en la cromatografía anterior. La prueba cutánea se llevó a cabo midiendo la reactividad de los componentes separados a dos concentraciones diferentes, realizándose simultáneamente en los dos brazos.

	Área de las pápulas (mm ²)								Diámetro MAX (mm)			
	ALERGENOS								Histamina	sacale dome	gramineas	salino
	1		2		3		4					
A	B	A	B	A	B	A	B					
1	70	32	45	16	78	21	17	18	6	10	14	0
2	10	6	7	0	8	7	6	2	10	5	10	0
3	7	0	6	0	6	0	7	0	8	6	8	0
4	11	4	11	0	9	0	6	0	10	5	5	0
5	6	0	6	0	7	0	6	0	8	6	10	0
6	80	7	57	8	40	7	39	5	7	21	17	0
7	35	13	20	2	24	18	8	4	10	8	12	0
8	68	11	86	14	44	19	60	15	6	20	12	0
9	11	2	12	2	9	1	14	2	6	9	13	0
10	22	7	9	4	15	3	12	1	10	12	10	0
11	14	3	3	0	20	4	4	0	8	9	8	0

TABLA 4.XII

Resultados de la comprobación mediante test cutáneo (PRICK) de la alergenicidad de los componentes purificados a partir del potén recolectado en 1991. Los valores representados son las áreas en mm² de las pápulas inducidas por las muestras estudiadas:

1 = Componente de 27 kDa, ensayado a: A) 35 µg/ml; B) 3.5 µg/ml

2 = Componente de 48 kDa, ensayado a: A) 30 µg/ml; B) 3 µg/ml

3 = Componente de 30 kDa, ensayado a: A) 26.5 µg/ml; B) 2.6 µg/ml

4 = Componente de 48 kDa, ensayado a: A) 20 µg/ml; B) 2 µg/ml

Las muestras 1, 2 y 3 son los componentes purificados mediante cromatografía de intercambio aniónico y la muestra número 4 es el componente purificado mediante exclusión molecular.

RESULTADOS

Los resultados indican que las tres bandas separadas en la cromatografía son alérgenos.

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que la realización de extracciones a tiempos parciales, convenientemente seleccionadas, permite un estudio más detallado de los alérgenos que contiene el polen de centeno y simplifica la metodología para su purificación.

4.5 ANALISIS MICROSCOPICO DEL ESTADO DEL POLEN RETENIDO EN LA MUCOSA NASAL

Una parte de los resultados anteriormente descritos, demostraban que el polen de centeno libera sus componentes en función de las características del medio en el que se hidrata. Según esto, si el grano de polen no se rompe durante su permanencia en la mucosa nasal, las proteínas alérgicas se encontrarían entre aquellas que el polen libera en las condiciones de hidratación del órgano de choque. Si esto ocurre así, la incubación del polen en un fluido similar al del tejido alcanzado favorecería la extracción de las proteínas reactivas.

A la vista de todo esto, se hizo un análisis microscópico de las partículas retenidas por el moco nasal. Solamente se analizaron cuatro muestras ya que la finalidad del estudio fue la de observar si la morfología del polen se mantenía, después de su contacto con el medio húmedo, o si los pólenes se encontraban abiertos o deteriorados. La observación microscópica puso de relieve la existencia de pólenes enteros, principalmente de gimnospermas. Sin embargo se observó en dos ocasiones que el grano de polen podía emitir el tubo polínico sobre la mucosa nasal. En la figura 4.37 se muestra una de las

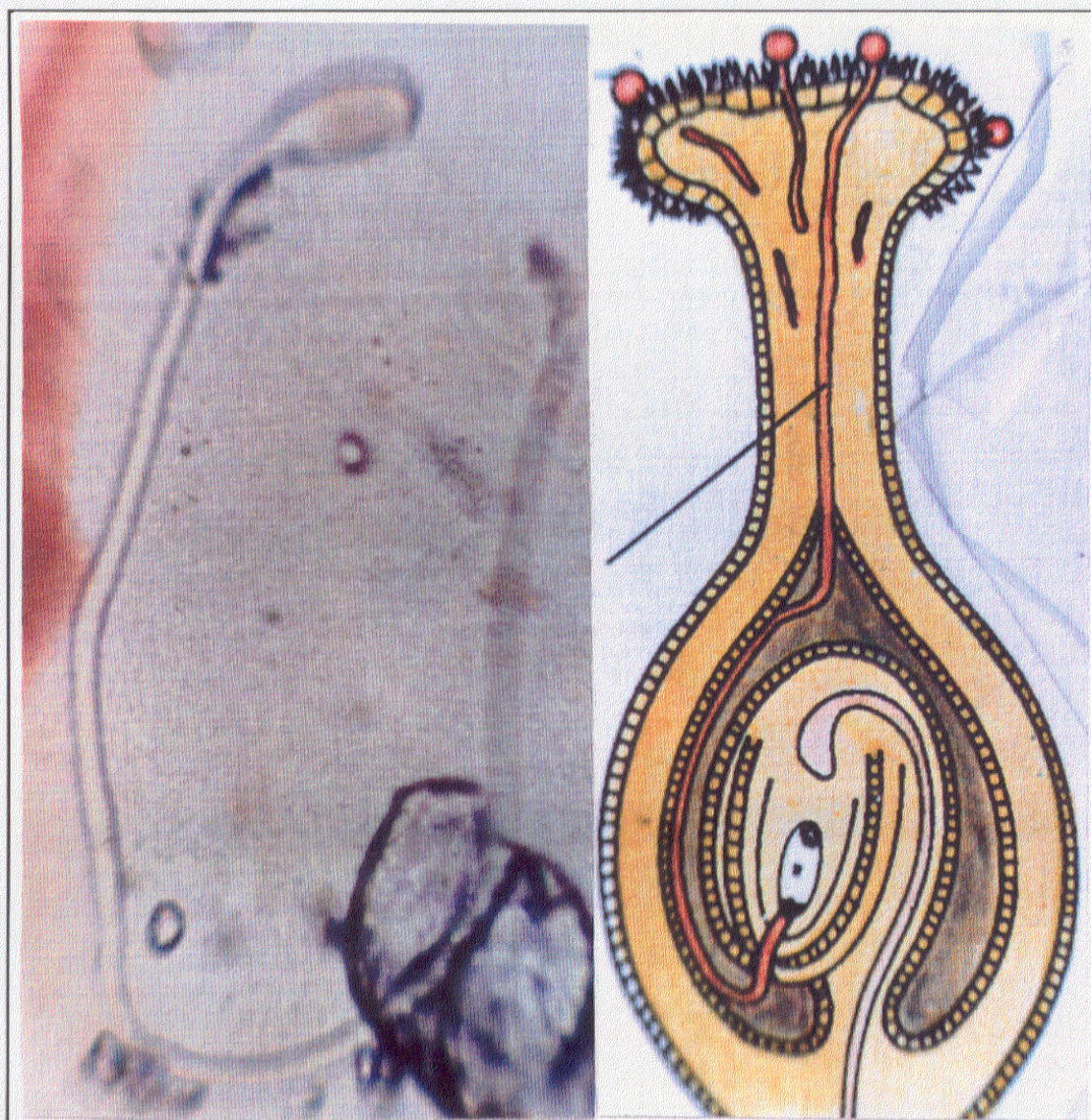


Figura 4.37

A la izquierda de la figura se observa la imagen de un polen retenido en la mucosa nasal, que ha sido capaz de emitir el tubo polínico. A la derecha se muestra, a modo de comparación, un esquema del proceso botánico de la fecundación de la ovocélula por el polen.

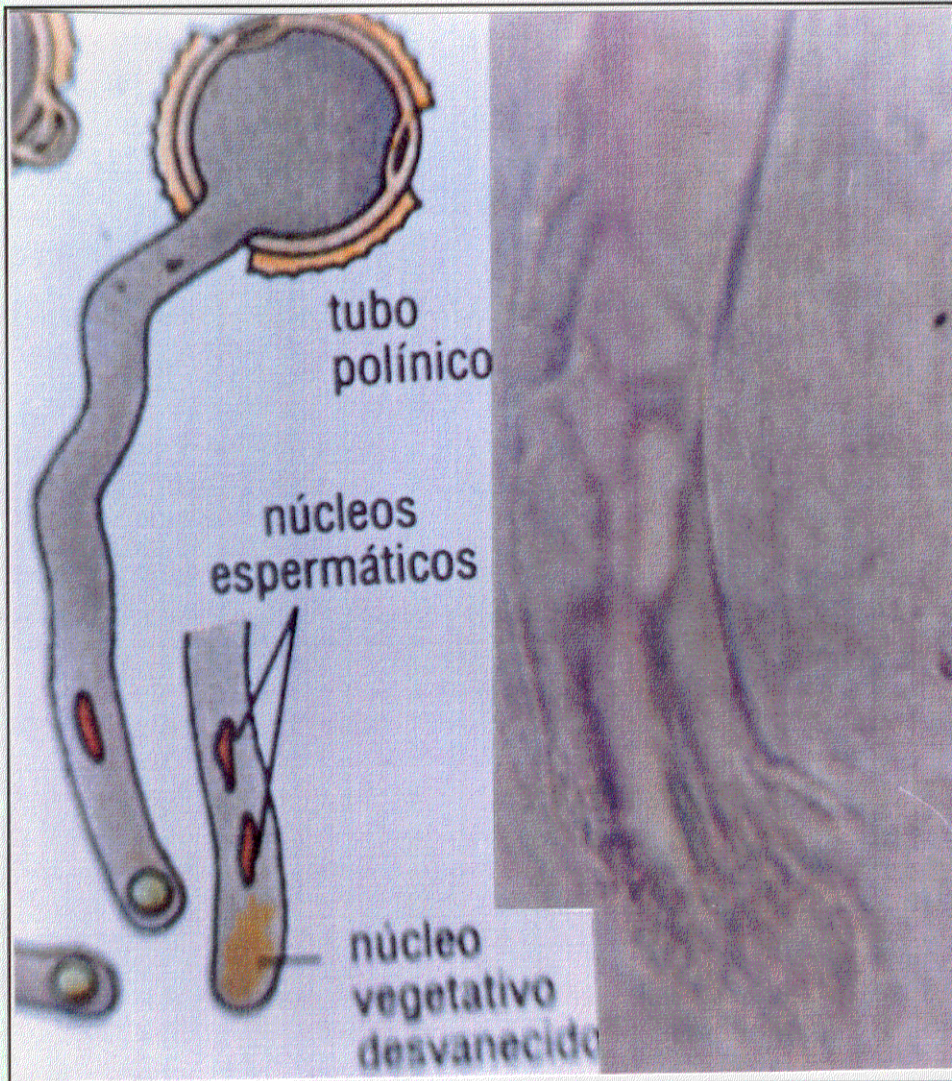


Figura 4.38

A la derecha se muestra en detalle la parte distal del tubo polínico, emitido por un polen en la mucosa nasal. Se aprecian los dos núcleos espermáticos a punto de ser liberados y un núcleo vegetativo desvanecido. En la izquierda puede verse un esquema comparativo de la posición de los núcleos en el tubo polínico al final de la germinación.

imágenes observadas y se compara con el esquema sobre fecundación de la ovocélula descrito por Carmen Albadalejo *et all* (1989). Se aprecia que el tubo emitido tiene una considerable longitud y parece mimificar el comportamiento botánico que tiene en el ovario.

En la figura 4.38 se aprecia en detalle la parte más distal del polen germinado. Se observa que al final del tubo polínico se encuentran los dos núcleos espermáticos así como el núcleo vegetativo ya desvanecido. La imagen es coincidente con el esquema del proceso botánico.

Figura 4.39

Detalle del polen germinado en la mucosa nasal. Se aprecia un opérculo intacto en el polo opuesto al tubo polínico.



En la figura 4.39 se muestra el resto del polen germinado, apreciándose un opérculo cerrado en el polo opuesto al tubo polínico, lo cual implica que el polen era bioperculado.

RESULTADOS

Las imágenes descritas ponen de relieve que un polen puede llevar a cabo los procesos botánicos necesarios para fecundar la ovocélula, mientras se encuentra retenido por el moco nasal. El momento en el que el proceso se interrumpe será dependiente de la especie a la que pertenece el polen así como de las condiciones del tejido en el que impacta.

Estas transformaciones botánicas que el polen experimenta durante su permanencia en la nariz, son condicionantes de la emisión de sus componentes y sugieren que algunos alergenicos podrían no ser extraídos, o hacerlo en una baja proporción, mediante los procedimientos actuales de preparación de extractos alérgicos.

DISCUSION

En el momento actual se considera que el diseño de la tecnología óptima para la preparación de extractos alergénicos debe basarse en el conocimiento de las características biológicas del material de partida (Platts-Mills, T.A.E. y Chapman, M.D., 1991; Baraniuk *et al.*, 1992).

El presente estudio se ha basado en los trabajos de Heslop Harrison (1979) y Watanabe (1955), sobre las características botánicas del polen de centeno y sobre su comportamiento en un medio acuoso. Se consideró de interés conocer, en primer lugar, como se comporta el polen de centeno durante los procesos de incubación, analizando como y cuando libera sus proteínas y alérgenos. Para ello hemos tenido en cuenta que durante la incubación se produce la hidratación del polen y con ella se inician una serie de procesos destinados a la germinación del mismo. En el polen de centeno la mayor parte de los materiales que se necesitan para su germinación han sido sintetizados antes de su liberación a la atmósfera, por lo que la simple hidratación del polen da lugar al inicio del proceso. La fase en la que éste se interrumpe es dependiente de la interrelación polen-medio. El conocimiento de los procesos que ocurren en el polen durante la incubación, permite analizar como se produce la emisión de proteínas y alérgenos durante la misma y conocer como influyen algunos factores en la preparación de los extractos alergénicos.

Una vez estudiadas las características cinéticas de los componentes solubles del polen de centeno, nuestro interés se centró en obtener extractos altamente enriquecidos en alérgenos, mediante una selección de las condiciones de incubación. El resultado del procedimiento es equivalente al

DISCUSION

de un fraccionamiento bioquímico de los componentes del extracto total, pero la metodología la realiza el propio polen y con un alto rendimiento.

Partiendo de estos extractos hemos podido purificar tres alergenos mediante un único proceso cromatográfico, uno de los cuales no se incluye en ninguno de los grupos de alergenos descritos para las gramíneas.

5.1 COMPORTAMIENTO DEL POLLEN DE CENTENO DURANTE LOS PROCESOS DE INCUBACION

Inicialmente se seleccionó, como medio de incubación par el estudio, el tampón fosfato por ser uno de los recomendados para la preparación de extractos alergénicos, así como porque contenía una concentración de iones adecuada para evitar la rotura de los pólenes. Por otra parte, dentro de nuestro concepto de que el polen libera sustancias al medio en función de una interrelación con éste, el tampón seleccionado simula al que el polen pueda encontrar en el órgano de choque. En estas condiciones, los componentes que se liberan al medio pueden ser similares, si no iguales a los que el polen libera normalmente al alcanzar dicho órgano.

Los resultados obtenidos así como la información bibliográfica sobre la influencia del pH en la extracción de alergenos, nos sugirieron la repetición del estudio bajo diferentes condiciones de pH. La selección de pHs extremos (3 y 10) se hizo con el fin de resaltar su influencia sobre la extracción y la selección de tampones carbonato y glicina se debió a su capacidad tamponante a los pH elegidos.

5.1.1 Roturas de pólenes

Se ha descrito que durante la hidratación del polen de centeno, viable o no viable, pueden producirse roturas de las paredes celulares (Heslop-Harrison, 1979). El fenómeno se debe a que una vez recuperado el plasmalema, los coloides citoplasmáticos hacen que el agua siga penetrando en la célula. La tensión creada en el interior celular por la continua entrada de agua, es muy alta y se produce la rotura de las membranas por el opérculo. Si el tampón no contiene sustancias que regulen esta entrada de agua, los pólenes se romperían durante el proceso de incubación. Este hecho daría lugar a la liberación del contenido citoplasmático al medio de incubación y alteraría los resultados del estudio cinético. Los primeros resultados del recuento microscópico de pólenes rotos durante los procesos de extracción mostraban una baja proporción de roturas, muchas de ellas por zonas diferentes a la apertura, lo cual implica una rotura mecánica. Estos datos nos sugerían que la concentración empleada de ClNa (150 mM), compensa osmóticamente las concentraciones de solutos del interior del polen.

Ante las diferencias observadas en la emisión de proteínas y alérgenos de los pólenes recién recolectados, se pensó que podían existir diferencias en el grado de conservación de las membranas de sus células plasmáticas. De acuerdo con los estudio de hidratación de Heslop-Harrison (1979), la incubación en agua destilada, sin iones que compensen la entrada de agua en la célula, provoca la rotura únicamente en los pólenes que mantienen la capacidad de recuperación de las características osmóticas de sus membranas. La incubación de los diferentes pólenes de centeno, en agua destilada, produjo únicamente la rotura del polen recién recolectado, el cual rompió sus

DISCUSION

membranas a los 40 segundos de entrar en contacto con el líquido. Esta observación es totalmente coincidente con los resultados experimentales del autor antes citado. La ausencia de roturas en los pólenes conservados es contradictoria con la capacidad de algunos de ellos de emitir sus proteínas con diferentes cinéticas de emisión. Una posible explicación a esta discrepancia podría encontrarse en que el polen conservado haya mantenido activo su metabolismo celular y se hayan degradado una parte de los coloides citoplasmáticos. Este hecho daría lugar a una disminución en la penetración del agua y la tensión creada no sería suficiente como para producir la rotura de la membrana.

Los pólenes de Allergon no mostraron diferencias cinéticas en la emisión de sus componentes y no rompían sus membranas en agua destilada. Este comportamiento puede reflejar en cambio, una alteración permanente de las características reguladoras de la membrana celular.

De acuerdo con todo esto, las roturas por choque osmótico de los pólenes, solo se produce si el polen está bien conservado y en el medio de incubación no existen solutos que equilibren la entrada de agua al polen.

Dentro de las recomendaciones de la IUIS, para la preparación de los extractos a partir de pólenes, se requiere que éstos se incuben en agua destilada. Es evidente que, tanto desde un punto de vista experimental como teórico, si los pólenes de las gramíneas están bien desecados y conservados romperán sus membranas a los 40 segundos de entrar en contacto con el agua destilada y su contenido citoplasmático empobrecerá la calidad del extracto. Esta recomendación por lo tanto no es aplicable en la preparación de extractos con pólenes de estas plantas.

5.1.2 Liberación de proteínas

Los resultados del presente estudio sobre emisión de proteínas al medio de incubación, ponen de manifiesto que el polen de centeno libera sus proteínas con diferentes cinéticas y tasas de emisión. Las características de la liberación son diferentes en los pólenes nuevos y en los conservados y en ambos se modifica dependiendo del medio de incubación en el que se encuentran.

La base biológica de las diferencias cinéticas en la emisión de proteínas puede encontrarse en su localización en el grano de polen así como en el grado de interacción que posean con las estructuras de éste. De acuerdo con los conocimientos teóricos sobre el comportamiento del polen en un medio acuoso, las proteínas que se liberan al medio de incubación pueden localizarse tanto en la pared celular del polen como en su citoplasma.

La extracción de las proteínas citoplasmáticas se produce principalmente durante la fase de expulsión, y dura hasta que la membrana recupera por completo sus características de membrana semipermeable. Este proceso se realiza en el polen del centeno con extremada rapidez (30 segundos), por lo que los componentes citoplasmáticos se recogerán en las primeras extracciones. Experimentalmente este hecho se corrobora con la obtención de una elevada proporción de proteína durante el primer minuto de incubación así como por la drástica modificación de pH que se produce en el medio durante este corto periodo. Teniendo en cuenta que los hidratos de carbono interfieren con el método de Lowry y los ácidos nucleicos con la valoración de proteínas mediante relación densitométrica 280/260, la interferencia detectada en las valoraciones de los extractos del primer minuto por estos métodos, también puede reflejar que el extracto contienen una

DISCUSION

mayor proporción de dichos componentes citoplasmáticos. Los resultados electroforéticos muestran que las proteínas liberadas durante este primer minuto son principalmente las de menor peso molecular. Este resultado es constante en los diferentes pólenes estudiados, pero mientras que una parte de ellos cesa la emisión a los 15 minutos de la extracción, en el polen de Allergon y en el de Sigma estas proteínas se siguen liberando durante todo el proceso de incubación. La emisión continuada de componentes de bajo peso molecular en estos pólenes, se justificaría por el posible deterioro de la membrana plasmática anteriormente comentada.

De acuerdo con lo expuesto por Heslop-Harrison (1979), las proteínas citoplasmáticas dejarían de ser emitidas poco después del minuto de incubación y sin embargo aquí hemos observado que continua hasta los 15 minutos del proceso. Esta prolongación en el tiempo de emisión se produce tanto en el polen conservado como en el recién recolectado y puede deberse a varias causas o a la suma de todas ellas. Por un lado, las características del tampón podrían modificar comportamiento osmótico de la célula; por otro lado, este tiempo puede ser el necesario para que la totalidad del material liberado atraviese la pared del polen y alcance el medio de incubación. También debe de tenerse en cuenta que la incubación se realiza *in vitro* y a 0 C, mientras que los datos de Heslop Harrison (1979) se basan en experimentos a temperatura ambiente y sobre el estigma de la planta.

Por otra parte la mayoría de los estudios inmunohistoquímicos en diversos pólenes (Knox y Heslop-Harrison, 1971; Knox *et al*, 1980; O'Neil *et al*, 1990), muestran que las proteínas liberadas al medio en la fase inicial de la incubación se localizan sobre la pared del polen, en su citoplasma o en ambos. Recientes estudios (Grote, 1991) han descrito como exclusivamente

citoplasmática, la localización de un alérgeno de 17 kDa, de rápida emisión, en el polen de *Betula verrucosa*. En este trabajo se sugiere que algunas de las proteínas, localizadas a la vez sobre la pared del polen y en su citoplasma, sean únicamente citoplasmáticas y que, debido a su rápida velocidad de extracción, han difundido a la pared durante el proceso de fijación del tejido.

Entre las proteínas de rápida emisión también podrían estar incluidas las proteínas de la exina. Las sustancias proteicas que contiene esta capa de la pared, han sido transferidas desde el tapetum, al final del desarrollo del polen, y se encuentran formando depósitos en las cavidades de la capa. La unión por tanto de estas proteínas con el polen es leve y se liberan a los pocos segundos de entrar en contacto con un medio acuoso, a través de toda la superficie del polen. Se ha descrito que los pólenes de las gramíneas poseen un bajo contenido de proteínas en la exina, indicándose incluso que las esterases, enzimas típicas de las exinas de muchos pólenes, se localizan en la intina. Según esto la contribución de las proteínas de la exina en la composición proteica de los primeros extractos debe ser escasa.

Las proteínas de la intina se encuentran en forma de inclusiones o formando túbulos y láminas en el interior de ésta. Su liberación se produce a través del polo germinativo y se requieren periodos de incubación más largos, ya que se necesita que la intina se encuentre hidratada, que los túbulos y los depósitos se deshagan, y que alcancen posteriormente el polo germinativo. Se ha descrito que las proteínas de la intina tardan en liberarse al medio de incubación *in vitro*, periodos de tiempo alrededor de 30 minutos (Heslop Harrison *et al*, 1973). En el estudio que realizamos sobre emisión de proteínas del polen de 1987, comparamos la proteína extraída rompiendo el polen por sonicación, con la extraída mediante incubación del polen durante 19 h.

DISCUSION

Aunque los valores en contenido proteico fueron similares, el patrón electroforético reveló una baja proporción de componentes de 30 kDa en el extracto del polen sonicado. Puesto que el periodo de sonicación fue corto (15 minutos), la baja extracción de estos componentes del polen, sugiere que estas proteínas se localizan en la pared y no han sido extraídas de ésta. Según esto, las proteínas de peso molecular cercano a 30 kDa serían proteínas de la intina. El retraso en la liberación de estas proteínas en los pólenes conservados refleja probablemente un retraso en la disolución de los túbulos por alteraciones producidas en el polen durante el proceso de conservación.

5.1.2.1 Liberación de proteínas en diferentes medios de incubación

Marsh *et al* (1981) han descrito que el pH del medio influye sobre la extracción de los componentes de los pólenes de forma que a pH ácido se verían favorecidos los componentes más básicos y a pH básico los más ácidos. En nuestro estudio las diferencias en las cinéticas de extracción observadas en las incubaciones con los distintos tampones, no parece deberse a que el medio condicione la extracción en función de la carga de la proteína, ya que en los tres tampones se extrae una alta proporción de componentes ácidos y básicos. Baraniuk *et al* (1988 y 1992) describen una diferencia de comportamiento, en cuanto a emisión de proteínas entre el polen de la Ambrosia y el polen del *Lolium perenne*, bajo las mismas condiciones de extracción. Estos autores observan una alta proporción de componentes básicos entre las proteínas de rápida emisión del polen de la ambrosia y un retardo en las más ácidas, mientras que no observan variaciones de punto isoeléctrico entre las extraídas del polen de *Lolium* a diferentes tiempos. Es posible que en el polen de centeno la extracción de alguna proteína se vea favorecida o retardada en

función de la relación de su carga con el medio, (banda de pI 8 no extraída en tampón carbonato), pero más parece que puedan estar influyendo las diferentes interrelaciones del polen con los tres medios. El comportamiento del polen en glicina podría interpretarse incluso como que la presencia de este aminoácido en el medio condicione algún proceso metabólico del polen, ya que en las plantas este aminoácido participa en la cadena respiratoria dentro de la mitocondria. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que con el polen nuevo, que posee mejor conservadas sus características y estructuras celulares, se incrementa desproporcionadamente la cantidad de proteínas de 48 y 58 kDa recogidas con respecto a otras extracciones. Además las diferencias observadas entre extractos del polen nuevo y viejo son mayores en los obtenidos con tampón glicina.

Los resultados obtenidos en las extracciones con cambios consecutivos del tampón de incubación, ponen de relieve la importancia que tiene el medio de incubación sobre la extracción de proteínas del polen de centeno.

Un aspecto que está claramente condicionado por las características de pH del medio es la extracción de un componente ácido que interfiere con el proceso de isoelectroenfoque. Esta sustancia se detecta en los extractos preparados a partir de los 15 minutos de incubación, principalmente en condiciones neutras y básicas. Se observa que el avance de esta sustancia hacia el electrodo ácido provoca la precipitación de los componentes que encuentra en su desplazamiento, alterando su enfoque y distorsionando por lo tanto la información que nos da la técnica. En las extracciones con cambios consecutivos de tampón, se ve que cuando en tampón glicina ya no se extrae prácticamente nada de proteína, el cambio de tampón provoca además de un incremento significativo de la proteína extraída, la extracción de una alta

DISCUSION

proporción de una sustancia interferente. Debido a ello no se pudo analizar las características de carga molecular de los componentes extraídos.

La presencia de esta interferencia en los extractos totales determina que en sus patrones de isoelectroenfoque se detecte una baja proporción de componentes básicos, cuando por otras tecnologías y en los estudios por esta misma técnica de los extractos de los primeros 15 minutos, se comprueba que contienen una importante proporción de proteínas básicas. Estos resultados justifican la discrepancia que existe entre los trabajos de Renck y Einarsson (1987) y los de Westpal *et al* (1988) sobre las características de carga molecular de los alergenos del polen del centeno. Así mientras que los primeros autores detectan un alto porcentaje de alergenos básicos mediante estudios por inmunoelectroforesis cruzada, los segundos autores los describen en cambio como muy ácidos, al realizar una inmunodetección entre los componentes separados mediante isoelectroenfoque. En los estudios de colaboración internacional destinados a la preparación de extractos de referencia de los pólenes de las gramíneas: *Phleum pratense*, *Cynodon dactylis* y *Lolium perenne*, se describen como ácidos la mayor parte de los componentes de los pólenes, tras el análisis de los componentes de la muestra mediante isoelectroenfoque y sin embargo en el mismo trabajo los resultados de las inmunoelectroforesis cruzadas de las mismas muestras, ponen de manifiesto la presencia de una alta proporción de alergenos básicos (Gjesing *et al*, 1985; Baer *et al*, 1986; Stewart *et al*, 1988).

Por tanto podemos concluir que esta técnica puede dar una información errónea en el análisis de los extractos alergénicos de pólenes de gramíneas, sobre todo en las extracciones realizadas en tampón carbonato y fosfato que son los que normalmente se emplean.

Dentro de las recomendaciones de la IUIS para la correcta preparación de extractos se propone como control de los extractos preparados que sus patrones de isoelectroenfoque sean coincidentes con los descritos por diversos autores y sin embargo en la gran mayoría de ellos parece detectarse la presencia de la sustancia interferente.

5.1.3 Liberación de alergen

Los primeros estudios que realizamos con pólenes recogidos en el año 1987, mostraron que los alergen del polen de centeno eran proteínas de pesos moleculares 28, 33, 48 y 67 kDas y claramente se apreciaba que comenzaban a ser liberados a partir de los 15 primeros minutos de incubación, incluso alguno de ellos empezaba a liberarse después de 30 minutos. Aunque las características de pesos moleculares estaban de acuerdo con las descritas por Westphal *et al* (1988) y por Matthiesen *et al* (1990), estos datos no eran coincidentes con los de Linskens *et al* (1977), en los que se muestran como muy reactivos los componentes de rápida emisión. Así mismo, este resultado no justificaba la manifestación de los síntomas a los pocos minutos de la penetración del polen en las vías respiratorias. Si además se tiene en cuenta que éste permanece tan solo 20 minutos en la nariz, siendo arrastrado por el moco y deglutido, algunos de los alergen podrían incluso no tener contacto con el tejido por su largo periodo de extracción.

Los estudios realizados con el polen nuevo mostraron que las proteínas alérgicas se liberaban desde el primer minuto siendo los extractos más reactivos los de 15 minutos y una hora de incubación. De todo ello se deduce que el retraso en la emisión de estos componentes en los primeros pólenes estudiados es un artefacto debido a la conservación y no refleja lo que ocurre

DISCUSION

cuando un polen recién liberado alcanza el órgano de choque. Entre los alérgenos que mayoritariamente retrasan su emisión se encuentran aquellos de peso molecular cercano a 30 kDa. Según nuestros resultados estos componentes representan una alta proporción del total de la proteína extraída y por sus características de emisión, se localizarían en la íntina. Estas conclusiones están de acuerdo con los estudios de Heslop Harrison (1973), en los que se describe que la mayor parte de los alérgenos del polen del centeno se localizan sobre la íntina principalmente en la zona apertural. Si se tiene en cuenta el retraso en la emisión de alérgenos de los pólenes mal conservados, la preparación de extractos con éstos, mediante incubaciones muy cortas (entre 1-4 horas), dará lugar a la obtención de extractos más pobres, ya que una parte de los alérgenos pueden no haber sido liberados. Por otra parte si los extractos se preparan mediante ruptura mecánica de los pólenes por procedimientos de corta duración, los alérgenos de la íntina podrían no ser extraídos si no se incuban suficiente tiempo las membranas rotas.

Además de las distintas cinéticas de emisión que muestran los pólenes, dependiendo de su estado de conservación, también hay diferencias en las características moleculares de sus alérgenos. Así, en el polen nuevo, no se detecta en ninguna de las extracciones el componente de 67 kDa, sin embargo se comporta como alérgica una nueva banda de 58 kDa. Los dos componentes de 28 y 33 kDa se encuentran mal resueltos en los procesos electroforéticos del polen viejo. Los resultados de este estudio analítico con los extractos del polen nuevo ponen de manifiesto que están realmente formados por 3 alérgenos de 28, 30 y 33 kDa. Con respecto a la carga de las proteínas, los valores de pI calculados para los componentes de la banda de 48 kDa difieren entre los del polen nuevo y los del conservado. Los valores de

este último son más ácidos (5.4, 5.6, 5.7 y 5.9) que para el primero (5.7, 6.1 y 6.5). Así mismo los valores de los componentes de peso molecular cercano a 30 kDa, extraídos en medio ácido entre 1 y 19 horas de incubación del polen antiguo se enfocaron entre 4 y 6, mientras que los equivalentes extraídos del polen nuevo se enfocan entre 5 y 6.2 y mostraban componentes básicos bien enfocados. Estos resultados sugieren o bien una interferencia del proceso eléctrico o quizás una modificación de la carga durante su conservación.

La incubación en diferentes condiciones, no da lugar aparentemente a la extracción de diferentes alergenicos (excepto un componente de 81 kDa en carbonato) pero se necesitan estudios complementarios para comprobar que esto es cierto. Es de destacar que la incubación en tampón ácido favorece la extracción de alergenicos frente a componentes no alergénicos, recogándose en este medio entre 1 hora y 19 horas de incubación, prácticamente solo componentes reactivos. En tampón carbonato en cambio se extrae una mayor proporción de proteínas no reactivas.

El cambio de tampón de glicina a fosfato provoca un incremento de la proteína extraída en la que se incluyen una alta proporción de alergenicos. Este cambio de tampón puede dar lugar bien a una aceleración en la extracción de las proteínas que en ese momento se estaban liberando en el tampón ácido o bien favorecer la extracción de componentes que no se extraen en el medio ácido.

En este estudio los alergenicos del polen nuevo mostraron una tendencia similar a los del polen viejo. Así se modificaban las cinéticas de emisión y las proporciones de componentes pero se observó un alto enriquecimiento en alergenicos sobre todo en los extractos de glicina.

DISCUSION

Si se tiene en cuenta que según lo descrito por Fabricant (1941), el pH de la nariz, en condiciones fisiológicas normales, está entre 5.5 y 6.5 y que el polen tiende a estabilizar el pH del medio en el que se encuentra entre 5.5 y 6 para asegurar su germinación, el microentorno del polen en la mucosa nasal sana puede encontrarse a este pH. Esto puede justificar la alta proporción de alérgenos frente a no alérgenos que se obtiene en las incubaciones ácidas. El cambio de pH producido tras la reacción alérgica, puede ser equivalente al cambio de tampón de incubación, produciéndose nuevas liberaciones y nuevas sensibilizaciones.

Las características ácidas del entorno del polen en la mucosa nasal, también justificaría la detección de un polen germinado sobre ella. Esta observación sugiere por otra parte, que ha de tenerse en cuenta que si un polen es capaz de germinar sobre la mucosa nasal, podría estar liberando sustancias sintetizadas durante este proceso y que éstas fueran responsables, al menos en parte, de los síntomas. Según esto en la preparación de extractos, estos alérgenos podrían no ser nunca extraídos.

La incubación de los pólenes en tampones con características similares a las de los fluidos de los órganos de choque puede permitir conocer mejor los procesos que ocurren cuando un polen alcanza la mucosa de dichos órganos.

Todos los resultados obtenidos en este estudio sobre comportamiento del polen de centeno en los diferentes medios de incubación, confirman que el polen libera al medio sus componentes no por simple difusión o en función de su carga sino como consecuencia de mecanismos más complejos los cuales pueden ser dependientes de una interrelación del polen con el medio en el que se encuentra. Esta característica del polen permite la obtención de

extractos muy diferentes en función de las condiciones de incubación. Así pues cabe concluir que una de las causas de la variabilidad en la calidad de los extractos preparados partiendo de un mismo tipo de polen, puede encontrarse en las diferencias de comportamiento de este en los distintos medios de incubación. De hecho conocer las características botánicas de los pólenes y su comportamiento en un medio acuoso, puede mejorar la preparación de extractos alergénicos.

5.1.4 Cambios de pH inducidos por el polen

Se ha descrito que durante la preparación de los extractos, el polen libera sustancias capaces de modificar el pH del medio de incubación (Marsh, 1981; Yunginger, 1988; Larsen, 1991), por lo que para la preparación de extractos de referencia se recomienda que en las incubaciones realizadas en agua destilada se añada temporalmente NaOH con el fin de ajustar el pH de extracción entre 7 y 7.5. En el presente trabajo se ha valorado el pH de los extractos obtenidos mediante incubaciones en diferentes condiciones de pH, con el fin de conocer cuando se producen los cambios y con que intensidad.

Desde un punto de vista botánico se ha descrito que el polen libera sustancias tamponantes con el fin de estabilizar el medio en el que se encuentra. De esta forma el polen se asegura que el pH del medio es el adecuado para la germinación. El valor de pH que parecen necesitar la mayor parte de los pólenes estudiados es de 6 (Shivanna, 1989). Este valor también parece ser el requerido por el polen del centeno ya que pHs tan extremos como 3 y 10 del tampón glicina y carbonato son modificados a 4.5 y 7.6 respectivamente en los pólenes viejos y a 6 y 7.5 en los nuevos. De estos

DISCUSION

resultados puede por tanto concluirse que el polen nuevo conserva mejor su capacidad de tamponar el medio.

En este estudio se comprobó que los pólenes liberan estas sustancias tamponantes durante el primer minuto de incubación. El pH de las extracciones posteriores a este periodo solo fue modificado en las incubaciones realizadas en tampón glicina. Este diferente comportamiento del polen podría deberse a que las sustancias tamponantes se liberen en su totalidad durante el primer minuto de incubación y que algún componente del tampón glicina induzcan de nuevo su síntesis, o quizás a una modificación de la regulación de la membrana citoplasmática, dependiente de las características del medio.

De los resultados obtenidos se deduce que las condiciones de incubación de los extractos totales solo son comparables con los extractos del primer minuto, pues en los extractos posteriores el pH del medio es diferente. Por otra parte si se tiene en cuenta que el polen libera estas sustancias para "preparar" el medio para la germinación del polen, las sustancias liberadas durante el primer minuto podrían condicionar la liberación de los distintos componentes en las extracciones no interrumpidas.

Los extractos del primer minuto contienen un bajo porcentaje de alérgenos y una alta proporción de proteínas no reactivas y de componentes citoplasmáticos por lo que debe valorarse si la extracción del primer minuto debe ser o no incluida en los extractos alérgenos, ya que su inclusión disminuye la calidad del extracto final. Para ello es necesario asegurarse antes de que todos los alérgenos que se extraen durante este periodo se sigan extrayendo en extracciones posteriores en cantidad suficiente.

5.2 FACTORES QUE AFECTAN SOBRE LA CALIDAD DEL POLEN

Como anteriormente se expuso la calidad del material de partida es un requisito indispensable para la correcta preparación de los extractos alérgicos. Con respecto a los pólenes la IUIS recomienda que la recolección y análisis del material sea realizado por una persona experta en botánica. También se recomienda que los métodos empleados aseguren un alto grado de pureza evitando la presencia de elementos extraños (inferior a un 5%). Una vez recolectado el polen debe de ser desecado y conservados en contenedores herméticamente cerrados y a bajas temperaturas.

5.2.1 Proceso de recolección

En el presente estudio se ha analizado el comportamiento de pólenes de tres suministradores diferentes, durante el proceso de incubación.

En cada uno de ellos se había empleado, para su recolección, un procedimiento diferente de los tres que normalmente se usan (Maasch *et al*, 1987).

En el método seguido por Sigma, la recogida del polen se realiza en el propio lugar del cultivo, mediante una aspiración de la planta cuando ésta se encuentra polinizando. Este método permite recoger altas cantidades de polen pero se presta a grandes contaminaciones debidas a la polinización de otras plantas, próximas a la recolectada, así como a la presencia de una alta proporción de esporas. Microscópicamente este polen era sin embargo homogéneo.

DISCUSION

En el proceso seguido por Allergon, se recoge la parte floral de la planta y se deja desecar. Posteriormente el polen es recolectado mediante un procedimiento mecánico. Se ha descrito que durante este proceso se produce el deterioro de la integridad del grano del polen y además permite que junto con el polen se recojan partes de planta en una proporción elevada. La visualización al microscopio óptico del polen suministrado por esta empresa constató lo descrito.

En el método seguido por Juan Antonio Jiménez, se recogen las plantas poco antes de su polinización y se mantienen formando ramilletes con las raíces en agua hasta que, de forma espontánea, se produce la liberación del polen. Este cae sobre un papel cristal que se encuentra rodeando al ramo, de donde es recogido. Se considera un buen sistema de recolección ya que además de no deteriorar el polen, los contaminantes se encuentran en una baja proporción. Este método también permite controlar el grado de maduración del polen.

Como antes se ha discutido se observan diferentes comportamientos cinéticos entre los tres tipos de pólenes. El comportamiento de los pólenes de Allergon refleja el deterioro de las estructuras del polen observadas al microscopio, así como la presencia de fragmentos de planta. Según esto aunque los extractos obtenidos de otro polen no deteriorado y el de Allergon tuvieran la misma cantidad de alérgenos, este último incluirá mayor número de componentes no proteicos, lo cual es una pérdida de calidad. Según estos resultados en los requerimientos sobre el material de partida debe de considerarse que el proceso de recolección no deteriore las paredes y membranas de los pólenes.

5.2.2 Proceso de desecado y conservación del polen

Con respecto al proceso de desecado, normalmente se emplea una corriente de aire a 30-40 C durante 24 horas con la posibilidad de añadir al sistema un proceso de vacío. Una vez desecado el polen se almacena en contenedores herméticamente cerrados y se a bajas temperaturas (Wodehouse, 1965; Durham, 1951). A lo largo de su experiencia como productor de pólenes, Juan Antonio Jiménez refiere que el grado de desecación obtenido con sus pólenes no le resultaba satisfactorio y había modificado las condiciones del protocolo, obteniendo una desecación más ventajosa. Este método fue aplicado al polen recogido en el año 1991.

En el estudio sobre conservación del polen del centeno, se emplearon cuatro tipos de polen. Dos de ellos fueron recolectados por Juan Antonio Jiménez en los años 1987 (un lote conservado en nevera y el otro congelado), otro en 1989 y el cuarto fue recogido por el mismo recolector en el año 1991. El estudio realizado entre los extractos obtenidos a partir de ellos, mostró que entre los pólenes conservados, no existían diferencias cuantitativas tanto en los extractos parciales como en los totales. Tampoco existen diferencias en las características electroforéticas de los componentes extraídos a partir de los diferentes pólenes. Solo se aprecia una ligera modificación en la cinética de emisión de proteínas en los extractos del polen del año 1989, coincidente con una extracción de alergenios más rápida. Las diferencias entre los extractos de pólenes conservados y los preparados a partir del polen recién recolectado fueron sin embargo muy grandes a nivel de alergenidad así como en el patrón electroforético y cinética de emisión.

DISCUSION

Todos estos datos reflejan, que la diferencia en las condiciones de conservación que había entre los dos pólenes de 1987 no afecta a la calidad de los extractos preparados. Por otra parte el resultado intermedio obtenido para el polen del 1989, podía representar una fase intermedia de deterioro entre el polen nuevo y el conservado. Sin embargo los resultados obtenidos con el polen del año 1991, después de su conservación durante un año en la nevera con desecante, ponen de relieve que el polen no modifica ni la cinética de emisión de sus componentes ni las características electroforéticas de sus proteínas durante la conservación. Si se tiene en cuenta que el polen del año 1991 se había conservado de la misma forma que los demás, las diferencias observadas en el estado del polen pueden debe a la diferencia en el procedimiento seguido para su desecación. Esta hipótesis sugiere que un mal proceso de desecación del polen puede alterar la conservación de sus componentes o modificar sus cinéticas de emisión de forma que disminuye la calidad de los extractos finales. La modificación se produce posiblemente durante el proceso de desecado, manteniéndose después el polen invariable durante largos periodos. Esta hipótesis justificaría algunos de los resultados discrepantes, descritos en cuanto a estabilidad del polen durante su conservación. Así en los estudios realizados sobre conservación del polen, analizando los extractos obtenidos a partir de pólenes de un mismo recolector, no muestran grandes diferencia en sus características debidas al paso del tiempo (Maasch *et al*, 1986; Maasch *et al*, 1987; Mansfield *et al*, 1987). En estos trabajos se afirma por lo tanto que la conservación no modifica la alergenicidad del polen. En estos casos el polen sigue siempre el mismo proceso de conservación por lo que la estabilidad del polen durante largos periodos refleja que el polen una vez desecado se conserva durante

largos periodos. Este resultado no confirma sin embargo la buena calidad del polen, ya que no se estudia como se comportaba el polen al momento de ser recolectado. Cuando en los estudio se comparan extractos de varios recolectores. el resultado puede mantenerse o pueden aparecer variaciones (Anderson, 1985; Hemmens, 1988; Malik *et al*, 1991) dando lugar a conclusiones erróneas sobre el tiempo de almacenamiento. Todo esto sugiere que en los estudios sobre conservación se debe incluir como control un estudio del comportamiento del polen al momento de su recolección incluso antes de ser desecado, ya que éstas son las condiciones más próximas a las del polen que llega al órgano de choque.

En los extractos recogidos de los pólenes de Allergon y de Sigma se observa que las imágenes electroforéticas de sus proteínas no son muy diferentes a las de los pólenes conservados del estudio anterior. Por lo que podemos decir que el método seguido para su desecación tuvo un efecto similar en el polen que el primer método empleado por Juan Antonio Jiménez. Por otra parte esta igualdad de componentes entre pólenes recolectados en diferentes países y con diferentes métodos, sugiere que las diferencias observadas entre pólenes de distintos recolectores no se deben a diferencias botánicas de los pólenes, sino al proceso que se ha seguido desde su recolección hasta su uso.

Por otra parte, debería tenerse en cuenta que las características botánicas del polen de dos especies distintas pueden diferir enormemente (Shivanna, 1989). Estas diferencias afectan de forma especial a la actividad biológica del polen al momento de su recolección. Así los pólenes bicelulares, que necesitan largos periodos de actividad metabólica para que se produzca la fecundación, son pólenes que mantienen su viabilidad en la atmósfera

DISCUSION

durante mucho tiempo por lo que su conservación no requiere grandes condiciones, y pueden mantenerse viables algunos de ellos incluso años. Esta estabilidad es la normal en los pólenes de gimnospermas. Sin embargo aquellos pólenes que al momento de su liberación se encuentran más avanzados en el proceso de la fertilización (pólenes tricolulares), el periodo de viabilidad, de forma natural es bajo. Son especialmente difíciles de conservar los pólenes de las gramíneas, debido alto porcentaje de agua que contienen después de su desecación natural. Este hecho da lugar a que el periodo de viabilidad del polen de una gramínea sea tan solo de unas pocas horas. Aunque se ha descrito que un polen no viable mantiene su alergenicidad (Milner *et al*, 1972), es evidente que dependiendo de la actividad metabólica que haya mantenido el polen desde su formación hasta el momento en que sus alergenos son extraídos, la calidad de los extractos preparados puede ser diferente. Si el mantenimiento del metabolismo es función directa del porcentaje de agua que contiene el polen, es por lo tanto necesario ajustar las desecaciones de los pólenes para cada especie, de forma que se asegure la presencia y proporción de sus componentes al momento de y durante la preparación del extracto.

5.3 VALORACION DE PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS DE POLENES

El conocimiento de la cantidad de proteína que contiene un extracto alergénico, es un dato de considerable interés tanto en la preparación de extractos hiposensibilizantes y de diagnóstico como en los estudios de caracterización de alergenos. Se ha descrito sin embargo que debido a la alta proporción de sustancias interferentes que liberan los pólenes, los diferentes métodos de valoración aplicados a un mismo extracto, pueden dar lugar a

resultados muy dispares. El valor obtenido por un método de valoración puede llegar a ser hasta 10 veces superior al estimado por otro. Esto es debido a que dichas sustancias pueden interferir con los métodos de valoración con distintas intensidades y en sentidos opuestos. En un estudio comparativo de diferentes métodos de valoración de proteínas, Hogue *et al* (1989) sugieren que el método que mejor valora el contenido de proteínas de este tipo de muestras es el método de Lowry, con diferencia incluso con el Lowry modificado. Otros autores (Baer, 1988) sin embargo también describen interferencias con este método, no existiendo por el momento un método idóneo para esta valoración. En nuestras primeras experiencias con extractos de pólenes, comprobamos que el contenido proteico calculado a partir de los datos de Lowry, era acorde con las cantidades requeridas para que se visualizaran las proteínas en los geles de poliacrilamida, mientras que si se estimaba por otros métodos encontrábamos que, o la proteína resultaba insuficiente, o era excesiva. Estos resultados estaban de acuerdo con lo expuesto por Hogue *et al* (1989), por lo que se decidió utilizar aquí el método de Lowry como el más adecuado para la valoración del contenido proteico en el estudio aún conscientes de alguna limitación.

A lo largo del trabajo se observó que en el extracto del primer minuto, el método de Lowry podía sobrestimar el contenido proteico ya que para visualizar las bandas en la misma proporción que en los demás extractos, se requería un mayor volumen de muestra que el calculado por el método de Lowry. Durante el estudio comparativo de los extractos obtenidos de pólenes recogidos en diferentes años, observamos que en el polen recién recolectado, el método parecía infravalorar en cambio, el contenido del extracto del primer minuto. Kalb y Bernlohr (1977), han diseñado un sistema

DISCUSION

espectrofotométrico de valoración de proteínas basado en una relación matemática entre la absorbencia de la muestra a 260nm y a 230nm. Según lo descrito por los autores el método permite corregir las interferencias que los ácidos nucleicos producen en el método mediante relación densitométrica 280/260 (Warbung y Christian, 1942), así como las interferencias de los hidratos de carbono con el método de Lowry. El diseño de este método de valoración, se lleva a cabo con objeto de facilitar la valoración de proteína en medios de incubación celular, lo cual puede hacerlo idóneo para valorar la proteína de los extractos de polen. Este método, no empleado en otros estudios, fue comparado con el método de Lowry, de Warbung *et al* y con el método de Bradford (1976). Los resultados pusieron de manifiesto que el método de Lowry y de Kalb son absolutamente coincidentes a excepción de los valores de los extractos de un minuto de incubación y del último extracto del polen nuevo. La homogeneidad encontrada con el segundo método, entre los extractos de un minuto de los distintos pólenes, puede suponer una mejor valoración que método de Lowry. Estos resultados sugieren que la interferencia que pueda obtenerse con el método de Lowry se produce principalmente con componentes liberados durante el primer minuto de la incubación, de origen citoplasmático en su gran mayoría, mientras que en otros métodos interfieren con sustancias liberadas durante todo el proceso. La interferencia de los componentes citoplasmáticos con la valoración de proteínas por el método de Lowry es muy patente en el estudio comparativo de liberación de proteínas con pólenes de diferentes suministradores. Así en el polen de allergon, que contenía una alta proporción de pólenes rotos y fragmentos de plantas, el método de Lowry reflejaba una cantidad de proteína muy alta en el extracto de un minuto, con respecto a los de otros pólenes

mientras que los valores posteriores, aunque diferentes, se hacían más próximos. Los volúmenes requeridos para la visualización de las proteínas del primer extracto no fueron acordes con lo calculado a partir del Lowry.

Teniendo en cuenta que la contribución de los componentes extraídos en el primer minuto (principalmente citoplasmáticos) representan un alto porcentaje del extracto total, y que éste es variable dependiendo del estado de conservación del polen, la utilidad del método de Lowry para valorar los extractos totales es también dependiente del estado de conservación del polen. Esta observación justifica la discrepancia de los diferentes autores sobre la aplicabilidad del método en la valoración de proteínas en los extractos alérgicos procedentes de pólenes.

5.4 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS ALERGENOS DEL POLEN DEL CENTENO

Matthiesen *et al* (1990), han realizado una extensa revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre alérgenos de pólenes de las gramíneas. En su estudio han recopilado los datos de las características fisicoquímicas e inmunoquímicas de los alérgenos que se han aislado. Atendiendo a la normativa sobre nomenclatura de los alérgenos, los hasta ahora purificados pueden ser agrupados en seis grupos mayoritarios según el esquema de la tabla 5.I. Los alérgenos más dominantes son aquellos que se incluyen en los grupos I y V.

Las características fisicoquímicas de los alérgenos de nuestro estudio reflejan que en el polen de centeno hay alérgenos que pertenecerían a varios de los grupos descritos, pero la banda de 48 kDa, que se desdobla en tres componentes alérgicos de PI 5.7, 6.1 y 6.5 no ha sido descrita en ninguna

DISCUSION

GRUPO	PM SDS_PAGE	pI	PREDOMINIO
I	31-36	6	80%
II	11	5	25%
III	11	9	25%
IV	50-65	9-10	50%
V	26-31	5-6	80%
VI	11	5	75%

TABLA 5.I

gramínea y su detección puede dar lugar a la aparición de un grupo VII en esta clasificación. El hecho de no haberse identificado como alergénica en otros pólenes de gramíneas, puede ser debido a que sea un alérgeno exclusivo de polen del centeno, lo que estaría de acuerdo con Benjamins y Vermeulen (1931), o bien que su extracción en los medios de incubación empleados sea escasa y no se haya podido identificar.

No se han detectado alérgenos de bajo PM en este polen, por lo que no parece contener alérgenos de los grupos II, III y VI.

Los componentes alérgicos la banda de 58 y la de 67 podrían pertenecer a el grupo IV. La banda de 67 se eluye en el primer pico básico de las cromatografías de intercambio aniónico de los extractos preparados del polen de 1987. Este hecho permite afirmar que es un componente básico y sería equivalente al descrito por Howlett y Clarke (1981) en el polen de *lolium perenne*. Este componente no se detecta en el polen nuevo mientras que en su lugar podría incluirse al componente de 58 kDa, pero ha de determinarse aún su punto isoeléctrico. Se han descrito asociaciones entre componentes de

los pólenes de las gramínea (*Dactylis glomerata*), mediante estudios cromatográficos (Brodard *et al*, 1991). Estas asociaciones pueden dar lugar a bandas que indicarían la existencia de sustancias que no existen. Así la unión de dos componentes de peso molecular cercano a 30 kDa, darían lugar a la aparición de los componentes reactivos de 67 y 58 kDa. En nuestra experiencia la banda de 67 kDa se detecta en el los perfiles electroforéticos de las fracciones de exclusión molecular correspondiente a su masa molar pero se sigue recogiendo en fracciones posteriores junto con los componentes de alrededor de 30 kDa (datos no expuestos en los resultados). Si la asociación se produce entre el componente de 58 y el citocromo C (12 kDa), la unión también da lugar a un componente básico de pM cercano a 67 kDa. La variabilidad observada en la extracción de estos componentes, podría también deberse a la posibilidad o no de estas asociaciones, dependiendo de las características de la extracción así como de la conservación del polen.

En cuanto a los alérgenos básicos de pesos moleculares cercanos a 30 kDa, sus características moleculares no permiten incluirlos como alérgenos de ningún grupo, sin embargo se ha descrito como alérgeno del polen de *Poa* (Kisil, 1990), una proteína de peso molecular 33 kDa y un PI 9,1, que es muy alérgénica y se describe como uno de los alérgenos más importantes de este polen. Los autores la incluyen como componente del grupo Ib. La reactividad de las dos bandas básicas en el inmunoblot del isoelectroenfoco de las fracciones de componentes de 30 kDa, recogidas mediante exclusión molecular, muestra que al menos dos de los componentes más básicos de este polen son alérgenos y con puntos isoelectrónicos de 9.3 y 9.1 por lo que serían clasificados dentro del grupo Ib.

DISCUSION

Las características de los demás alérgenos identificados, están de acuerdo con las de otras gramíneas de los grupos I y V (Ford y Baldo, 1896; Matthiesen y Lowenstein, 1991; Klysner, 1992). Estos alérgenos se han descrito como muy importantes dentro de los pólenes de las gramíneas.

A pesar de que dentro del campo de la alergia la purificación de alérgenos es objetivo prioritario, no se han purificado más que una pequeña proporción de ellos. Las técnicas empleadas son generalmente complejas, y muchas de ellas requieren la realización consecutiva de varios procesos diferentes, dando lugar a un bajo rendimiento.

El conocimiento de las características de emisión de proteínas y alérgenos nos ha permitido obtener un extracto altamente enriquecido en alérgenos. Este extracto ha permitido purificar mediante un único paso cromatográfico los componentes de la banda de 48 kDa, así como estudiar su potencia alérgica. La semejanza características fisicoquímicas de sus tres componentes requiere un proceso más complejo para poder separar cada uno de ellos independientemente y estudiar si son o no isoalérgenos, o son moléculas completamente diferentes.

La cromatografía de intercambio catiónico del mismo extracto ha permitido purificar en un solo paso cromatográfico tres alérgenos, dos del grupo V y otro de 48 kDa no incluíble en ningún grupo.

Todo esto resultados confirman la necesidad de conocer mejor las características biológicas de los pólenes para obtener extractos de alta calidad y para conocer mejor las características fisicoquímicas de los componentes reactivos.

CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Conclusiones sobre preparación de extractos:

- 1) La liberación de los componentes del polen de centeno no se produce por simple difusión, sino que obedece a mecanismos más complejos, dando lugar a que existan diferencias en la velocidad y en la tasa de emisión de los distintos componentes. La emisión de componentes parecen guardar relación con los procesos botánicos que ocurren en el polen cuando éste entra en contacto con un medio húmedo.
- 2) Diversos factores tales como el pH del medio, composición del tampón de extracción, estado de conservación del polen, pueden modificar las características cinéticas de la emisión de dichos componentes. Las diferencias en composición observadas entre extractos obtenidos de una misma especie de polen por diferentes metodologías, podrían justificarse por este hecho.
- 3) La calidad de los pólenes como material de partida en la preparación de extractos alergénicos, es dependiente de la metodología de recolección, desecación y conservación las cuales deben de ser diseñadas teniendo en cuenta la actividad metabólica que posee cada polen al momento de su recogida.

CONCLUSIONES

- 4) El conocimiento de las características de la emisión de proteínas y alérgenos permite obtener extractos enriquecidos en diferentes alérgenos, los cuales constituyen un material de partida idóneo para la caracterización y purificación de las sustancias alérgicas.
- 5) El polen de centeno contiene un componente interferente con los procesos de isoelectroenfoque, que se extrae principalmente en tampón fosfato y carbonato y que debe de ser tenido en cuenta en el análisis de los extractos mediante esta técnica.
- 6) Algunas de las recomendaciones de la IUIS no pueden ser aplicadas en la preparación de extractos con estos pólenes.
- 7) La eliminación de las sustancias extraídas del polen durante el primer minuto de incubación podría suponer una importante mejora en la calidad de los extractos preparados mediante incubación del polen.
- 8) El conocimiento botánico de los procesos que ocurren en el polen durante las incubaciones que se realizan para la preparación de extractos alérgicos, permite optimizar el diseño de obtención de dichos extractos.

Conclusiones sobre los alérgenos del polen de centeno

- 1) El conocimiento de las características biológicas del polen de centeno permite obtener extractos fraccionados que facilitan el estudio de identificación y caracterización de sus alérgenos.
- 2) El polen de centeno contiene una elevada proporción de alérgenos básicos muy reactivos, lo cual discrepa con las consideraciones

CONCLUSIONES

generales sobre alergenios de las gramíneas en las que se describen como mayoritarios los componentes ácidos.

- 3) El componente de 48 kDa podría ser un alergenio específico del polen en estudio.
- 4) Los resultados del este estudio realizado en el polen del centeno, sugieren que este polen no contiene alergenios de los grupos II, III y VI.
- 5) Las características de una parte de sus alergenios son coincidentes con las descritas para otras gramíneas de los grupos I, Ib, IV y V.
- Debe de ser reconsiderada la no inclusión de este polen entre los seleccionados para la preparación de extractos alérgicos, ya que puede presentar diferencias claras con los pólenes de otras gramíneas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Adelman D.C. (1991). *Ann Allergy* 67:199.
- 2 Albadalejo, C., Giner, A., Morguá, M., Nistal, M., y Rubio, M.L. (1989). **Nueva Enciclopedia Temática. Ciencias de la vida I.** Edit. por Planeta. España
- 3 Anderson, M.C. (1985) *Proc IV Int Paul Ehrlich Seminar on the control and standarization of allergenic Extract.* 17.
- 4 Anderson, M.C. y Baer, H. (1987). *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:25.
- 5 Anderson (1987). *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:1.
- 6 Ansari, A.A.; Freidhoff, L.R. y Marsh, D.G. (1989 a). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88:164.
- 7 Ansari, A.A., Freidhoff, L.R., Meyers, D.A., Bias, W.B. y Marsh, D.G. (1989 b). *Human Immunol* 25:59.
- 8 Aukrust, L. (1987). *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:7.
- 9 Aukrust, L. (1981). **Diagnosis and Treatment of IgE-mediated Diseases.** Edit por Johanson, S.G.O. Excerpta Medica. Amsterdam.

BIBLIOGRAFIA

- 10 Baer, H., Anderson, M.C., Helm, R.M., Yunginger, J.W., Lowenstein, H. et al (1986). *J Allergy Clin Immunol* 78:4:624.
- 11 Baer, H.(1988). *Arb Paul Ehrlich Inst* 82:9.
- 12 Baer, H., Anderson, M.C., Turkeltaub, P.C. (1988). **Allergy Principles and Practice**. Edit. por: Middleton, E. Jr., Reed, C.E., Ellis, E.F., Adkinson, N.F. Jr. y Yunginger, J.W. The C.V. Mosby Company . Toronto (Canada).
- 13 Baer, H., Godfrey, H., Maloney, C.J., Normam, P.S. y Lichtenstein, L.M. (1970). *J Allergy* 45:347.
- 14 Baldo, B.A. y Donovan, G.R. (1988). *Allergy* 43:81.
- 15 Ballow, M. (1991). *Ann Allergy* 67:232.
- 16 Bar-Shalom, D y Mattson O. (1977). *Bot Tidsskrift* 71:245.
- 17 Ben-Sasson, S.Z., Le Gros, G., Conrad, D.H., Finkelman, F.D. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:1421.
- 18 Benjamins, C.G. y Vermeulen, B.S. (1931). *Acta Otolaryngol* 15:121.
- 19 Bennich, H. y Von Bahr-Lindstron, H. (1974). **Structure of Immunoglobulin E (IgE)**. En Progress of Immunology, II. Vol I, Edit. por Brent, L. y Holborrow, I. Noth-Holland, Amsterdam.

- 20 Bensadoun, O. y Weinstein D. (1976). *Anal Biochem* 70:241.
- 21 Bergstedt-Lindquist, S., Moon, H.B., Persson, U, Moeller G., Heusser, C.H. y Severison E.(1988). *Eur J Immunol* 18:1073.
- 22 Blackley, CH. (1873). **Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay asthma)**. Edit.por Baillere, Tindall & Cox. Londres.
- 23 Blum, H., Beier, H y Geoss, H.J. (1987). *Electrophoresis* 8:93.
- 24 Bousquet, J., Cour, P., Guerin, B. y Michel, F.B. (1984). *Clin Allergy* 14:249.
- 25 Bradford M.M. (1976). *Anal Biochem* 72:248.
- 26 Brede, H.D. y Goeing,H. (1980). **Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts**. Fischer. Stuttgart (Alemania).
- 27 Brewbaker, J.L. y Kwack, B.H. (1963). *Am J Bot* 50:859.
- 28 Brooks, J y Shaw, G. (1968). *Nature* 219:522.
- 29 Brown, M.A., Pierce, J.H., Watson, C.J.,Falco J., Ihle, J.N. y Paul, W.E. (1987) *Cell* 50: 809.

BIBLIOGRAFIA

- 30 Bucholtz, G.A., Lockley, R.F. y Serbousek, D. (1985). *Ann Allergy* 55:805.
- 31 Claman, H.N., Chaperon, E.A. y Triplett, R.F. (1966). *Pro Soc Exp Biol Med* 122:1167.
- 32 Coffman, R.L., Seymour, B.W.P., Lebman D.A. Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Salvelkoul, H.F.J., Finkelman, F.D., Bond, M.W. y Mosmann T.R. (1988). *Immunol Rev* 102:5.
- 33 Cresswell, P. (1985). *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:8188.
- 34 Cresti, M., Pacini, E., Ciampolini F. y Sarfatti, G. (1977). *Planta* 136:239.
- 35 Creticos, P.S. y Norman, P.S. (1986). *Clin Rev Allergy* 4:355
- 36 D'Amato, G., Lobiatti, A., Mandrioli, P., Moro, A., Spediacci, C. y Tursi, A. (1988). *Allergy* 43:769.
- 37 Davies, A.J.S., Leuchars, E., Wallis, V. y Elliott, E. (1967). *Transplantation* 5:222.
- 38 Davies, R.R y Smith, L.P. (1973). *Clin Allergy* 3:263.

- 39 Del Petre, G. Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., de Vries, J. y Romagnani, S. (1988). *J Immunol* 140:4193.
- 40 Delespesse, G., Wagner, K., Luo, H., Brinkmann, V., Kilchherr, E. y Heusser, C. (1989 a). *7th international congress of immunology .Berlin. Abstract W-75-7.*
- 41 Delespesse, G. Hofstetter, H. y Sarfati, M. *Int Arch Allergy* (1989 b). *Appl Immunol* 90:41.
- 42 Delespesse, G. Sarfati, M. y Hofstetter, H. (1989 c). *Immunol Today* 10:159.
- 43 Delespesse, G., Suter, U., Mossalyi, D., Bettler, B., Sarfati, M., Hofstetter, H., Kilchherr, E., Debre, P. y Dalloul, A. (1990). *Advan. in immunol.* 49:149.
- 44 Durham, O.C. (1951) *Econ Bot* 5:211.
- 45 Esser, C. y Radbruch, A. (1990). *Ann Rev Immunol* 8:717.
- 46 Fabricant N.D. (1941) *Arch Otolaryngol* 34:297
- 47 Faegri, K e Iversen, J. (1989). En **Textbook of pollen analysis**. Edit. por Faegri, K., Kaland, P.E. y Krzywinski, K. John Wile & Sons. Nueva York.

BIBLIOGRAFIA

- 48 Faegri, K e Iversen, J. (1964). En **Textbook of pollen analysis**. Edit por Faegri. Blackwell Scientific, Oxford,Londres.
- 49 Falagiani, P y Morlacchi, C. (1980). **Respiratory Allergy**. Edit por Melillo, G. D'Amato, G., Cocco, G. y Ceccucci, M. Masson. Milán (Italia).
- 50 Falgiani, P. (1990). En **Pollinosis**. Edit. porFalgiani, P. CRC Press, Inc. Boca Ratón. Florida.
- 51 Finkelman, F.D. y Holmes J. (1990). *Annual Rev Immunol*. 8:303.
- 52 Finkelman, F.D., Katona, I.M., Irban, J.F., Holmes, J., Ohara, J., Tung,A.S., Sample, J. y Paul, W.E. (1988). *J Immunol* 141:2335.
- 53 Freeman, J. (1911). *Lancet* ii, 814.
- 54 Fritzsche, C.J.(1837). Über den Pollen. *Petersburg* 3:649.
- 55 Geha, R.S., Helm, R. y Gould, H. (1985). *Nature (London)* 315:577.
- 56 Gell, P.G.H. y Coombs, R.R.A. (1968). **Clinical Aspects of immunology**. 2ª edic. Blacwell. Oxford.
- 57 Gjeing, B. Jäger, Marsh, D.G. y Lowenstein, H. (1985). *J Allergy Cli Immunol* 75;2:258.

- 58 Gleich, G.J.(1991). *Ann allergy* 67:237.
- 59 Gordon, J.R. Burd P.R. y Galli, S.J. (1990). *Immunol Today* 11:458.
- 60 Grote, M. (1991). *The Journal of Histochem and Cytochem* 39 10: 1395.
- 61 Hawkes, R. (1986). *Methods in Enzimology* vol 121:485.
- 62 Helm, B. Marsh, P., Vercelli, D., Padlan, E., Gould, H. y Geha, R.H. (1988). *Nature (London)* 331:180.
- 63 Hemmens, V.J., Baldo, B.A. Bass D. (1988). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:27.
- 64 Heslop-Harrison, J. (1979). *Ann Bot* 44(suppl):1.
- 65 Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Mattsson, O. (1975). **Pollen-wall proteins:emission and role in incompatibility responses**. En **Biology of the Male Gamete**. Edit por Duckett, J.G. y Racey, P.A. Academic Press. Londres.
- 66 Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Knox, R.B. y Howlett, B. (1973). *Ann Bot* 37:403.
- 67 Heslop-Harrison, J. (1982). *Science* 215:1358.

BIBLIOGRAFIA

- 68 Heusser, C.H., Wagner, k., Brinkmann, V. Severison, E. y Blaser, K. (1989). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 90:45.
- 69 Heusser, C.H., Brinkmann, V., Delespesse, G., Kilchherr, E., Blaser, K. y Le Gros, G. (1991) *Allergy and Clin Immunol News* 2:47.
- 70 Hirashima, M. Yodoi, J e Ishizaka, K (1980). *J.Immunol.* 125:1442.
- 71 Ho P.C. y Orange, R.P. (1978). *Fed Proc* 37:1667.
- 72 Hogne, V., Holen E y Elsayed S. (1989). *Annals of Allergy* 62:87.
- 73 Howlett, B.J. Vithanage, H.I.M.V. y Knox, R.B. (1979). *Curr Adv plant Sci* 35:1.
- 74 Hubscher T. y Eisen, A.H. (1972).*Int Archs Allergy appl Immun* 42:466.
- 75 Ishizaka, K. (1985). *J.Immunol.* 135:1.
- 76 Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Hornbrook, M.M. (1967). *J.Immunol.* 98:490.
- 77 Ishizaka, T. e Ishizaka K. (1984). *Prog Allergy* 34:188.
- 78 Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Lee, E.H. (1970). *Immunochemistry* 7:687.
- 79 Ishizaka, T., Helm, B., Hakimi, J., Niebyl, J., Ishizaka, K y Gould, H. (1986).*Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 83:8323.

- 80 Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Hornbrook, M.M. (1966 a). *J.Immunol.* 97: 75.
- 81 Ishizaka, T., Chang, T.M., Taggart, M. e Ishizaka, K. (1977). *J Immunol* 119:1589.
- 82 Ishizaka, T., Hirata, F., Ishizaka, K. y Axelrod, J. (1980). *Proc Nat Acad Sci USA* 77: 1903.
- 83 Ishizaka, T., Hirata, F., Sterk, A.R. Ishizaka, K. y Axelrod, J. (1981). *Proc Nat Acad Sci USA* 78:6812.
- 84 Ishizaka, T., Foreman, J.C., Sterk, A.R. e Ishizaka, K. (1979). *Proc Nat Acad Sci USA* 76:5858.
- 85 Ishizaka, K. (1989). *Adv in Immunol* 47:1.
- 86 Ishizaka, T (1982). *Fed Proc* 14:17.
- 87 Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Hornbrook, M.M. (1966 b). *J.Immunol.* 97:840.
- 88 Ishizaka, K., Yodoi, J., Suemura, M. y Hirashima, M. (1983). *Immunol Today*, 4:192.
- 89 Jabara, H.H., ManFu,S. Geha, R.S. y Vercelli, D. (1990). *J Exp Med* 172:1861.

BIBLIOGRAFIA

- 90 Jhonsson P. y Marsh, D.G. (1965) *Nature* 206:935.
- 91 Johansson, S.G.O. y Bennich, H. (1967). *Immunology* 13:381.
- 92 Kalb, V.F. Jr y Bernlohr, R.W. (1977). *Anal Biochem* 82:362.
- 93 Kennerly , D.A., Sullivan, T.J. y Parker, C.W. (1979) *J Immunol* 122:152.
- 94 Killar L., Mac Donald, G., West, J., Woods, A. y Bottomly, K. (1987). *J Immunol* 135:1674.
- 95 King, T.P. (1976). *Adv Immunol* 23:77.
- 96 Kisil, F.T., Jaggi, K.S., Lin, Z-W. y Ekramoddoullah, A.K.M. (1990) **Epitopes of atopic Allergens**. Edit por The UCB Institute of Allergy. Bélgica.
- 97 Klysner, S., Welinder, K.G., Lowenstein, H., Mattiesen, F. (1992) *Clin and Exp Allergy* 22:491
- 98 Knox, R.B. (1971). *J Cell Sci* 9:209.
- 99 Knox, R.B. y Heslop-Harrison (1969). *Nature* 233:92.
- 100 Knox, R.B. y Heslop-Harrison, J. (1970) *J Cell Sci.* 6:1.
- 101 Knox, R.B., Heslop-Harrison, J. (1971). *Citobios* 4:49.

- 102 Knox, R.B. (1971). *J Cell Sci* 9:209.
- 103 Knox, R.B. (1980). *Histochem Journal* 12:247.
- 104 Knox, R.B., Heslop-Harrison, J. y Reed (1970). *Nature* 225:1066.
- 105 Laemmli, U.K. (1970). *Nature* 277:680.
- 106 Larsen L.V., copeland, T.A. Weber, R.W. y Vaugh, T.R. (1991) *J Allergy Clin Immunol*. Abstract 192.
- 107 Larson, D.A. (1965). *Am J Bot* 52:139.
- 108 Levine, B.B. (1973). *Clin Allergy* 3(suplemento):539.
- 109 Lichenstein, L.M. y Margolis, S.(1968). *Science* 161:902.
- 110 Linskens, H.F., Jorde, W. y van der Werken P. (1977) *Allergol Immunopathol* 5:332.
- 111 Lowenstein, H. (1983). **Proceeding XII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology**. O.J.C. Medical Press. Florencia.
- 112 Lowenstein, H. (1978). *Inter Arch Allergy appl Immun* 57:349.

BIBLIOGRAFIA

- 113 Lowesntein, H., Wihl, J.-A. Bache Billesbolle K. y Bowadt, H.(1984). *Allergy* 39:421
- 114 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.I. and Randall, R.J.(1951). *J Biol Chem* 193:265.
- 115 Maasch, H.J., Geissler, W. y Wahl, R. (1986). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81:85.
- 116 Maasch, H.J., Hauck, P.R., Oliver, J.D., Geissler, W., Wahl, R. y Winter, H.G. (1987). *Ann of Allergy* 58:429.
- 117 Mac Donald, S.M. (1991). *Ann Allergy* 67:218.
- 118 Malik, P., Singh A.B., Gangal, S.V. y Babu, C.R. (1991). *Allergy* 46:284.
- 119 Malling, H.-J.(ed) (1988). *Allergy* 43(supl 6):7.
- 120 Mansfield, L.E. Tan, M. Martinez G (1989). *J Allergy Clin Immunol* 84:529.
- 121 Marsh, D.G., Belin, L., Bruce, A., Liechtenstein, L.M. y Hussain R.(1981). *J Allergy Clin Immunol* 67:3:208.
- 122 Marsh, D.G., Freidhoff, L.R., Golden D.B.K. (1987). *Fed Proc* 46:1047.

- 123 Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H. y Platts-Mills T.A.E. (1987). *J Allergy Clin Immunol.* 80:639.
- 124 Marsh, D.G., Hsu, S.,H., Roebber, M., Ehrlich-Kautzky, E., Freidhoff, L.R., Meyers, D.A., Pollard,M.K. y Bias,W.B. (1982). *J Exp Med* 155:1439.
- 125 Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M., y Norman, P.S. (1972). *Immunology* 22:1013.
- 126 Marsh, D.G. (1975). **Allergens and the genetics of allergy.** Edit. por Sela M. The antigens, vol III. Academic Press. Nueva York.
- 127 Marsh, D.G. (1975).**The antigens** 3:271. Edit. por Sela, M. Academic Press. Nueva York.
- 128 Marsh, D.G. (1987) *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:47.
- 129 Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H. y Platts-Mills T.A.E. (1986). *Bull WHO* 64:767.
- 130 Matthiesen, F., Klysner, S., Lowenstein H. (1990) **Epitopes of atopic Allergens.** Edit por The UCB Institute of Allergy. Bélgica.
- 131 Melzger, H. y Kinet, J.P. (1989). *FASEB J* 2:3.
- 132 Melzger, H. (1988). *Adv in Immunol* 43:277.

BIBLIOGRAFIA

- 133 Mitchison, N.A. (1977) *Eur J Immunol* 1:18.
- 134 Mliner, F.H., Dyas, B y Fraser, C.A. (1972) 2:79.
- 135 Monaco, J.J. (1992). *Immunol Today* 13;5:873.
- 136 Mosmann, R.T.,y Coffman, R.L. (1989). *Ann Rev Immunol* 7:145.
- 137 Noon, L. (1911). *Lancet* i, 1572.
- 138 Norman P.S. (1986). *J Allergy Clin Immunol* 77:405.
- 139 O'Neil, P.M., Singh, M.B. y Knox R.B. (1990). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91:266.
- 140 Ohman, J.L. (1987) *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:25.
- 141 Panzani, R.M., Yasueda, H., Shimizu, T. y Shida, T. (1986). *Ann Allergy* 57:26.
- 142 Parronchi, P., Tiri, A., Macchia, D., Biswas, S., Simonelli, C., Maggi, E, Del petre, G.,Ricci M. y Romagnani, S. (1990). *J Immunol* 144:2102.
- 143 Pene, J., Rousset,F., Briere,F., et al. (1988). *J Immunol* 141:1218.

- 144 Pene, J, Rousset, F., Briere, F., Chretien, I. Bonnefoy, J.Y., Spits, H., Yokota, Arai, N., Arai, K., Banchereau, J. y de Vries, J. (1988). *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6880.
- 145 Phillips, P.V. (1987) *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:59.
- 146 Platts-Mills, T.A.E. y Chapman, M.D. (1991). *J Allergy Clin Immunol.* 87:621.
- 147 Potonié, R. (1934). *Arb Ins Paläobot Petrogr Brennsteine* 4:5.
- 148 Prausnitz y Küstner (1921). *Zentralbl. Bakteriol.(orig. A)* 86: 160.
- 149 Reed, C.E, y Yunginger, J.W. (1989). *J Allergy Clin Immunol* 84:4.
- 150 Renck, B. y Einarsson, R. (1987). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 83:96.
- 151 Ricci, M. y Rossi, O. (1990). *Clin and Exp Allergy* 20:601.
- 152 Romagnani, S. y Ricci, S., (1990). *Allergy and Clin Immunol News* 2:192.
- 153 Romagnani, S. (1990). *Immunol Today* 11:316.
- 154 Romagnani, S., Maggi, E., Del Petre, G., Parronchi, P., Macchia, D., De Carli, M., Piccini, M-P, Biswas, p., Simonelli C., y Ricci, M. (1991 a). **Cytokines:basic principles and clinical applications**. Edit. por Romagnani, S., Abbas, AK. Raven Press. Nueva York.

BIBLIOGRAFIA

- 155 Romagnani, S. (1991 b). **Conversations in Allergy II**. Edit. por The UCB Institute of Allergy. Bélgica.
- 156 Rosen, WG (1971). **Polen:development and physiology**. Edit. por Heslop-Harrison J. Butterworth. Londres.
- 157 Rudolph, R., Kunkel, G., Staud, R., Baumgarten, C. (1978). *Allergologie* 1:27.
- 158 Sarfati, M. y Delespesse, G.(1988). *J Immunol* 141:2195.
- 159 Sarfati, M. Luo, H. y Delespesse G. (1989). *J Exp Med* 170:1775.
- 160 Sarfati, M. Rubio-trujillo, M. y Wong, K. (1984). *Immunol* 53:187.
- 161 Schmucker, T.H. (1933). *Planta* 18:641.
- 162 Segal, A.W., Tavrog, J.D. y Metzger, H. (1977). *Proc Nat Acad Sci USA* 74:2933.
- 163 Sehon, A.M. y Gyenes, L. (1971). **Immunological Diseases**. Edit. por M. Samter. Little brown. Boston. Mass.
- 164 Shivanna, K.R. y Johri, B.M. (1989). En **The angiosperm Pollen structure and function**. Edit. por John Wiley & Sons. Wiley eastern limited. Nueva Delhi.

- 165 Shivanna, K.R., Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. (1983). *Protoplasma* 107:175.
- 166 Sittle, P. (1960). *Grana Palinol* 2,2 :16.
- 167 Smith, M.C., Heusser, C, Wagner, K., Blaser, K. y Durkin, H.G. (1990). *J immunol* 140:4193.
- 168 Snapper, C.M., Finkelman, F.D. y Paul, W.E. (1988). *J. Exp Med* 167:183.
- 169 Solomon, W.R. (1984). *J Allergy Clin Immunol.* 4:449.
- 170 Spieksma FTh.M. (1987) *Arb Paul Ehrlich Inst* 80:15.
- 171 Stadler, B.M. (1991). *Allergy & Clinical Immunology News* 3:53.
- 172 Stanworth, D.R., Humfrey, J.H., Bennich, H. y Johansson, S.G.O. (1968). *Lancet* 2:17.
- 173 Stanworth, D.R. (1963). *Adv Immunol.* 3:181.
- 174 Stewart, F.R., Lake, F.R., Bird C.H. y Thompson. (1990). **Epitopes of atopic allergens**. Edit. por Sehon, A.H., Kraft, D. y kunkel G. The UCB Institute of Allergy. Belgica.

BIBLIOGRAFIA

- 175 Stewart, G.A., Turner, K.J., Baldo, B.A., Cripps, A.W., Ford, A., Seagroatt, V. y Lowenstein, H. (1988). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 86:9.
- 176 Subiza, E. (1980). *Allergol Immunophthol., Suppl.* 7:261.
- 177 Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350.
- 178 Tupy, J. (1960). *Biol Plant* 2:169.
- 179 Unanue, E.R. (1984). *Annu Rev Immunol* 2:395.
- 180 Vercelli, D., Jabara, H.H, Arai, K. y Geha, R.S. (1989). *J. Exp Med* 169:1295.
- 181 Vercelli, D. y Geha, R. (1989). *J Clin Immunol* 9:75.
- 182 Vitetta, E.S., Fernandez-botran, R., Myers, D., y Sanders, V.M. (1989). *Advan in Immunol* 45:1.
- 183 Von Pirquet C, (1906). *Muenchen. Med. Wochenschr* 53:1457.
- 184 Walker, J.W. (1976). En **The evolutionary significance of the exine**. Edit. por Ferguson, J.K. y Muller, J.-Linn soc sympos ser 1.
- 185 Warbung, O. y Christian, W. (1942) *Biochem Z.* 310:384.

- 186 Watanabe, K. (1955). *Bot Mag Tokyo* 68:40.
- 187 Weeke, B. (1973). *Scand J Immunol* 2 supl.1:147.
- 188 Weisenseel, M.H., Jaffe, L.F. (1976). *Planta* 133:1.
- 189 Westphal, W. Becker M, Schlaak M. (1988) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 86:69.
- 190 WHO *Technical Report Series* (1978). 15 N° 626.
- 191 Winslow, C.M. y Austen, K.F. (1984). *Prog Allergy* 34:236.
- 192 Wodehouse, R.P. en **Pollen grains**. Edit. por Hafner Publishing Co. Nueva York.
- 193 Wodnar-Filipowicz, A. Heusser, C.H. y Moroni, C. (1989). *Nature* 339:150.
- 194 Wyman, M. (1872). **Autumnal Catarrh; Hay fever**. Edit. por Hurd y Houghton. Cambridge.
- 195 Yasueda, H. Yui, Y., Shimizu, T. y Shida, T. (1983). *J Allergy Clin Immunol* 71:77.
- 196 Yodoi, J., Ishizaka, T. e Ishizaka, K. (1979). *J.Immunol.* 123:445.

BIBLIOGRAFIA

- 197 Yodoi, J. e Ishizaka, K. (1980). *J.Immunol.* 124:1322.
- 198 Yodoi, J., Ishizaka, T. e Ishizaka, K. (1980). *J.Immunol.* 125:1436.
- 199 Yodoi, J. e Ishizaka, K. (1979). *J.Immunol.* 122:2577.
- 200 Yoo, T.J., Spitz, E y McGerity, J.L.(1975). *Ann Allergy* 34:87.
- 201 Young, P. (1989). *Journal Immunol Methods* :295.
- 202 Yunginger, J.W. (1991). *Ann Allergy* 66:107.
- 203 Yunginger, J.W. (1988). *Arb Paul Ehrlich Inst* 82:129.
- 204 Ziegel, H.K. y Unanue, E.R. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:175.
- 205 Zubler, R. H., Werner-fabre, C., Wen, L., Sekita, K.I. y Straub, C. (1987). *Immunol Rev.* 99:281.